



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Fitosterolių iš augalinių žaliavų išskyrimas ir pritaikymas funkcinio jogurto gamyboje**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Ieva Bagdonaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Jonas Damašius**

Vadovas

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Fitosterolių iš augalinių žaliavų išskyrimas ir pritaikymas funkcinio jogurto gamyboje**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

---

**Ieva Bagdonaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Jonas Damašius**

Vadovas

**Doc. dr. Milda Keršienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Ieva Bagdonaitė

## **Fitosterolių iš augalinių žaliavų išskyrimas ir pritaikymas funkcinio jogurto gamyboje**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Ieva Bagdonaitė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Bagdonaitė Ieva. Fitosterolių iš augalinių žaliavų išskyrimas ir pritaikymas funkcinio jogurto gamyboje. Magistro studijų baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Jonas Damašius; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: fitosteroliai, ekstrakcija, jogurtas.

Kaunas, 2021. 65 p.

## Santrauka

Daugelyje augalinių žaliavų nustatomas gausus fitosterolių kiekis. Šie junginiai pasižymi sveikatą gerinančiomis savybėmis, tačiau fitosterolių išskyrimas ir panaudojimas naujų maisto produktų kūrime yra procesas reikalaujantis mokslinių tyrimų analizės.

Baigiamojo magistro projekto tikslas – išskirti fitosterolių glikozidus iš augalinių žaliavų ir pritaikyti funkcinio jogurto gamyboje. Įgyvendinant šį tikslą buvo atlikta žaliavų cheminės sudėties ir technologinių rodiklių analizė, vykdyta skirtingais būdais aliejų ekstrakcija. Fitosterolių frakcijų išgryninimas kietos fazės ekstrakcija, nustatymas dujų ir aukšto efektyvumo skysčių chromatografija. Pagaminti jogurtų prototipai ir atlikti jų jusliniai, fizikiniai-cheminiai, mikrobiologiniai tyrimai.

Tyrimams atlikti buvo pasirinktos augalinės kilmės žaliavos: kviečių sėlenos, kviečių gemalai, linų sėmenys, kanapių sėklos, graikiški riešutai, sojų pupelės ir sojų pupelių lecitinas. Pirmiausiai buvo atlikta žaliavų cheminės sudėties analizė norint įsivertinti jų savybes. Atlikus šią analizę didžiausias baltymų kiekis nustatytas sojos pupelėse, o riebalų – linų sėmenyse. Visose tirtose žaliavose vyravo linolo rūgštis, išskyrus linų sėmenis, kuriuose didžiausią kiekį sudarė  $\alpha$ -linoleno rūgštis. Superkritinės skysčių ir Soksleto ekstrakcijos būdais gauta aliejaus išėiga iš linų sėmenų buvo didžiausia.

Žaliavose analizuojant fitosterolių sudėtį po aliejaus išgryninimo kietos fazės ekstrakcija, dujų chromatografijos metodu, kviečių gemaluose ir sėlenose nustatytas tik brasikasterolis, kuris sudarė atitinkamai 1384,84  $\mu\text{g/ml}$  ir 6632,65  $\mu\text{g/ml}$ . Naudojant aukšto efektyvumo skysčių chromatografiją didžiausi kiekiai nustatyti  $\beta$ -sitosterolio kviečių gemaluose – 601,81  $\mu\text{g/ml}$  ir kviečių sėlenose – 591,98  $\mu\text{g/ml}$ . Kampesterolio didžiausias kiekis nustatytas kviečių gemaluose – 201,97  $\mu\text{g/ml}$ . Visose žaliavose nustatytos mažos stigmasterolio koncentracijos, o brasikasterolio – rasti tik pėdsakai. Tinkamiausios sąlygos fitosterolių ekstrakcijai yra aliejaus išgryninimas kietos fazės ekstrakcijos PSA kasetėmis ir gautus mėginius analizuojant aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodu. Tinkamiausi jogurto technologiniai ir jusliniai rodikliai gauti naudojant bakterijų kultūrų mišinį YC-X11, kurį sudaro daugiausiai *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* kamienai bei fitosterolių kiekis produkte – 1,2 g/100g. Po 21 tyrimų dienos bendras bakterijų skaičius jogurte sudarė 3,80 KSV/g, pH – 4,24, fitosterolių pasiskirstymas buvo vienalytiškas, kartumas, aštrumas, aštraus ir pašalinio kvapo intensyvumas silpnai išreikšti.

Bagdonaitė Ieva. Isolation of Phytosterols from Vegetable Raw Materials and Application in the Production of Functional Yogurt. Master's Final Degree Project / Assoc. prof. dr. Jonas Damašius; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: Phytosterols, Extraction, Yogurt.

Kaunas, 2021. 65 p.

### Summary

Many vegetable raw materials are rich in phytosterols. These compounds have health-enhancing properties, but the extraction and use of phytosterols in new food development is a process that requires science research analysis.

The aim of the final master's project is to extract phytosterol glycosides from plant raw materials and apply them in the production of functional yogurt. In order to achieve the goal, the analysis of chemical composition and technological parameters of raw materials was performed, and oil extraction was done in different ways. Purification of phytosterol fractions by solid phase extraction, isolation by gas and high performance liquid chromatography. Prototypes of yogurts were made and their sensory, physico-chemical and microbiological analysis were performed.

Raw materials of vegetable origin were selected for the study: wheat bran, wheat germ, linseeds, hemp seeds, walnuts, soybeans and soybean lecithin. First, an analysis of the chemical composition of the raw materials was performed to assess their properties. After this analysis, the highest protein content was found in soybeans and fat in linseeds. Linoleic acid predominated in all tested raw materials, except for linseeds, which had the highest content of  $\alpha$ -linolenic acid. The yield of oil from linseeds obtained by supercritical fluid and Soxhlet extraction methods was the highest.

While analysing the composition of phytosterols in the raw materials after solid purification by oil extraction, with gas chromatography method, only brasicasterol was found in wheat germ and bran, which was 1384.84  $\mu\text{g/ml}$  and 6632.65  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Using high performance liquid chromatography, the highest levels were found in  $\beta$ -sitosterol in wheat germ - 601.81  $\mu\text{g/ml}$  and in wheat bran - 591.98  $\mu\text{g/ml}$ . The highest content of campesterol was found in wheat germ - 201.97  $\mu\text{g/ml}$ . Low concentrations of stigmasterol were found in all raw materials, and only traces of brasicasterol were found. The most suitable conditions for the extraction of phytosterols are the purification of oil by solid-phase extraction PSA cartridges and the analysis of the obtained samples by high-performance liquid chromatography method. The most suitable technological and organoleptic indicators of yogurt were obtained using the bacterial culture mixture YC-X11, which consists of *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* and the amount of phytosterols in the product is 1.2 g/100g. After 21 days of assessment, the total number of bacteria in the yoghurt was 3.80 CFU/g, pH - 4.24, the distribution of phytosterols was homogeneous, bitterness, tanginess, intensity of pungent and extraneous odor were weakly expressed.

## TURINYS

<b>LENTELIŲ SĄRAŠAS .....</b>	<b>8</b>
<b>PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS.....</b>	<b>9</b>
<b>SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....</b>	<b>11</b>
<b>IVADAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA .....</b>	<b>14</b>
1.1. Fitosterolių poveikis žmonių sveikatai.....	14
1.2. Fitosterolių šaltiniai.....	17
1.3. Fitosterolių cheminė sudėtis ir savybės .....	20
1.4. Aliejų išskyrimas ir fitosterolių gryninimas.....	21
1.4.1. Tradiciniai ekstrakcijos metodai.....	22
1.4.2. Superkritinė skysčių ekstrakcija .....	23
1.4.3. Plonasluoksni chromografija.....	23
1.4.4. Kolonėlių chromatografija.....	23
1.4.5. Kietos fazės ekstrakcija .....	24
1.4.6. Kietos fazės mikroekstrakcija.....	24
1.5. Fitosterolių panaudojimas maisto produktų gamyboje .....	25
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	29
<b>2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI .....</b>	<b>31</b>
2.1. Medžiagos .....	31
2.2. Tyrimo objektai.....	32
2.3. Tyrimų metodai.....	32
2.3.1. Žaliavų cheminės sudėties nustatymas .....	32
2.3.2. Riebalų ekstrakcija.....	34
2.3.2.1. Ekstrahuotų riebalų analizė .....	34
2.3.3. Fitosterolių frakcijų gryninimas ir išskyrimas .....	35
2.3.4. Jogurto praturtinto fitosteroliais gamyba.....	36
2.3.4.1. Jogurto savybių vertinimas laikymo metu.....	37
2.3.5. Statistinis duomenų apdorojimas .....	38
<b>3. TIRIAMOJO DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>39</b>
3.1. Augalinių žaliavų cheminės sudėties įvertinimas .....	39
3.2. Aliejų ekstrakcijos iš augalinių žaliavų vertinimas.....	43
3.2.1. Fitosterolių ekstrakcijos iš augalinių žaliavų aliejų palyginimas.....	44
3.3. Aliejaus iš linų sėmenų skirtingais ekstrakcijos metodais įvertinimas.....	45
3.3.1. Fitosterolių gryninimo iš linų sėmenų aliejaus analizė.....	46
3.4. Fitosterolių frakcijų taikymas funkcinio jogurto gamybai.....	47

3.4.1. Fitosterolių frakcijų įtaka funkcinio jogurto savybėms .....	47
<b>IŠVADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>55</b>
<b>PRIEDAI .....</b>	<b>66</b>

## LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Aliejaus gamybos apimtys (2020 m.) .....	17
2 lentelė. Fitosterolių kiekiai rugiuose, kviečiuose ir speltoje .....	19
3 lentelė. Fitosterolių suvartojimo kiekis pagal šalis ir vartotojų grupes .....	19
4 lentelė. Bendras sterolių kiekis skirtinguose augaliniuose aliejuose, g/kg.....	21
5 lentelė. Tyrime naudotos medžiagos .....	31
6 lentelė. Jogurtų praturtintų fitosteroliais receptūros .....	37
7 lentelė. Žaliavose esantys baltymų ir riebalų kiekiai, % .....	39
8 lentelė. Žaliavose esantys mineralinių medžiagų kiekiai, % .....	40
9 lentelė. Žaliavose esantys krakmolo ir cukrų kiekiai, % .....	40

## PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Fitosterolių poveikiai žmonių sveikatingumui .....	14
2 pav. Ląstelės apoptozė (mirtis).....	15
3 pav. Neigiamos fitosterolių vartojimo pasekmės .....	15
4 pav. $\beta$ -sitosterolio galimi poveikiai žmonių sveikatai .....	16
5 pav. Pagrindiniai fitosterolio glikozidų šaltiniai .....	17
6 pav. Fitosterolių koncentracija skirtingų rūšių aliejuose .....	18
7 pav. Fitosterolių cheminės struktūros .....	20
8 pav. Fitosterolių glikozidų išgavimo eiga ir būdai .....	22
9 pav. Plonasluoksnės chromatografijos ir vaizdo analizės sąveika nustatant fitosterolius .....	23
10 pav. Kietos fazės ekstrakcija .....	24
11 pav. Funkcinio maisto komponentai.....	25
12 pav. Funkcinių pieno produktų rodikliai .....	26
13 pav. Valgomų nanodalelių tipai.....	27
14 pav. Junginiai naudojami emulsijoms gaminti .....	28
15 pav. Ergosterolių poveikiai žmogaus organizmui .....	29
16 pav. Tyrimų principinė schema .....	32
17 pav. Jogurto gamybos schema termostatinu būdu .....	37
18 pav. Augalinės kilmės žaliavos .....	39
19 pav. Žaliavų apmuilinimo skaičius, mg/g.....	41
20 pav. Žaliavų lūžio rodiklis, $n_D^t$ .....	41
21 pav. Žaliavų lydymosi temperatūra, °C .....	41
22 pav. Kviečių sėmenų RR sudėtis, %.....	42
23 pav. Kviečių gemalų RR sudėtis, % .....	42
24 pav. Linų sėmenų RR sudėtis, %.....	42
25 pav. Kanapių sėklų RR sudėtis, %.....	42
26 pav. Sojų pupelių RR sudėtis, % .....	43
27 pav. Sojų pupelių lecitino RR sudėtis, % .....	43
28 pav. Graikiškų riešutų RR sudėtis, %.....	43
29 pav. Fitosterolių glikozidų sudėtis po kietos fazės ekstrakcijos, $\mu\text{g/ml}$ .....	44
30 pav. Fitosterolių glikozidų sudėtis žaliavų aliejuose po kietos fazės ekstrakcijos, $\mu\text{g/ml}$ .....	44
31 pav. Linų sėmenų aliejaus išėigos, %.....	45
32 pav. Fitosterolių sudėtis linų sėmenyse, $\mu\text{g/ml}$ .....	46
33 pav. Komercinio fitosterolių mišinio sudėtis, $\mu\text{g/ml}$ .....	47
34 pav. Jogurtai praturtinti fitosteroliais .....	47
35 pav. Jogurtų prototipų pH po 1 dienos .....	48
36 pav. Jogurtų prototipų pH po 7 dienų.....	48
37 pav. Jogurtų prototipų pH po 14 dienų .....	48
38 pav. Jogurtų prototipų pH po 21 dienos .....	48
39 pav. Tiriamųjų jogurtų juslinės savybės po 1 dienos.....	49
40 pav. Tiriamųjų jogurtų juslinės savybės po 7 dienų .....	50
41 pav. Tiriamųjų jogurtų juslinės savybės po 14 dienų .....	50
42 pav. Tiriamųjų jogurtų juslinės savybės po 21 dienos.....	51
43 pav. BMS jogurtų prototipuose, po 1 dienos .....	52
44 pav. BMS jogurtų prototipuose, po 7 dienų .....	52

45 pav. BMS jogurtų prototipuose, po 14 dienų .....	52
46 pav. BMS jogurtų prototipuose, po 21 dienos .....	52

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

### Santrumpos:

AESC – aukšto efektyvumo skysčių chromatografija;

BMS – bendras mikroorganizmų skaičius;

Da – atominės masės vienetas (daltonas);

DC – dujų chromatografija;

KFE – kietos fazės ekstrakcija;

LJD – liepsnos jonizacijos detektorius;

MS – masių spektrometras;

$n_D^t$  – lūžio rodiklio matavimo vienetas.

## IVADAS

Pagrindinis Europos Sąjungos uždavinys – išsaugoti ir gerinti piliečių sveikatą, vykdyti sveikatos saugojimo infrastruktūros modernizavimą ir gerinti veikiančių apsaugos sistemų efektyvumą. Vienas iš pagrindinių veiksnių, sąlygojančių žmonių sveikatingumą, yra maisto sauga ir kokybė. Nesaugus ir nekokybiškas maistas gali sukelti daugiau kaip 200 įvairių ligų [1]. Norint pagerinti žmonių sveikatingumą didelis dėmesys yra kreipiamas į profilaktines priemones. Dabartiniu metu viena iš pagrindinių žmonių sveikatos problemų yra optimalus cholesterolio apykaitos procesų sureguliuojimas organizme. Sprendžiant šią problemą, yra svarbu vartoti sveikus produktus, ypač tokius, kuriuose gausu fitosterolių. Javuose, riešutuose ir augaliniuose aliejuose yra daug laisvųjų sterolio esterų [2]. Fitosteroliai augaluose atlieka svarbią funkciją apsaugant juos nuo virusinės ir grybelinės kilmės ligų, pagerina fiziologinę būklę esant nepalankioms klimatinėms sąlygoms, ypač sausros metu. Skirtingų fitosterolių masė gali sudaryti nuo 398,675 Da iki 576,847 Da. Fitosteroliai yra panašūs į cholesterolio junginius, augalų ląstelių membranose reguliuoja fosfolipidų funkcijas ir sutinkami tokiomis formomis, kaip laisvieji alkoholio, riebalų rūgščių esteriai, sterilglikozidai ir acilinti sterilglikozidai [3]. Fitosterolių glikozidai – svarbūs maistinių medžiagų komponentai, kurie terpiami į tokius produktus, kaip užtepėlė, margarinas, jogurtas, pienas ir kitus maisto produktus. Susidomėjimas šiais junginiais kyla labiausiai dėl jų stiprumo mažinant kraujo serume mažo tankio lipoproteinų cholesterolio kiekius, kurie yra širdies ir kraujagyslių ligų formavimosi veiksniai. Fitosterolių papildymo forma, dažnis, vartojimo laikas ir pradinis mažo tankio cholesterolio kiekis žmogaus organizme gali turėti įtakos cholesterolio kiekio sumažėjimui kraujo serume. Laisvieji steroliai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Tyrimais įrodyta, kad  $\beta$ -sitosterolis, kampesterolis bei stigmasterolis gali mažinti lipidų peroksidaciją ir sergamumą onkologinėmis ligomis [4].

Tačiau mokslinėje literatūroje randama ir prieštaraujančių teiginių. Žmogaus organizme cirkuliuojantys fitosterolių oksidacijos produktai gali sukelti vainikinių arterijų, aterosklerozines širdies ir kraujagyslių ligas [5, 6]. Fitosterolių oksidaciniai produktai dalyvauja aterogenezės ir uždegiminiuose procesuose bei pasižymi skirtingais citotoksiškumo lygiais, todėl skilimo junginiai gali skatinti žmonių sergamumą medžiagų apykaitos ligomis [7]. Fitosterolių poveikis žmonių sveikatingumui priklauso nuo jų kiekio maisto produktuose, geografinės vietovės, amžiaus, lyties, fiziologinės būklės bei naudojamų maistinių žaliavų kilmės. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad fitosterolių glikozidų įsisavinamumas žmogaus organizme gali siekti tik iki 16 %. Šešiose ES šalyse atlikti tyrimai parodė, kad nuo 11 % iki 33 % gyventojų reguliariai vartoja maisto produktus, kurie yra praturtinti fitosteroliais [8]. Fitosterolių koncentracijos žaliavose priklauso nuo žaliavos kilmės, geografinės vietos, auginimo ir klimatinės sąlygų. Fitosterolių glikozidų veikliosios medžiagos išėigos sąlygoja naudojami išskyrimo bei gryninimo metodai. Gerinant fitosterolių įsisavinimą žmogaus organizme gali būti naudojami modernūs maisto gamybos technologiniai procesai, kaip įkapsuliavimas, nanodydžių sistemų, stabilijų vandeninių fitosterolių emulsijų naudojimas bei technologinio proceso metu optimalių temperatūrinių parametrų užtikrinimas. Nuo visų minėtų faktorių priklauso fitosterolių absorbcijos efektyvumas žmogaus organizme. Pieno produktų praturtinimas fitosteroliais yra prasmingas mažinant neigiamą cholesterolio poveikį žmonių sveikatai. Tačiau kiekvienas fitosterolių įterpimas į jogurtus yra unikalus procesas, ir tolimesni tyrimai turi būti vykdomi atsižvelgiant į produktų maistinės vertės pokyčius, technologines savybes, priimtinumą vartotojui ir Komisijos reglamento (ES) Nr. 432/2012 [9] reikalavimus, kuriame nurodoma, kad sveikatinantis fitosterolių poveikis žmonėms pasiekiamas esant jų suvartojimui ne mažiau kaip 0,8 g per parą.

**Baigiamojo magistro projekto tikslas** – išskirti fitosterolių glikozidus iš augalinių žaliavų ir pritaikyti funkcinio jogurto gamyboje.

Šiam tikslui pasiekti išsikelti tokie **projekto uždaviniai**:

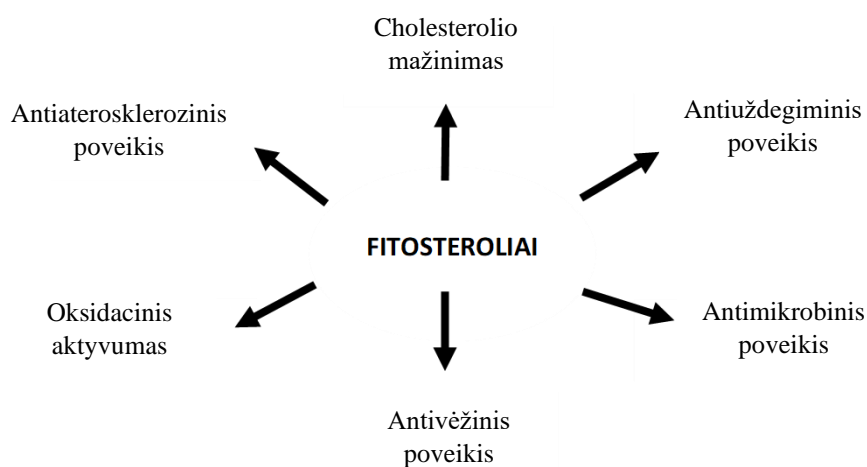
1. atlikti žaliavų cheminės sudėties analizę (kviečių sėlenose, kviečių gemaluose, linų sėmenyse, kanapių sėklose, graikiškuose riešutuose, sojų pupelėse bei sojų pupelių lecitine);
2. nustatyti efektyviausias aliejų ekstrakcijos sąlygas;
3. įvykdyti fitosterolių frakcijų išskyrimą / išgryninimą;
4. sukurti funkcinį jogurtą panaudojant skirtingas fitosterolių frakcijas;
5. įvertinti funkcinio jogurto prototipų juslines, fizines, chemines ir mikrobiologines savybes.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje yra apžvelgtas fitosterolių poveikis žmonių sveikatingumui (žr. 1 pav.), atlikta žaliavų ir savybių analizė, įvertinti išskyrimo bei gryninimo metodai, pateiktos panaudojimo galimybės kuriant naujos kartos funkcionaliuosius maisto produktus.

### 1.1. Fitosterolių poveikis žmonių sveikatai

Fitosteroliai pačiame augale atlieka svarbų vaidmenį biologiniuose procesuose, pvz., kampesterolis yra atsakingas už brasinosteroidų, kitų hormonų, kurie reguliuoja augalų augimą, vystymąsi ir morfogenezę veiklą, o  $\beta$ -sitosterolis ir stigmasterolis už ląstelių membranų būklę. Fitosteroliai taip pat dalyvauja atsakomosiose reakcijose į biotinius ir abiotinius stresus. Augaliniai steroliai yra pagrindinės sudedamosios dalys, kurios formuoja augalo natyvinį imunitetą. Tyrimais nustatyta, kad augalo sterolių sudėtis koreliuoja su jo atsparumu sausrui [10].

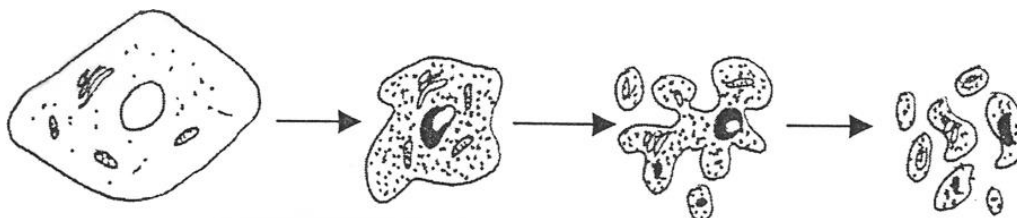


1 pav. Fitosterolių poveikiai žmonių sveikatingumui

Fitosteroliai nėra sintetinami žmonių organizmuose ir gaunami tik iš augalinio maisto. Jų absorbcija žmogaus žarnyne mažesnė nei cholesterolio. Rezorbcija gali priklausyti nuo žmogaus individualių savybių. Fitosterolių absorbcija žmogaus organizme siekia tik 2–16 %. Viena iš mažos fitosterolių rezorbcijos priežasčių gali būti prasta fitosterolių esterifikacija eritrocituose [3]. Vartojant maistą cholesterolio absorbcija žmogaus organizme siekia iki 50–60 %. Fitosteroliai, kaip ir cholesterolis, yra įkorporuojami į micles ir tik po to patenka į enterocitus. Fitosteroliai lyginant su cholesteroliais daug greičiau yra išskiriami į žarnyną, naudojant ABCG5/G8 pernešėjus. Dėl to fitosteroliai mažiau absorbuojami žarnyne, palyginus su cholesteroliais, ir jų koncentracija kraujo serume palyginti su cholesteroliais yra mažesnė. Tai gali būti susiję su mažesne fitosterolių absorbcija žarnyne ir didesniu jų išskyrimu su tulžimi [2, 11].

Bandymai vykdyti su gyvūnais parodė, kad fitosteroliai gali mažinti imuninių ląstelių uždegiminį aktyvumą, įskaitant makrofagus ir neutrofilus. Tai rodo, kad fitosteroliai biologinėse sistemose gali turėti priešuždegiminį poveikį. Fitosterolių poveikis žmonių sveikatingumui pateiktas 1.1 paveiksle. Skirtingai nuo normalių ląstelių, vėžinės ląstelės praranda gebėjimą reaguoti į žūties signalus, kurie sukelia užprogramuotą ląstelių mirtį, t. y. apoptozę (žr. 2 pav.).  $\beta$ -sitosterolis sukelia prostatos, krūties ir storosios žarnos vėžio ląstelių apoptozę. Be to, bandymai su gyvūnais bei vykdyta žmonių stebėseną parodė, kad fitosteroliai mažina bendrojo cholesterolio ir žemo tankio lipoproteinų koncentracijas kraujo plazmoje. Vėliau eksperimentais įrodyta, kad nuoseklus augalinio sterolio vartojimas mažina žmonių cholesterolio kiekį kraujyje. Fitosterolio naudojimas jau po 2 ar 3

savaičių pradeda mažinti mažo tankio lipoproteinų cholesterolio kiekį kraujo plazmoje. Ras'as et al., [8] nustatė, kad augalinio sterolio suvartojimas per parą 0,6–3,3 g, palaipsniui, nuo 6 iki 12 % mažina mažo tankio lipoproteinų koncentraciją kraujyje. Vartojant per parą nuo 1,5–2,4 g augalinių sterolių ir stanolių, „blogojo“ cholesterolio kiekį kraujyje galima sumažinti vidutiniškai 7–10,5 % [2]. Patel'is et al., [12] bei Nakano et al., [13] nurodė, kad fitosterolių vartojimas 1–3 g/d sumažina bendrą cholesterolio kiekį kraujo plazmoje 10–15 %.



**2 pav.** Ląstelės apoptozė (mirtis) [14]

Trautwein'as et al., [15] nurodo, kad tokių maisto produktų, kaip margarinas ir jogurtas papildymas fitosteroliais yra fiziologiškai prasmingas, nes kaip ir minėta ankstesniuose šaltiniuose mažina cholesterolio koncentraciją žmonių kraujyje. Fitosterolių glikozidai pasižymi kontraindikacijomis, palyginus su fosfolipidų funkcijomis, nes skirtingai veikia žmogaus kraujagyslių vientisumą bei neurotoksinų 4-prostaglandinų sintezę. Jie yra hemostazinės medžiagos sudedamoji dalis, kuri mažina kraujagyslių pralaidumą, skatina prostaglandinų sintezę, palengvina širdies ir kraujagyslių ligų eigą, stiprina kraujagyslių sistemą [16].

Jungtinių Amerikos valstijų Maisto ir vaistų administracija bei ES Europos maisto ir saugos tarnyba padarė išvadą, kad augalų steroliai ir stanoliai yra saugūs vartoti žmonių mityboje, tačiau jų kiekis neturėtų viršyti 3 g/d. Bandyuose su žmonėmis yra nustatyta, kad fitosteroliai esminės įtakos riebaluose tirpstančių vitaminų D, E, K, A rezorbcijai neturi. Tačiau moksliniai tyrimai rodo, kad maisto produktuose naudojant sterolius arba stanolius karotenoidų kiekis kraujo plazmoje gali sumažėti 10–20 %. Todėl žmonėms rekomenduojama vartoti vaisius ar daržoves, kuriuose yra gausu karotenoidų. Tokios sudėties papildai gali būti naudojami ištisus mėnesius [17].

Žmonių metabolinis atsakas į fitosterolių vartojimą priklauso nuo jų genetinių skirtumų, pvz., genų struktūros ApoE ir CyP7A1. Genų ABCG5/ABCG8 mutacija skatina fitosterolių kaupimąsi žmonių organizme ir sukelia makrotrombocitopeniją, trombocitų disfunkciją, kepenų ligų vystymąsi. Cholesterolio akumuliacija žmogaus kraujyje susijusi su ksantomų ir aterosklerozės procesu formavimusi bei sitosterolemiją [12, 18]. Saeed'as et al., [19] nurodo, kad dideliais kiekiais ir ilgai vartojant fitosterolius, jie gali kauptis žmogaus smegenyse ir neigiamai veikti nervinę sistemą.



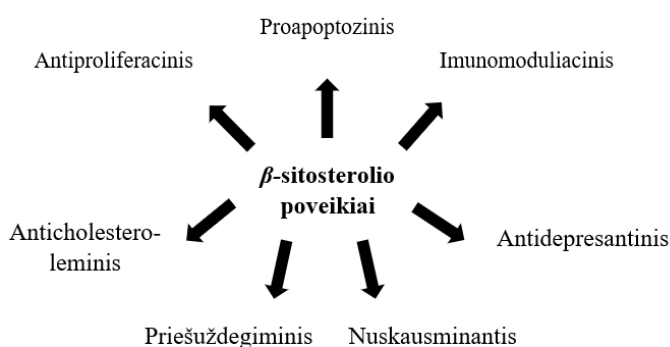
**3 pav.** Neigiamos fitosterolių vartojimo pasekmės

Fitosterolių skilimo produktai dalyvauja aterogenezės ir uždegiminiuose procesuose bei pasižymi skirtingu citotoksiniu poveikiu. Nustatyta neigiama sąsaja tarp fitosterolių oksidacinių procesų intensyvumo ir sergamumo medžiagų apykaitos ligomis žmonių, kurių maiste buvo didelės fitosterolių koncentracijos [7]. Esant gausiam fitosterolių vartojimui, gali pasireikšti šalutiniai simptomai (žr. 3 pav.). Žmonėms, sergantiems sitosterolemija, reikia vengti maisto ar papildų, kurių sudėtyje yra augalų sterolių. Nėščioms ir naujagimius maitinantioms moterims augalinių sterolių ar stanolių nerekomenduojama vartoti, nes jų poveikis esant minėtai fiziologinei būklei nėra iki galo ištirtas [20].

Tačiau Shahi et al., [21] ištyrė, kad vartojant per dieną 1,6 g fitosterolių, sumažėjo žemo tankio lipoproteinų cholesterolio, aspartato aminotransferazės, alanino aminotransferazės, naviko nekrozės alfa faktoriaus kiekiai pacientams, kurie sirgo nealkoholiniu kepenų suriebėjimu. Duomenys apie fitosterolių poveikį žmonių nutukimui yra priešaringi. Vykdyti tyrimai parodė nereikšmingą fitosterolių poveikį kūno masės dinamikai, tačiau nustatytas teigiamas poveikis kūno masės indekso sumažėjimui, kai šis rodiklis didesnis nei 25 [22].

Dėl unikalios sudėties fitosteroliai ir kitos medžiagos, kaip polifenoliai, vitaminas E, karotinoidai, magnis, probiotikai gali būti naudojami kaip sveikatinantys komponentai ligoniams sergantiems Covid-19 infekcija [23].

Fitosteroliai integruojasi į normalias ir vėžines ląstelių membranas, jose pakeisdami substancijas, produkuojančias cholesterolį 3D struktūroje bei jo biofizines savybes. Fitosteroliai taip pat sistematiškai mažina cholesterolį, veikdami tiek tiesiogiai (integruojasi į plazmos membraną), tiek netiesiogiai (mažina cholesterolio tiekimą į ląsteles) ir pakeičia membranų biofizines savybes. Ląstelių membranose cholesterolio pakeitimas fitosteroliais sumažina membranų standumą bei slėgio profilius. Šios savybės yra nuosekliai susijusios su onkogeninio signalo ir klasikinio vėžio požymių slopinimu [24].



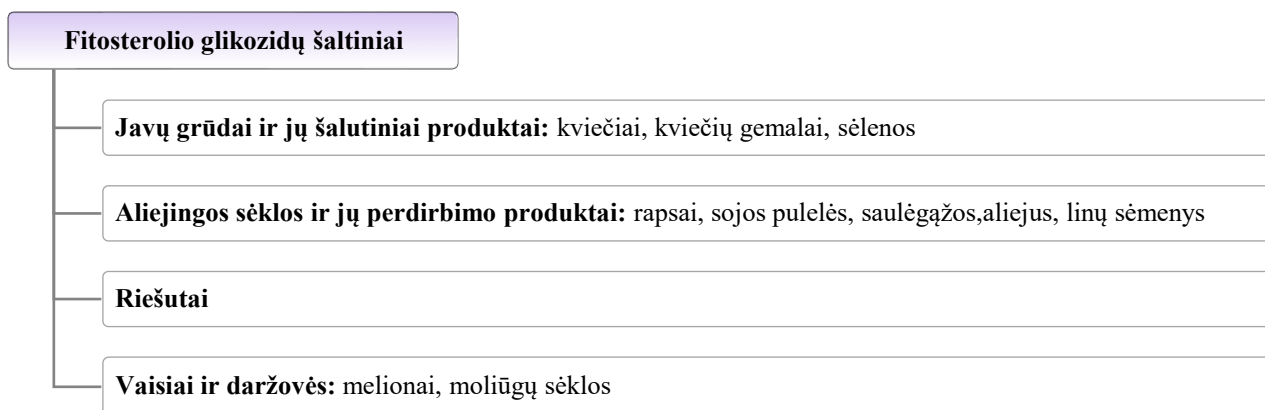
**4 pav.**  $\beta$ -sitosterolio galimi poveikiai žmonių sveikatai

Fitosteroliai yra naudojami kuriant funkcionalųjį maistą, nes pasižymi naudingu poveikiu žmonių sveikatai.  $\beta$ -sitosterolis slopina metilolinoleato ir  $\alpha$ -tokoferolio oksidacinius procesus. Todėl galima teigti, kad  $\beta$ -sitosterolis veikia kaip antioksidantas ir mažina laisvųjų radikalų neigiamą poveikį žmogaus organizmui. Bandymuose su Wistar žiurkėmis nustatyta, kad  $\beta$ -sitosterolis mažina 1,2-dimetilhidrazino sukeltą oksidacinį stresą, todėl jis gali būti veiksmingas gydant storosios žarnos kancerogenezę.  $\beta$ -sitosterolis gali būti oksiduojamas *in vivo* ir susidaro keli oksidaciniai produktai, kaip 7- $\beta$ -hidroxisitosterolis, 7- $\alpha$ -hidroxisitosterolis, 5,6- $\alpha$ -epoksitosterolis, 5,6- $\beta$ -epoksitosterolis ir

7-ketositosterolis. Taip pat tyrimais nustatyta, kad  $\beta$ -sitosterolis pasižymi 4 paveiksle nurodytais poveikiais [25]. Fitosteroliai yra naudojami maisto (funkcinių maisto priedų ir gėrimų gamyboje) ir farmacijos (maisto papildų ir terapinių steroidų gamyboje) pramonėse.

## 1.2. Fitosterolių šaltiniai

Augaluose randama daugiau nei 250 įvairių fitosterolių junginių [26]. Gausiausiais kiekiais įvairiose žaliavose randami šie fitosteroliai:  $\beta$ -sitosterolis, stigmasterolis, kampesterolis, brasikasterolis ir mažesniais kiekiais *D5* – avenasterolis [16, 27].



5 pav. Pagrindiniai fitosterolio glikozidų šaltiniai

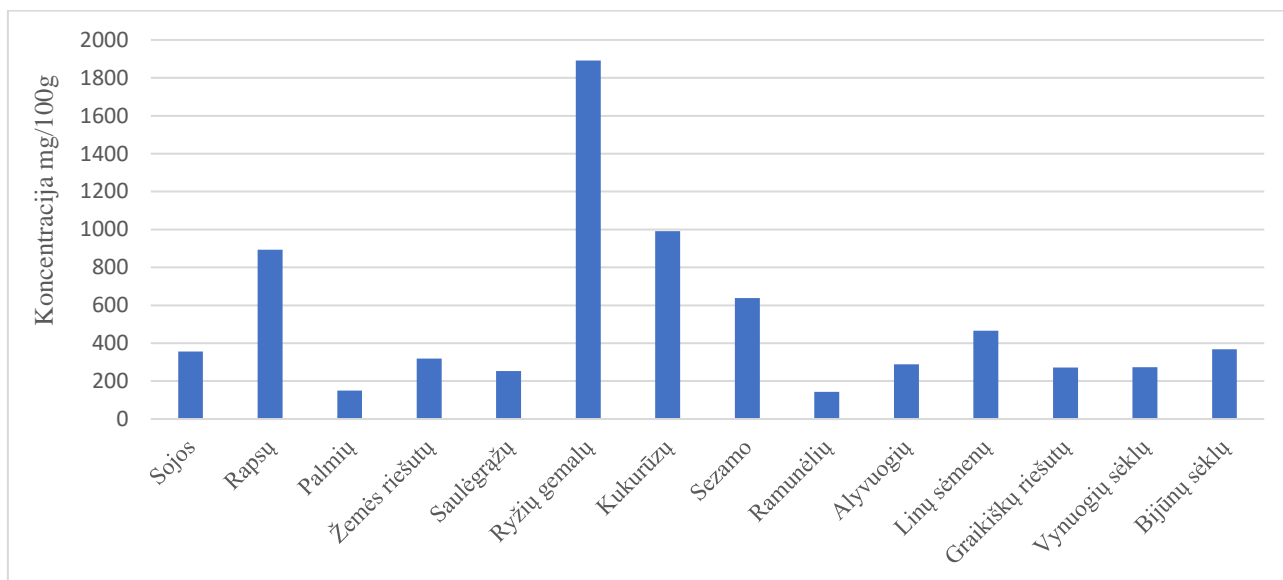
Fitosteroliai daugiausiai randami augaliniuose aliejuose, sėklose, riešutuose ir kituose vaisiuose bei daržovėse. Fitosterolių glikozidų šaltiniai yra pateikti 5 paveiksle. Pagrindinės maistinės medžiagos, iš kurių išskiriami fitosteroliai – įvairūs aliejai. Apie 24 milijonai tonų augalinių aliejų: palmių, rapsų, sojų pupelių, saulėgrąžų ir alyvuogių, buvo suvartoti 27 Europos Sąjungos valstybėse narėse 2019 metais, iš kurių apie 52 % buvo naudojama maistui. Tačiau augalinių aliejų vartojimo įpročiai skirtingose šalyse skiriasi. Palmių aliejaus mažiausiai yra suvartojama Šiaurės Europos šalyse, kadangi šiame regione plačiai naudojamas rapsų aliejaus. Viduržemio jūros šalyse vartojamas saulėgrąžų, sojų bei alyvuogių aliejus [28]. Aliejaus gamybos apimtys pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Aliejaus gamybos apimtys (2020 m.) [29]

Aliejaus rūšis	Šalis	Kiekis, mln.t
Rapsų aliejus	Vokietija	3,868
	Prancūzija	1,750
Sojų aliejus	Vokietija	0,634
	Ispanija	0,609
	Olandija	0,620
	Italija	0,442
Saulėgrąžų aliejus	Vengrija	0,721
	Prancūzija	0,615
	Ispanija	0,584

Augaliniai aliejai yra svarbūs fitosterolių ir jų esterų šaltiniai. Bendras sterolio kiekis augaliniuose aliejuose sudaro 0,04–1,5 %. Rapsų ir saulėgrąžų aliejuose, taip pat aliejuose, gaunamuose iš grūdų, tokių kaip kukurūzų gemalų, kviečių gemalų arba ryžių sėlenų, fitosterolių gali būti iki 3,2 %.

Fitosteroliai yra augalinių aliejų svarbūs komponentai, kurie kartu su didele nesočiųjų riebalų rūgščių ir kitų lipidų koncentracija bei kitais junginiais, kaip tokoferoliai ar skvalenas yra teigiamai reikšmingi žmonių sveikatai. Fitosteroliai, sudaryti iš skirtingų junginių, kurių koncentracija priklauso nuo geografinės vietos, naudojamų augalų ir gavybos būdų [3]. Yang'as et al., [30] nustatė, kad fitosterolių koncentracija priklauso nuo aliejaus rūšies (žr. 6 pav.).



6 pav. Fitosterolių koncentracija skirtingų rūšių aliejuose [30]

Rapsų aliejuje gausu brasikasterolio, alyvuogių ir saulėgražų aliejuose yra daug  $\beta$ -sitosterolio. Pagal sterolių sudedamąsias dalis galima identifikuoti aliejų kilmę. Augaliniame aliejuje esantys fitosteroliai dažniausiai būna laisvos arba esterių su riebalų rūgštimis formose. Minėtoms frakcijoms būdinga iš dalies skirtinga sterolių kompozicija, todėl sudėčiai įvertinti siūloma atlikti viena iš šių dviejų klasių analizę, nes ji suteikia išsamesnę informaciją apie aliejų autentiškumą. Be to, buvo įrodyta, kad aliejaus rafinavimas veikia laisvųjų sterolių ir sterilo esterių sudėtį. Apibendrinti tyrimai parodė, kad laisvieji steroliai vyrauja alyvuogių, vynuogių sėklų, dygminių ir sojos aliejuose, o kukurūzų gemaluose, rapsų ir saulėgražų aliejuose – esterinti steroliai [3].

Įvairiuose riešutuose, kurie priklauso skirtingoms augalų šeimoms, gausu fitosterolių. Tyrimais įrodyta, kad fitosterolių koncentracijos riešutuose priklauso nuo jų genotipo, auginimo metų bei geografinės vietovės.  $\beta$ -sitosterolis sudaro pagrindinę sterolių dalį visose riešutų veislėse. Didžiausi fitosterolio kiekiai randami pistacijose ir kedro riešutuose [31]. Graikiniai riešutai yra turtingi fitosteroliais, baltymais, vitaminais, maistinėmis skaidulomis bei polinesočiosiomis riebalų rūgštimis, ypač linolo ir  $\alpha$ -linoleno [32]. Grūdai ir grūdų produktai, pvz., duona, dribsniai, makaronai, augaliniai aliejai, taip pat daržovės ir vaisiai yra pagrindiniai fitosterolių šaltiniai. Likusi fitosterolių dalis gaunama iš sėklų, riešutų ir kitų augalinių maisto produktų. Grūduose esantys riebalai, baltymai, mineralinės medžiagos ir fitochemikalai, tokie kaip fenoliniai junginiai ir fitosteroliai, turi prevencinių savybių ligų atveju. Fitosterolių suvartojimo kiekis priklauso nuo įvairių faktorių: mitybos įpročių, gyventojų skaičiaus, amžiaus ir šis rodiklis kinta nuo 228 iki 338 mg/d. Wang'as et al., [33] nustatė, jog fitosterolių suvartojimas siekia 311 mg/d moteriai ir 330 mg/d vyriui.

Kviečiai yra vienas iš pagrindinių maisto ingredientų žmonių mityboje, iš jų gaunami miltai, o iš šio produkto gaminama duona, sausainiai, pyragai ir kiti patiekalai. Jų sudedamosios dalys gali būti

naudojamos funkcinių maisto produktų kūrimo. Kviečių branduolių aliejus pasižymi aukšta maistine verte ir didele fitosterolių koncentracija. Steroliai daugiausiai sudaryti iš  $\beta$ -sitosterolio, kampesterolio, stigmasterolio ir nedideliais kiekiais randamų kitų sterolio formų. Minėtų junginių bendri kiekiai pateikti 2 lentelėje [34].

**2 lentelė.** Fitosterolių kiekiai rugiuose, kviečiuose ir speltaje [34]

Javai	Fitosterolių kiekis, $\mu\text{g/g}$
Rugiai	1098 – 1420
Kviečiai	670 – 959
<i>Triticum spelta</i>	893 – 963

Tyrimais nustatyta, kad riešutuose, ankštinių augalų sėklose, kviečių gemaluose, nesmulkintuose grūduose, sėlėnose, vaisiuose ir daržovėse gali būti dideli kiekiai augalinių sterolių [35]. Phillips'as et al., [36] nustatė, kad didžiausia augalinių sterolių koncentracija buvo linų sėmenyse ir sojos pupelėse.

Fitosterolių glikozidai randami ne tik augaliniame maiste, bet ir kiaušinių trynyje, vėžiagyviuose, gyvūnų kepenyse. Marangoni & Poli [37] nustatė, kad didžiausias bendras fitosterolių glikozidų kiekis yra sezamų sėklose ir kviečių gemaluose, atitinkamai 4000 ir 4130 mg/kg.

Daugiausiai maisto produktų, kurie praturtinti fitosteroliais yra suvartojama Anglijoje – 736 kg/žmogui, o mažiausiai Graikijoje – 65 kg/žmogui. Tai sudaro įvairios užtepėlės, jogurto gėrimai ir kiti produktai [8]. Dėl žmonių mitybos įpročių skirtumų su maistu gaunamų fitosterolių kiekis labai skiriasi priklausomai nuo geografinės vietovės, žmonių lyties ir amžiaus. Mokslininkų gauti duomenys pateikti 3 lentelėje [7].

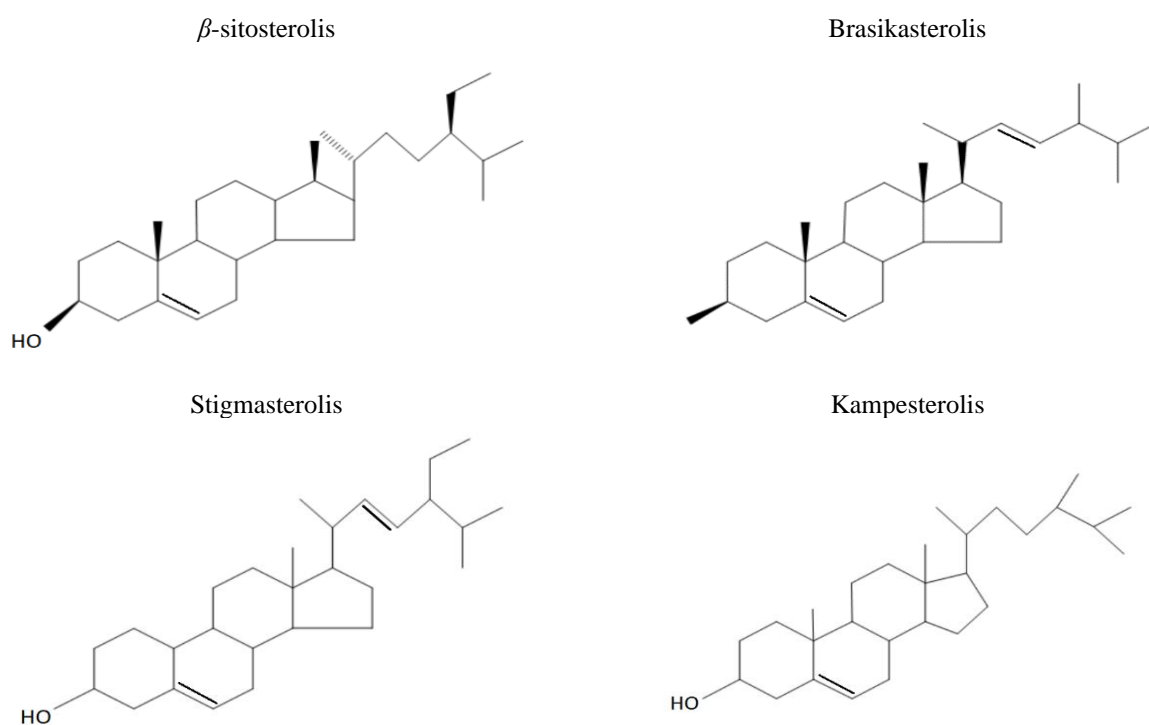
**3 lentelė.** Fitosterolių suvartojimo kiekis pagal šalis ir vartotojų grupes [7]

Šalis	Suvartojimo kiekis, mg/d	Vartotojų grupė
Suomija	140–360	Visi
Japonija	375	Visi
Olandija	359	Visi
Anglija	300	Vyrai
Anglija	293	Moterys
Belgija	218–280	Suaugusieji
Belgija	172–194	Ikimokyklinio amžiaus vaikai

Gėrimų, kurių sudėtyje yra fitosterolinių junginių, analizė parodė, kad jų paplitimas ES yra didelis. Tokius gėrimus gamina pasaulinio masto kompanijos, tokios kaip „Oat-ly AB“, „Coca-Cola Company“, „Pepsico Belux BVBA/SPRL“, „Forever Living Products“, „Carlsberg Breweries A/S“, „Nestle SA“ [38].

### 1.3. Fitosterolių cheminė sudėtis ir savybės

Fitosteroliai yra triterpenai, savo struktūra panašūs į cholesterolio struktūrą, dažnai sujungti 5,6-dviguba jungtimi, ir jų pagrindinė funkcija ląstelių membranose – stabilizuoti fosfolipidus. Augaluose esantys fitosteroliai egzistuoja tokiomis formomis, kaip laisvieji alkoholio, riebalų rūgščių esteriai, sterilglikozidai ir acilinti sterilglikozidai. Sterilglikozidai ir acilinti sterilglikozidai yra tipiniai sterolio molekules dariniai. Sterilglikozidai steroliuose dažniausiai randami kaip laisvos formos junginiai. Cukrų (gliukozės, fruktozės, pentozės ir kt.) dalis, cukrų molekulių skaičius ir jų jungimasis su sterolių konfiguracija gali būti skirtingas, dažniausiai yra paplitusi *D*-gliukozės, piranozės forma, prisijungusi prie 3-hidroksi grupės *C*-3 atomo. Sterilo glikozidai paprastai turi vieną ar daugiau gliukozės likučių [3]. Fitosterolių cheminės struktūros pateiktos 7 paveiksle.



7 pav. Fitosterolių cheminės struktūros

Sterolio riebalų rūgščių esteriai yra sudaryti iš esterintų riebalų rūgščių, turinčių 12–22 anglies atomus. Tačiau šioje struktūroje dažniausiai dominuoja C16 ir C18 riebalų rūgščių dalys. Skirtingose augalų sudedamosiose dalyse randamos įvairios esterintų sterolio ir riebalų rūgščių kompozicijos. Sterolio riebalų rūgščių biosintezė priklauso nuo acetiltransferazės savybių bei substrato struktūros. Sterilo rūgšties esterių biologinės funkcijos dar nėra pilnai išanalizuotos. Manoma, kad jos visų pirma atlieka apsauginį vaidmenį ir gali būti atsparios grybelinėms ir kitoms patogeninėms infekcijoms. Tačiau kituose *in vitro* tyrimuose nustatyta, kad minėti junginiai gali pasižymėti antioksidacinėmis savybėmis [39].

Analizuojant mikro ir makro elementų sudėtį saulėgrąžų aliejuje, nustatyta, priklausomai nuo jo gavimo būdų bei gavybos metų, įvairios sunkiųjų metalų, kaip vanadžio, stroncio, švino, arseno ir kadmio koncentracijos. Šie junginiai gali turėti neigiamą poveikį fitosterolių funkcijomis žmogaus organizme. Vykdam analogiškus tyrimus, sunkiųjų metalų graikiškų riešutų, linų sėmenų, sojų pupelių, kviečių sėlenų aliejuose nerasta. Tai gali būti viena iš perspektyvių tyrimų kryptių,

analizuojanti makro elementų poveikį fitosterolių fiziologinėms savybėms [40]. Kuriant funkcinius produktus gali būti naudojami tokie fitosterolių junginiai:

- $\beta$ -sitosterolis- $\beta$ -D-glikozidas (BSSG); molekulinė masė 576,847 Da;
- $\beta$ -sitosterolis; molekulinė masė 414,707 Da;
- Stigmasterolis; molekulinė masė 412,691 Da;
- Kampesterolis; molekulinė masė 400,691 Da;
- Brasikasterolis; molekulinė masė 398,675 Da [41].

Skirtinguose aliejuose yra nustatomos įvairios fitosterolių koncentracijos. Jos gali kisti priklausomai nuo aliejų gavimo būdų bei gryninimo metodų. Bendras augalinių sterolių kiekis pateiktas 4 lentelėje.

**4 lentelė.** Bendras sterolių kiekis skirtinguose augaliniuose aliejuose (g/kg ekstrahuoto aliejaus) [42, 43]

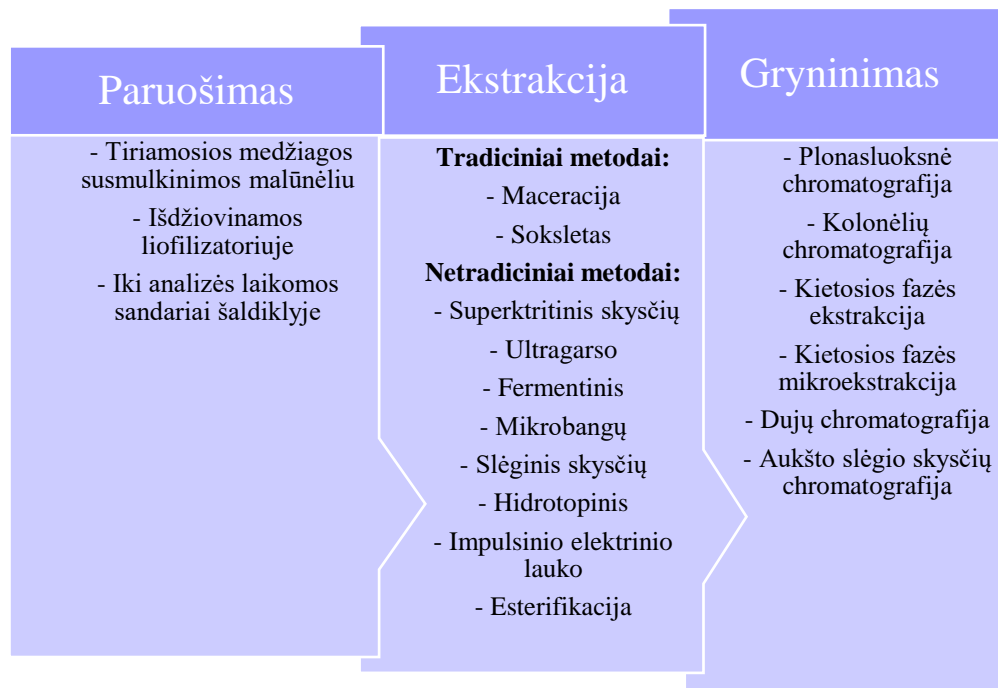
Neapdoroti augaliniai aliejai	Brasikasterolis	Kampesterolis	Stigmasterolis	$\beta$ -sitosterolis
Kukurūzų aliejus	0,00–0,01	1,01–1,29	0,43–0,98	4,26–9,89
Rapsų aliejus	0,55–0,85	1,54–3,10	0,02–0,04	2,28–4,02
Saulėgrąžų aliejus	Neaptikta	0,28–0,69	0,24–0,75	1,72–4,65
Sojos pupelių aliejus	0,00–0,01	0,52–0,76	0,44–0,76	1,08–2,31
Alyvuogių aliejus	Neaptikta	0,05–0,06	0,01–0,02	0,90–1,25
Rapsų aliejus	0,71–1,30	2,17–2,78	0,02–0,04	3,61–4,19
Linų sėmenų aliejus	3,2	0,63	0,16	0,73

Išanalizavus mokslinės literatūros duomenis, Lietuvoje tikslinga išsamiau tirti linų sėmenis ir fitosterolių panaudojimo galimybes funkcinių maisto produktų kūrime.

Siekiant pagerinti fitosterolių biologinę rezorbciją žmogaus organizme, tiriamos įvairios fitosterolių įkapsuliavimo galimybės. Fitosterolių nanodalelės buvo įmirkytos nanoporiniuose krakmolo aerogeliuose. Minėti junginiai terpiami į neriebius, žemo ar įprastinio riebalų kiekio maisto produktus, visų pirma jogurtus. Tyrimų rezultatai parodė, kad fitosterolių nanodalelių biologinis prieinamumas buvo didesnis nei neapdorotų fitosterolių. Tokios struktūros fitosterolių naudojimas leidžia gaminti neriebius maisto produktus ir užtikrinti efektyvesnę jų rezorbciją žmonių organizme [44].

#### 1.4. Aliejų išskyrimas ir fitosterolių gryninimas

Fitosteroliai – steroidų grupės policikliniai nesotieji alkoholiai, kurie sintetinami augaluose. Jie būna laisva forma arba įeina į esterių, glikozidų sudėtį. Gyvūninės kilmės produktuose sterolių, fitosterolių molekulės šoninė grandinė nesoti ir turi 9 arba 10 atomų. Fitosterolių nustatymui gali būti taikomos tokios analizės kryptys, kurios pateiktos 8 paveiksle.



8 pav. Fitosterolių glikozidų išgavimo eiga ir būdai [44]

#### 1.4.1. Tradiciniai ekstrakcijos metodai

Ekstrahavimas Soksletu buvo ir yra plačiai naudojamas išgauti iš įvairių medžiagų lipidus. Metodus taip pat gali būti naudojamas ir išskiriant fitosterolius. Fitosterolių ekstrakcijai dažniausiai yra naudojamas *n*-heksanas, petrolio eteris, etanolis, metileno chloridas. Fitosterolių ekstrakcija Soksletu yra ilgas procesas, reikalaujantis daug organinių tirpiklių, kurie yra pavojingi sveikatai ir aplinkai. Tradiciniai metodai, kaip ekstrahavimas Soksletu ir maceracija (ekstrahavimas kambario temperatūroje) yra dažniausiai naudojami fitosterolių ekstrahavimui [45].

Maceracija – tai paprastas ir nebrangus metodas fitosterolių ekstrakcijai vykdyti. Šį metodą galima taikyti mažomis ir didelėmis apimtimis. Susmulkintas augalas yra užpilamas tirpikliais, ir indas paliekamas kambario temperatūroje. Jeigu bandinys maišomas, galima padidinti ekstrakcijos greitį. Ekstrakcija yra baigta, kai pasiekama ištirpinto ekstrakto ir augalinės medžiagos pusiausvyra. Po ekstrakcijos skystis atskiriamas nuo likusios augalinės medžiagos, išspaudžiamas, kad liktų tik ekstraktas. Ektrakto skystis filtruojamas, norint pašalinti priemaišas. Centrifugavimas reikalingas, jeigu augalo medžiagos kiekis per mažas filtruoti. Norint pilnai įvykdyti ekstrakciją, gautas išspaudas dar kartą reikia apdoroti šviežiais tirpikliais. Maceracija daug laiko reikalaujantis metodas, kurio trukmė gali būti nuo kelių valandų iki kelių savaičių. Metodus yra nepakankamai efektyvus išskiriant mažai tirpius junginius kambario temperatūroje [46].

Dažniausiai naudojamas bendrųjų fitosterolių nustatymo metodas yra šarminė hidrolizė tiesiogiai iš medžiagos mėginio arba lipidų, kurie buvo ekstrahuoti nepoliniais tirpikliais. Apdorojimas šarmu atpalaiduoja fitosterolius iš jų esterų, o laisvieji fitosteroliai gali būti ekstrahuojami kaip neapmuilinta medžiagos dalis. Tačiau šarminė hidrolizė nehidrolizuoja sterilo glikozidų ir acilintų sterilo glikozidų glikozidinių ryšių, todėl dažnai tam tikruose mėginiuose yra neįvertinamas bendras fitosterolių kiekis. Sterilo glikozidai gali būti hidrolizuojami fermentais arba vykstant rūgštinei hidrolizei. Šiuo metu tinkamiausias metodas yra rūgštinė hidrolizė prieš apmuilinimą [47].

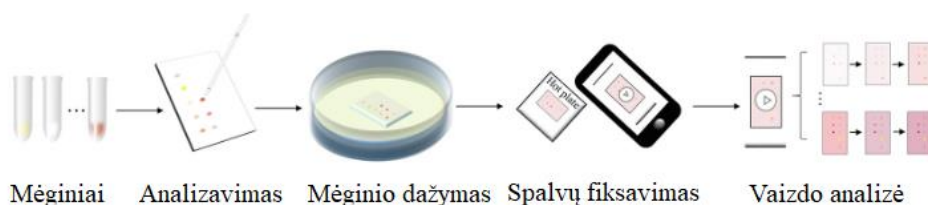
Rūgštinė hidrolizė ir šarminis muilinimas su alkoholiu naudojamas nustatyti fitosteroliams iš grūdų. Paminėti abu metodai užtikrina geresnį fitosterolių išskyrimą nei naudojant vien tik šarminį muilinimą. Muilinimas tiesiogiai gali būti naudojamas nustatant fitosterolius iš skirtingų maisto produktų. Vien tik muilinimas negali hidrolizuoti acetilinių jungčių tarp sterolių ir angliavandenių nes tokiu būdu negalima nustatyti sterilglikozidų koncentracijos. Toks muilinimas yra labai imlus laiko atžvilgiu. Priešingai rūgštinė hidrolizė negali būti naudojama nustatyti 7-fitosterolius, nes jie suskyla arba izomeruojasi po labai trumpos hidrolizės [48].

#### 1.4.2. Superkritinė skysčių ekstrakcija

Didžiausias aliejų ir fitosterolių kiekis gaunamas naudojant superkritinį anglies dioksidą su tirpikliu. Kiekvienas ekstrahavimo metodas turi būti taikomas specifinei žaliavai, pvz. ekstrahuojant sterolius iš kukurūzų ląstelienos, naudojamas etanolis. Ekstrahuoti fitosteroliai yra atrenkami pagal formas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  sitosteroliai, sitostanolis, stigmasterolis, stigmastanolis, kampesterolis, spinasterolis, fitosterinas, esteriai, fitostanolio esteriai [49].

#### 1.4.3. Plonasluoksnė chromatografija

Po muilinimo proceso medžiaga padalinama į subfrakcijas ant silika gelio plonasluoksnių plokštelių, naudojant vieno matmens plonasluoksnę chromatografiją ir tirpiklį, kuris yra sudarytas iš heksano / dietileterio. Neapmuilinta medžiaga, kurioje yra 1 % veikliosios medžiagos, naudojama nustatant 5-*a*-cholestanolio ir lanosterolio junginius, kurie talpinami ant silika gelio plokštelių 3 cm juostomis. Ant plokštelių užpurškama 2', 7'-dichlorfluoresceino ir vertinimas ultravioletinių spindulių šviesoje. Naudojant kompiuterines technologijas galima kiekybiškai išgauti vertingą informaciją apie veikliųjų medžiagų kiekį bei struktūrą. Šio metodo pagalba galima efektyviau nustatyti bioaktyvias medžiagas ir natūralius šaltinius [50].



9 pav. Plonasluoksnės chromatografijos ir vaizdo analizės sąveika nustatant fitosterolius [51]

Šis klasifikavimo metodas yra pagrįstas duomenimis, kurie gaunami iš spalvų, kurios susidaro plonasluoksnėse plokštelėse (žr. 9 pav.). Metodas įgalina išskirti vienuolikos klasių 36 veikliąsias medžiagas, įskaitant polifenolius, flavanoidus, fitosterolius, saponinus ir sacharidus pagal spalvos ypatybes [51].

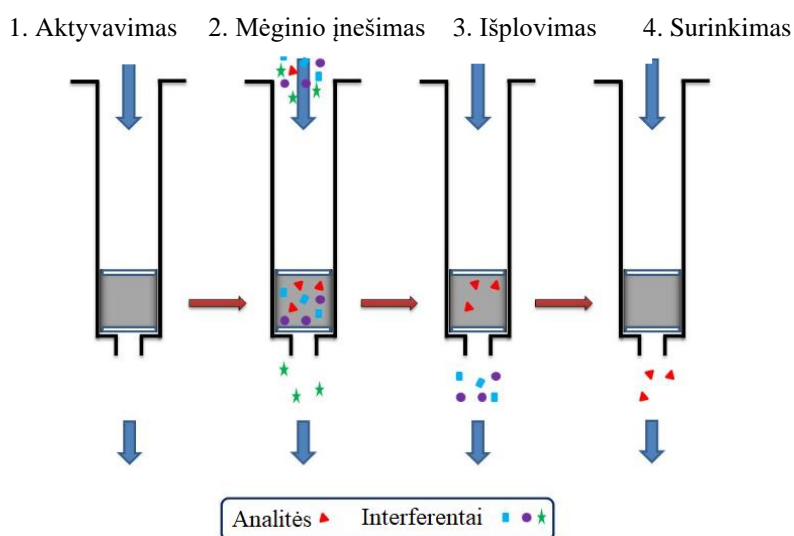
#### 1.4.4. Kolonėlių chromatografija

Tai vienas iš chromatografijos metodų, siekiant atskirti vieną cheminį junginį iš junginių gausos. Šis metodas leidžia atskirti medžiagas, remiantis skirtinga junginių absorbcija. Junginiai juda per kolonėlę skirtingais greičiais, o tai leidžia juos atskirti į frakcijas. Šis metodas yra plačiai taikomas, nes daugelis skirtingų absorbentų (normali, atvirkštinė ir kitos fazės) gali būti naudojami su įvairiais tirpikliais. Ši technika gali būti taikoma norint nustatyti veikliąsias medžiagas, kurių junginiuose yra nuo  $\mu\text{m}$  iki kg. Kolonėlių chromatografija gali būti atliekama naudojant tirpiklio judėjimą

gravitacijos būdu arba suslėgtas dujas. Tokiu būdu tirpiklis stumiamas per kolonėlę [52]. Francavilla et al., [53] nurodo, kad bendras sterolių kiekis iš nemuilintos medžiagos buvo išgrynintas naudojant greitąją skysčių chromatografiją. Kolonėlės ilgis 70 cm, skersmuo 2 cm, kuri buvo su aktyvuotu silika geliu (0,04–0,063 mm; 230/400 ASTM, „Carlo Erba Reagents“), kolonėlė buvo išplauta su heksanu: etilo acetatas 8:2 ir neapmuilinta stacionari fazė sudarė 2 %, slėgis nustatytas 2 barai su atitinkamu 4 mm/min išplovimo srautu.

#### 1.4.5. Kietos fazės ekstrakcija

Šis metodas yra naudojamas atskirti laisvuosius ir esterintus sterolius nuo sterilglikozidų. Analizuojant pavyzdžius, pirmiausiai nustatomas bendras lipidų kiekis įprastiniais metodais. Tinkamas ekstraktų kiekis, skirtas analizei, 10–50 ml ištirpinamas naudojant 1 ml chloroformo ir išdžiovintas azoto aplinkoje. Aliejaus pagrindu gautas mėginys analizuojamas tiesiogiai kietos fazės ekstrakcija (žr. 10 pav.) [54].



10 pav. Kietos fazės ekstrakcija [55]

Kietosios fazės ekstrahavimo metodas gali būti derinamas su mikroekstrakcija pagrįsta giluminiu eutektinio tirpiklio sinteze *in situ*. Šis metodas yra naudojamas ekstrahuoti fitosterolius iš aliejaus mėginių. Tai yra pakankamai tikslus metodas, nes galima aptikti ir kiekybiškai įvertinti junginius, kurių koncentracija yra 0,52–5,6  $\mu\text{g/ml}^{-1}$  [56].

#### 1.4.6. Kietos fazės mikroekstrakcija

Kietosios fazės ekstrahavimas apima skystą (polimeras) arba kietą (sorbentas) fazes. Šiuo metodu galima analizuoti įvairius lakiuosius arba nelakiuosius junginius, kurie gali būti dujų ar skysčio fazėje. Šis metodas gali būti naudojamas ekstrahuoti sterolius iš įvairių aliejų. Bioaktyvūs junginiai aliejuose yra ekstrahuojami kietos fazės mikroekstrahavimo būdu. Tuo tikslu 65  $\mu\text{m}$  „StableFlex“ pluoštas sudarytas iš polidimetilsiloksano / divinilbenzeno buvo tiesiai panardintas į 6 ml aliejaus. Ši medžiaga pasirinkta todėl, kas iš aliejų galima išskirti didelį smulkių komponentų spektrą, gaunant didžiausią jų išėigą. Ekstrahavimo išėiga priklauso nuo ekstrakcijos laiko, kurios trukmė gali būti: 15; 30; 45 ir 90 minučių. Aliejus, paimtas iš pluošto, yra tiesiogiai įpurškiamas į dujų chromatografijos analizatorių [42].

## 1.5. Fitosterolių panaudojimas maisto produktų gamyboje

Maisto produktai gali būti praturtinti specialiomis sudedamosiomis dalimis, turinčiomis teigiamą fiziologinį poveikį. Visi teiginiai apie produktų maistinę vertę ar sveikatingumą turi būti deklaruojami atsižvelgiant į ES NR. 432/2012 direktyvos reikalavimus [9]. Galimos funkcinio maisto kūrimo kryptys: 1 – natūralus maistas; 2 – maistas, į kurį buvo įdėta sudedamoji dalis; 3 – maistas, iš kurio pašalintas komponentas; 4 – maistas, kuriame buvo vienas ar keli modifikuoti komponentai; 5 – maistas, kurio biologinis prieinamumas buvo modifikuotas [57]. Funkcinio maisto kūrimui naudojami priedai, kurie pateikti 11 paveiksle.



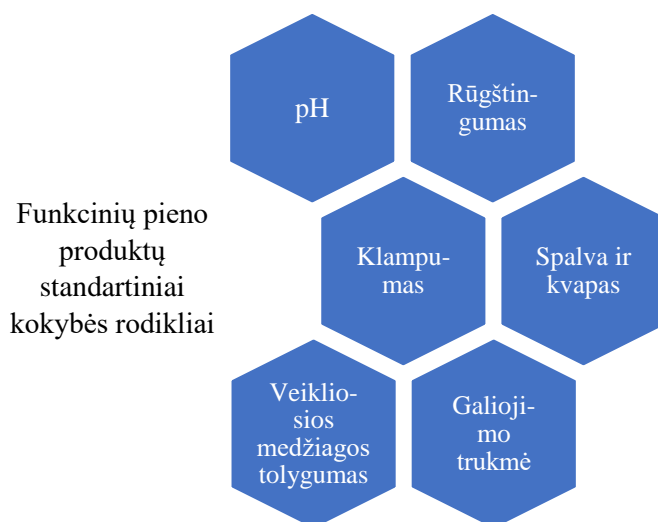
11 pav. Funkcinio maisto komponentai

Jogurtas – geriausiai pasaulyje žinomas ir dažniausiai vartojamas fermentuotas produktas. Tai tradicinis fermentuotas pieno produktas, kuris ilgu laikotarpiu buvo pagrindinis maistas Skandinavijos, Artimųjų rytų, Pietryčių Azijos gyventojų mityboje. Tačiau dabartiniu metu jogurtų suvartojimo kiekiai daugelyje pasaulio šalių yra skirtingi. Pvz., mažiausias suvartojimas yra Kinijoje. Jogurtą pagal fizines savybes galima skirstyti į skystą, tirštą, koncentruotą, užšaldytą, išdžiovintą milteline forma ir geriamąjį. [58].

Dažniausiai funkcionalieji maisto produktai yra kuriami pieno arba pieno šalutinių gamybos produktų pagrindu. Pienas laikomas svarbiu kalcio, riebalų ir baltymų šaltiniu. Jis yra koloidinė sistema, kurią sudaro riebalų globulės, laktozė, vitaminai, makro ir mikroelementai. Pieno riebalai sudaryti iš neutralių gliceridų, laisvųjų riebalų rūgščių, fosfolipidų, cerebrozidų, gangliozidų, cholesterolio ir cholesterolio esterų, karotinoidų bei vitaminų. Karvių piene yra randama apie 400 skirtingų riebalų rūgščių [59].

Pieno produktuose yra peptidų, oligosacharidų, fermentų, vitaminų, mineralų, pigmentinių medžiagų. Šie komponentai yra naudojami kaip funkcinės sudedamosios dalys kuriant funkcinis ir maisto produktus, kurie turi teigiamą poveikį žmonių sveikatingumui. Bioaktyvios pieno dalys yra klasifikuojamos į priešpienį, glikomakropeptidus ar kazeinomakropeptidus, laktoferiną, laktoperoksidazę, kazeino ir išrūgų baltymų hidrolizatą, mineralus,  $\alpha$ -laktoalbuminą [58]. Naujausios maisto produktų apdorojimo technologijos remiasi ne tik aukštos temperatūros panaudojimu, bet ir generuojant vidinės energijos transmisiją, pvz. maisto produktų varžos susiejimas su impulsiniais elektriniais laukais, aukštu hidrostatišku slėgiu, kurie keičia jų juslines, mitybines ir funkcinės charakteristikas [60].

Pieno produktai gali būti praturtinami prebiotikais, probiotikais, maistinėmis skaidulomis, fitosteroliais, mononesočiosiomis ir polinesočiosiomis riebalų rūgštimis, baltymais, mineralais ir vitaminais. Norint pasiekti optimalią galutinio produkto kokybę funkciniai pieno produktai apdorojami tokiais būdais: homogenizacija, terminis apdorojimas, rūgštinimas, fermentinis apdorojimas, stabilizavimas. Juose gali būti sumažintas cukraus arba riebalų kiekis, pakeista riebalų rūgščių arba baltymų sudėtis [58]. Funkcinių pieno produktų kokybiniai rodikliai pateikti 12 paveiksle.

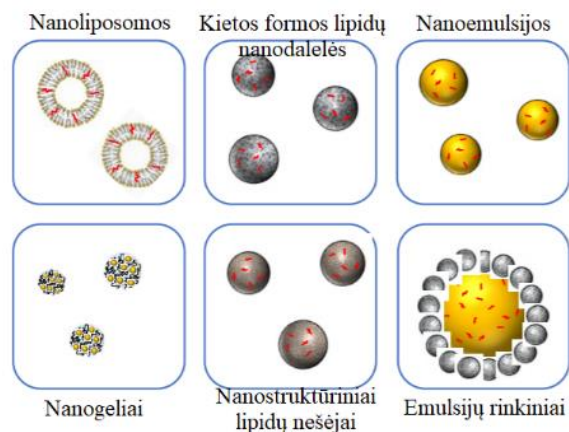


**12 pav.** Funkcinių pieno produktų rodikliai

Laisvieji fitosteroliai plačiai naudojami įvairiose maisto pramonės šakose. Naudojant nanostruktūrinius nešėjus su laisvaisiais fitosteroliais bei įprastiniais riebalais ir aliejais, sukurti junginiai, kurie savo savybėmis gali būti naudojami maistui praturtinti, gaminant užtepėles, margarina, gėrimus bei jogurtus. Lipidų matricos ir nanostuktūriniai lipidų nešėjai buvo gaminami, naudojant alyvuogių, saulėgrąžų, rapsų ir beržų aliejus, apdorojant aukšto slėgio homogenizavimo būdu [62].

Fitosterolių naudojimas maisto pramonėje taikomas įvairiais aspektais Kamgang'as et al., [63] įvertino iš išrūgų pagaminto sūrio „Rikota“ gamybos proceso tinkamumą, jį praturtinant fitosteroliais. Tyrimai parodė, kad fitosteroliai pasižymėjo geru stabilumu, tolygiu pasiskirstymu ir išlaikė bioaktyvumą per visą sūrio galiojimo laikotarpį.

Mikrokapsuliavimas – tai procesas, kurio metu mikrodalelės arba lašeliai apgaubiami danga arba talpinant į vienalytę ar nevienalytę matricą siekiant, išsaugoti naudingąsias junginių savybes. Toks procesas užtikrina aktyviųjų junginių geresnį pasiskirstymą maisto produktuose ir efektyvesnį įsisavinamumą žmogaus organizme. Mikrokapsuliavimas yra svarbus išsaugojant fitosterolių stabilumą bei naudingąsias savybes, nes jie labai greitai oksiduoja. Pastaruoju metu vykdoma daug tyrimų, siekiant naudoti mikrokapsuliuotus fitosterolius funkciniam maisto produktams gaminti [64]. Naudojami įvairios formos lipidai, kurie pagerina maisto produktų maistinę vertę, technologines savybes bei biologiškai aktyvių medžiagų įsisavinamumą žmonių organizme (žr. 13 pav.).



13 pav. Valgomų nanodalelių tipai [65]

Gerinant maisto produktų kokybinius rodiklius, naudojami fitosteroliai,  $\beta$ -gliukanai ir probiotikai. Ningtyas et al., [66] tyrė fitosterolių,  $\beta$ -gliukanų ir probiotiko *L. rhamnosus* (kapsuliuota ir nekapsuliuota forma) įtaką lakiųjų junginių koncentracijai sumažinto riebumo grietinėlės sūryje. Tyrimo rezultatai parodė, kad pagrindiniai lakieji komponentai yra riebalų rūgštys. Daugiau nei 50 % visų nustatytų junginių sudaro oktano ir heksano rūgštys. Tyrimai parodė, kad naudojamas įkapsuliuotos ir nekapsuliuotos *L. rhamnosus* formos esminės įtakos skonio junginiams neturėjo. Grietinėlės sūryje, kuris buvo praturtintas fitosteroliais dominavo rūgštiniai junginiai, visų pirma aldehidai ir ketonai.

Kuriant funkcinius maisto produktus, dažniausiai naudojama keletas komponentų, kurie gali mažinti cholesterolio kiekį kraujyje ir gerinti bendrą širdies ir kraujagyslių veiklą [66].

Kuriant funkcinius gėrimus pieno pagrindu gali būti naudojamos tokios sudėtinės dalys: pienas 60 %, cukrus – 4,4 %, kavos milteliai – 0,6 %, grietinėlė – 0,8 %, natrio vandenilio karbonatas – 0,1 %, kvapiosios medžiagos – 0,08 %, skystas priedas, kuriame yra fitosteroliai – 1 % ir išgrynintas vanduo – 33,42 % [67].

Fitosteroliai gali būti naudojami ruošiant sportininkams skirtus funkcinius gėrimus. Pirmiausiai buvo sukurta ir išbandyta tokia priedo sudėtis, kurią sudaro: fitosterolių esteriai – 33,3 %, oktenilo sukcinato modifikuotas krakmolai – 33,3 %, citrinų rūgštis – 0,1 %, nevirškinamas dekstrinas – 33,3 %. Šis priedas buvo dedamas į kitą funkcinį gėrimą, įterpimo kiekis 1 %, kitos sudedamosios dalys yra tokios: fruktozė – 5 %, citrinų rūgštis – 0,1 %, citrinų kvapiosios medžiagos – 0,1 %, natrio citratas – 0,05 %, vitaminas C – 0,02 %, vanduo – 93,725 % [68].

Žmonių sveikatos stiprinimui gali būti naudojami fitosteroliai, kurie kartu su linų sėmenų aliejumi, pieno riebalais, emulsikliais ir polidekstroze naudojami parengiant bazinę emulsiją [69]. Junginiai naudojami emulsijų gamybai pateikti 14 paveiksle. Riebaluose tirpūs vitaminai, karotinoidai, fitosteroliai, eteriniai aliejai ir polinesočiosios riebalų rūgštys yra netirpūs vandenyje ir jų naudojimas kuriant maisto produktus yra problematiškas. Minėti junginiai yra mažai tirpūs, todėl blogėja rezorbcija ląstelėse. Cheminių junginių dydžio sumažinimas, ypač iki nanodalelių, padidina šių junginių tirpumą ir rezorbcijos greitį dėl didesnio junginių paviršiaus ploto. Taigi nanotechnologijų naudojimas gali užtikrinti minėtų junginių vienodesnę dispersiją vandenyje. Nanodydžio maisto dažikliai pasižymi intensyvesnėmis spalvomis bei geresniu homogeniškumu. Pigmentuojant maisto produktus, reikia atsižvelgti į maisto dažiklių tarpusavio sąveiką [70, 71].

Triacilgliceroliai	Dietiniai lipidai	Terpeno aliejai
Riebaluose tirpūs antioksidantai	Fitosteroliai	Karotinoidai
Vitaminai	Riebaluose tirpūs dažikliai	Cukrozės esteriai

**14 pav.** Junginiai naudojami emulsijoms gaminti [72]

Šis išradimas yra susijęs su labai stabilios vandeningės fitosterolių, fitostanolių ir jų darinių, leidžiančių naudoti platų emulsiklių asortimentą, kuriuose yra skirtingos fitosterolių koncentracijos. Norint paruošti labai stabilias vandeninges fitosterolių dispersijas, fitosteroliai, vandeningėje terpėje naudojant vieną ar daugiau emulsiklių, sumaišomi ir disperguojami. Temperatūra turi būti aukštesnė nei fitosterolių lydymosi temperatūra norint, gauti vandeningę fitosterolių emulsiją. Po to emulsija yra atvėsinama. Gaunamas labai stabilus vandeningis tirpalas su disperguotomis fitosterolių dalelėmis. Toks būdas leidžia parengti vandeningę fitosterolių emulsiją, kuri pasižymi dideliu stabilumu. Vidutinis dalelių dydis mažesnis nei 1000 nm [73].

Fitosteroliai yra naudojami ir kuriant alternatyvas esamiems funkciniais jogurto produktams. Pvz., gali būti sukurtas į jogurtą panašus produktas, kurio pagrindą sudaro fermentuoti kukurūzai praturtinti karotinoidais ir fitosteroliais. Fitosteroliai mažina karotinoidų absorbciją, todėl tokio pobūdžio maisto produktuose būtina padidinti šios veikliosios medžiagos kiekį. Norint gauti geresnes produkto maistines savybes, vykdomas fermentacijos procesas naudojant mikroorganizmų kamienus *L. plantarum*, *L. casei*. Tyrimų rezultatai rodo, kad į fermentuoto kukurūzo produktą, primenantį jogurtą terpiami fitosteroliai bei karotinoidai gali būti veiksminga priemonė mažinant cholesterolio kiekį žmonių kraujyje [74].

Fitosterolių panaudojimą maisto pramonėje apsunkina sudėtingi jų ekstrakcijos metodai bei kaštai, todėl ieškoma alternatyvių, pigesnių, natūralių antioksidantų, kuriuos galima naudoti maisto pramonėje. Ekstraktai, gauti iš *A.bisporus*, buvo biologiškai aktyvesni palyginus su fitosteroliais, jų kaina mažesnė ir prieinamesnė, o panaudojimo galimybės – platesnės. Mikosterolių efektyvumas savo veikimu panašus arba didesnis palyginus su fitosteroliais, ir jų panaudojimas pasiteisino naudojant jogurtų gamyboje, ypačingai išsaugojant baltymų ir lipidų frakcijų stabilumą [75].

Tyrimų metu buvo tiriamos jogurtų oksidacinės savybės, naudojant fitosterolių ekstraktą ir ergosterolius. Nustatyta, kad ergosteroliai pasižymėjo panašiomis antioksidacinėmis savybėmis kaip ir fitosteroliai. Ergosterolių citotoksiškumas prieš naviko ląsteles buvo didesnis lyginant su fitosteroliais. Jie efektyviai apsaugojo jogurtą nuo oksidacijos procesų ir prailgino produktų galiojimo laiką. Visų jogurtų mėginių mitybinė vertė buvo identiška [76]. Maisto produktų praturtinimas fitosteroliais gali žymiai sumažinti mažo tankio lipoproteinų cholesterolio koncentraciją žmonių kraujyje, kuris yra pagrindinis širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnys. Tačiau pasaulinė funkcinio maisto rinka kiekvienais metais didėja labai intensyviai ir ieškoma įvairių alternatyvių produktų funkcionaliajam maistui kurti. Viena iš tokių galimybių – ergosteroliais praturtintų funkcionaliųjų maisto produktų kūrimas. Ergosterolių nauda žmogaus

organizmui pateikta 15 paveiksle. Naujų bioaktyvių mikosterolių išskyrimas iš dar netirtų grybų rūšių yra nauja ir perspektyvi mokslo kryptis, kurioje turi būti vertinamas produktų panaudojimo efektyvumas, junginių stabilumas, maistinė vertė ir sensorinės savybės [76].



**15 pav.** Ergosterolių poveikiai žmogaus organizmui [76]

Gaminant jogurtą buvo terpiamas fitosterolių mišinys, kurį sudarė  $\beta$ -sitosterolis (80 %), stigmasterolis (12 %), kampesterolis (8 %). Bendras fitosterolių kiekis jogurte sudarė 1,6 %. Šis jogurtas buvo papildytas 6 % laktuliozės ir papildomai įterpti *S. thermophilus* ir *L.bulgaricus* mikroorganizmų kamienai. Jogurto praturtinimas fitosteroliais ir laktulioze pagerino produkto kokybę, visų pirma konsistenciją bei sumažino rūgštingumą. Fitosterolių ar laktuliozės panaudojimas reikšmingos įtakos bendram ląstelių skaičiui neturėjo. Laikant jogurtą iki 28 dienų, fitosteroliai turėjo įtakos kvapui, išrūgų formavimuisi, baltai spalvai, kremiškumui, saldumui, konsistencijai. Fitosteroliai didino jogurto kartumą, rūgštingumą, bet mažino acetaldehido (bespalvis aštraus kvapo skystis, gerai tirpsta vandenyje) kiekį laikymo metu [77].

Jogurto papildymas fitosteroliais reikšmingai padidino produkto priimtumą, tačiau mėginių priimtumo pagėrėjimas buvo susijęs su riebalų kiekiu jogurte. Fitosterolių kiekis jogurte sudarė (1,8 g/100 g), o riebalų (10 g/100g) [78].

Apibendrinus mokslinės literatūros duomenis galima teigti, kad fitosteroliai gali būti naudojami įvairiuose pieno produktuose. Fitosteroliai sustiprina pieno produktų, įskaitant ir jogurtų, antioksidacines savybes [79]. Maisto pramonėje galima naudoti ir sintetinius antioksidantus, tačiau, kaip nurodo Abdel-Hameed'as et al., [80], sintetiniai antioksidantai gali sukelti žmonėms tam tikrą toksinį ir kancerogeninį poveikį. Todėl pastovus natūralių antioksidantų naudojimas jogurte arba kituose pieno produktuose padeda sumažinti sergamumą onkologinėmis, širdies ir kraujagyslių ligomis. Tačiau, naudojant fitosterolius jogurtuose, reikia atsižvelgti į jų įterpimo kiekį, kadangi gali neigiamai pakisti produkto juslinės savybės, ypač kartumas. Be to vartojant jogurtą praturtiną dideliais fitosterolių kiekiais atsiranda tikimybė sirgti įvairioms kepenų ligoms, todėl jis nerekomenduotinas nėščioms moterims.

## 1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Fitosteroliai dažniausiai yra sutinkami augaliniuose aliejuose. Didžiausiomis koncentracijomis randami  $\beta$ -sitosterolis, stigmasterolis, brasikasterolis ir kampesterolis. Fitosteroliai pasižymi priešuždegiminiu, priešvėžiniu, antiproliferaciniu, antiskleroziniu, cholesterolį ir oksidacinius procesus mažinančiais poveikiais. Tačiau didesni nei leidžiama fitosterolių kiekiai gali sukelti pykinimą, maisto medžiagų nevirškinimą, vidurių užkietėjimą ar viduriavimą. Nėščioms ir maitinančioms moterims fitosterolių vartoti nerekomenduojama. Šių junginių išskyrimui ir

gryninimui naudojami tokie metodai: kietos fazės ekstrakcija, plonasluoksnė, kolonėlių chromatografija, kietos fazės mikroekstrakcija, dujų ir aukšto slėgio skysčių chromatografija. Fitosterolių išskyrimo metodai yra brangūs ir sudėtingi. Vykdomi tyrimai parodė, kad mikosterolių poveikis žmogaus organizmui pasižymi panašiomis savybėmis kaip ir fitosterolių. Jie gali būti naudojami užtepėlių, jogurtų, pieno gėrimų kūrime. Siekiant pagerinti funkcionaliųjų maisto produktų technologines ir maistines savybes, yra taikomos šiuolaikinės technologijos, kaip įkapsuliavimas, naudojant nanodaleles, nanoemulsijų kūrimas. Šie metodai padeda sukurti homogeniškus maisto produktus, padidinti fitosterolių įsisavinimą žmogaus organizme. Naujausios maisto produktų apdorojimo technologijos remiasi ne tik aukštos temperatūros panaudojimu, bet ir generuojant vidinę energijos transmisiją, pvz., maisto produktų varžos susiejimas su impulsiniais elektriniais laukais, aukštu hidrostatišku slėgiu, kurie keičia jų juslines, mitybines ir funkcines charakteristikas.

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

### 2.1. Medžiagos

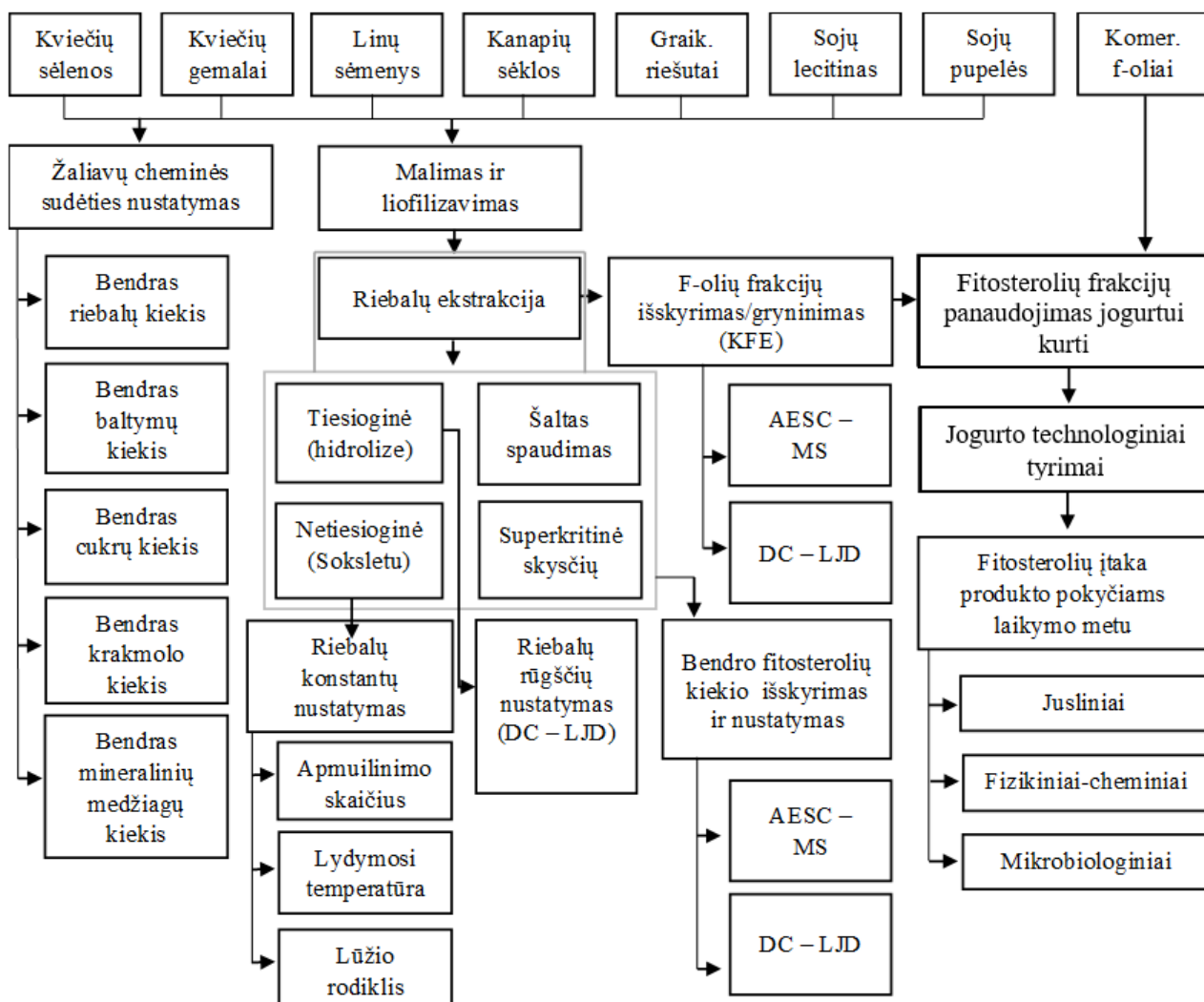
Fitosterolių glikozidų nustatymui naudotos 7–ios augalinės kilmės žaliavos: kviečių sėlenos, kviečių gemalai, linų sėmenys, kanapių sėklos, graikiniai riešutai, sojų pupelės bei sojų lecitinas. Visos tiriamosios medžiagos sumaltos, išdžiovintos liofilizatoriuje ir iki analizės laikytos plastikiniuose indeliuose šaldiklyje  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Medžiagos, kurios buvo naudotos tyrime, pateiktos 5 lentelėje.

**5 lentelė.** Tyrime naudotos medžiagos

Nr.	Žaliavos/tirpiklio pavadinimas	Gamintojas	Miestas, šalis
1.	Kviečių sėlenos	„Malsena plus“	Vievis, Lietuva
2.	Kviečių gemalai	„Malsena plus“	Vievis, Lietuva
3.	Linų sėmenys	„Pajuva“	Panevėžys, Lietuva
4.	Kanapių sėklos	„Pajuva“	Panevėžys, Lietuva
5.	Graikiniai riešutai	„Arimex“	Ukraina
6.	Sojų pupelės	„Infinity foods“	Braitonas, Jungtinė Karalystė
7.	Sojų lecitinas	„Nutriops“	Mursija, Ispanija
8.	<i>n</i> -heksanas (98,5 %)	„LAB-SCAN“	Glivicė, Lenkija
9.	Etanolis (99,3 %)	„Stumbras“	Kaunas, Lietuva
10.	Kalio hidroksidas	„REACHEM s.r.o“	Bratislava, Slovakija
11.	Izopropanolis (99,8 %)	„Sigma-Aldrich“	Sent Luisas, Misūris, JAV
12.	Stigmasterolis	„Sigma-Aldrich“	Sent Luisas, Misūris, JAV
13.	Kampesterolis	„Sigma-Aldrich“	Sent Luisas, Misūris, JAV
14.	Brasikasterolis	„Sigma-Aldrich“	Sent Luisas, Misūris, JAV
15.	$\beta$ -sitosterolis	„Sigma-Aldrich“	Sent Luisas, Misūris, JAV
16.	Etilo eterio	„Chempur“	Pekarai, Lenkija
17.	Etilo acetatas	„Chempur“	Pekarai, Lenkija
18.	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	„REACHEM s.r.o“	Bratislava, Slovakija
19.	PSA kasetė	„Cromabond“	Düren, Vokietija
20.	C18 kasetė	„Cromabond“	Düren, Vokietija
21.	Pienas	„Pieno žvaigždės“	Kaunas, Lietuva
22.	Išrūgų baltymų izoliatas	„Sveika energija“	Vilnius, Lietuva
23.	Mėlynių džemas	„Kėdainių konservų fabrikas“	Kėdainiai, Lietuva
24.	Fitosterolių milteliai	„Wellgreen“	Šanchajus, Kinija
25.	Burokėlių milteliai	„Ūstukių malūnas“	Pasvalys, Lietuva
26.	Jogurto bakterijos YF-L903	„Chr. Hansen A/S“	Hørsholmas, Danija
27.	Jogurto bakterijos YC-X11	„Chr. Hansen A/S“	Hørsholmas, Danija
28.	Plate count agar PCA agaras	„Liofilchem“	Roseto, Italija
39.	Natrio chloridas	-	-
30.	Distiliuotas vanduo	-	-

## 2.2. Tyrimo objektai

Tyrimo objektai buvo iš skirtingų augalinių žaliavų išskirti fitosteroliai. Jų išskyrimo ir tyrimo metodų schema pateikta 16 paveiksle.



16 pav. Tyrimų principinė schema

## 2.3. Tyrimų metodai

### 2.3.1. Žaliavų cheminės sudėties nustatymas

Tyrimo metu atlikta žaliavų cheminės sudėties analizė ir jose nustatyti baltymų, riebalų, mineralinių medžiagų, krakmolo ir cukraus kiekiai.

#### BALTYMŲ KIEKIS

Baltymų kiekis nustatytas pagal ISO standartą 20483:2013 [81]. 1 g mėginio supilta į kolbą, įdėta 15 g kalio sulfato, 0,3–0,4 g vario oksido, įpilta 25 ml sieros rūgšties ir sumaišyta. Kolba iš pradžių šildyta ant nestiprios ugnies, vėliau virinta dar dvi valandas ir palikta atvėsti. Į kolbą įpilta 25 ml sieros rūgšties, įlašinti keli lašai metilraudonojo indikatorius ir 100 ml natrio hidroksido tirpalo. Kolba kaitinta iki amoniako distiliavimo pabaigos. Titravimas atliktas naudojant 0,1 N natrio šarmą. Patvirtinimui, kad reagentai neturi azoto, atliktas bandymas naudojant 1 g sacharozės. Baltymų kiekis apskaičiuotas pagal formulę (2.1):

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}; \% \quad (2.1)$$

$V_0$  – NaOH tūris, sunaudotas tuščiajam bandymui, ml;  
 $V_1$  – NaOH tūris, sunaudotas ėminiui titruoti, ml;  
 $c$  – natrio hidroksido koncentracija, mol/l;  
 $m$  – mėginio svoris, g.

### RIEBALŲ KIEKIS

Riebalų kiekis nustatytas pagal modifikuotą ISO standartą 11085:2015 [82]. Mėginiai, priklausomai nuo žaliavos, 28–42 g, įdėti į ekstrahavimo tūtą. Tūta ekstrahuota heksanu šešias valandas. Heksanas kolboje nugarintas rotaciniu garintuvu, o likutis po azoto srove. Išeiga paskaičiuota pagal formulę (2.2):

$$\frac{(a-b) \times 100}{m}; \% \quad (2.2)$$

$a$  – kolbos svoris su mėginiu po ekstrakcijos, g;  
 $b$  – tuščios kolbos svoris, g;  
 $m$  – ekstrakcijai paimtas mėginio svoris, g.

### MINERALINIŲ MEDŽIAGŲ KIEKIS

Mineralinių medžiagų kiekis buvo nustatytas pagal ISO standartą 2171:2007 [83]. 5 g mėginio supilta tiglj. Tiglis kaitintas kol medžiaga suanglėja. Jis įdėtas į mufelinę krosnį, kurios temperatūra 550 °C. Medžiaga laikoma tokioje temperatūroje, kol virsta pelenais. Tiglis buvo padėtas į eksikatorių atvėsti ir pasvertas. Kaitinimas krosnyje kartotas 2 kartus siekiant užtikrinti, kad pelenų masė nekistų. Pelenų kiekis apskaičiuotas pagal formulę (2.3):

$$\frac{(m_2 - m) \times 100}{m_1 - m}; \% \quad (2.3)$$

$m$  – tiglio svoris, g;  
 $m_1$  – tiglio svoris su mėginiu, g;  
 $m_2$  – tiglio svoris su pelenais, g.

### KRAKMOLO IR CUKRAUS KIEKIS

Krakmolo kiekis nustatytas pagal ISO standartą 15914:2004 [84]. Pasverta ir įdėta 2,5 g sumalto mėginio į 100 ml kolbą, įpilta 50 ml vandenilio chlorido rūgšties tirpalo. Visa kolba panardinta į verdančio vandens vonią ir 3 minutes stipriai supurtyta. Po 15 min kolba išimta iš vonios, įpilta 30 ml šalto vandens ir atvėsinta iki 20 °C temperatūros. Įpilta 5 ml Carrez I tirpalo ir kratyta 30 s, 5 ml Carrez II tirpalo ir vėl kratyta 30 s. Skiesta vandeniu iki žymės, turinys sumaišytas ir filtruotas. 200 mm ilgio vamzdyje poliarimetru atliktas poliarizuotos šviesos plokštumos matavimas. Papildomai nustatytas medžiagų, tirpstančių 40 % etanolyje, poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo rodiklis. Krakmolo ir cukraus kiekiai mėginyje apskaičiuoti pagal formulę (2.4):

$$\frac{2\,000 (P - P')}{[\alpha]_D^{20}}; \% \quad (2.4)$$

$P$  – suminis poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, laipsniais;  
 $P'$  – 40 % etanolyje tirpių medžiagų tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimas, laipsniais;  
 $[\alpha]_D^{20}$  – krakmolo tirpalo poliarizuotos šviesos plokštumos sukimo vertė yra 184,0 °C.

### 2.3.2. Riebalų ekstrakcija

#### TIESIOGINIS METODAS

Tiesioginė riebalų ekstrakcija atlikta pagal modifikuotą Almeida et al., [26] metodiką. Mėginys pasvertas, supiltas į stiklinį mėgintuvėlį, sumaišytas su 10 ml etanolinio 3 % kalio hidroksido tirpalu ir įdėtas į 40 °C temperatūros termostatą 90 min. Kas 20 min. mėginiai buvo išimti ir gerai sumaišyti. Praėjus 90 min. visi mėginiai išimti iš termostato, sumaišyti ir atvėsinti. Įpilta 10 ml distiliuoto vandens ir 10 ml *n*-heksano. Įdėta 15 min. į centrifugą, kad mėginys išsisluoksniuotų ir heksano sluoksnis liktų viršuje. 8 ml viršutinio sluoksnio pernešta į kitą mėgintuvėlį ir mėginys išgarintas po azoto srove iki 1 ml.

#### SOKSLETO METODAS

Riebalų nustatymas yra pateiktas 2.3.1. skyriuje žaliavų cheminės sudėties tyrimai.

#### ŠALTO SPAUDIMO METODAS

Linų sėmenų šaltas spaudimas atliktas pagal modifikuotą Mridula D., et al. [85] metodiką, naudojant „TÄBYPRESS TYPE 20“ įrangą. Linų sėmenys buvo pašildytos 30 min. temperatūroje termostate „Binder“. Atliktas šaltas spaudimas ir gauto aliejaus išeiga apskaičiuota pagal pateiktą formulę (2.5):

$$\frac{a}{a_1} \times 100; \% \quad (2.5)$$

*a* – aliejaus kiekis, g;

*a*<sub>1</sub> – mėginio kiekis, g.

#### SUPERKRITINĖS SKYSČIŲ EKSTRAKCIJOS METODAS

Superkritinė CO<sub>2</sub> ekstrakcija iš linų sėmenų atlikta pagal modifikuotą Bendif'as et al., [86] metodiką su „STF-110“ („Supercritical fluids technologies“, Niujorkas, JAV) ekstraktoriumi. Ekstrakcijos parametrai buvo tokie: temperatūra – 62 °C, slėgis – 45 MPa, ekstrakcijos laikas 4 val. 25 g sumaltų linų sėmenų buvo įdėta į 50 cm<sup>3</sup> tūrio celę. CO<sub>2</sub> dujos leistos pastoviu 2 l/min. srautu, ekstrakcijos slėgis ir temperatūra nustatyti prieš pradėdant ekstrakciją. Pirmiausiai buvo atlikta statinė ekstrakcija, kuri truko 10 min., o tada 240 min. vykdyta dinaminė. Gautas aliejaus kiekis pasvertas ir apskaičiuota išeiga.

#### 2.3.2.1. Ekstrahuotų riebalų analizė

Aliejai gauti tiesioginiu ekstrakcijos būdu analizuoti nustatant apmuilinimo skaičių, lūžio rodiklį bei lydymosi temperatūrą, o netiesioginiu būdu (Soksletu) – riebalų rūgštis.

#### APMUILINIMO SKAIČIAUS

Apmuilinimo skaičius nustatytas pagal ISO standartą 3657:2013 [87]. Į 150–200 ml talpos konusinę kolbutę pasverta 1,5–2,5 g riebalų ir užpilta 25 ml 0,5 N alkoholiniu kalio hidroksido tirpalu. Kolba sujungta su grįžtamuju šaldytuvu ir kaitinta vandens vonioje valandą. Tirpalas, įpylus 0,5 ml 1 % fenolftaleino, titruotas 0,5 N druskos rūgšties tirpalu kol išnyksta rausvas atspalvis. Atliktas „tuščias“ bandymas. Apmuilinimo skaičius buvo apskaičiuotas naudojant šią formulę (2.6):

$$\frac{28,05 \times (V - V_1)}{c}; \text{ mg/g} \quad (2.6)$$

$V$  – 0,5 N HCl kiekis, sunaudotas tuščio bandinio titravimui, ml;  
 $V_1$  – 0,5 N HCl kiekis, sunaudotas tiriamo bandinio titravimui, ml;  
 $c$  – bandymui paimtų riebalų svoris, g;  
 28,05 – KOH kiekis, atitinkantis 1 ml 0,5 N HCl, mg.

### LŪŽIO RODIKLIS

Lūžio rodiklis nustatytas naudojant ISO standartą 6320:2017 [88]. Aliejaus lašas užlašintas ant refraktometro „akies“ ir nustatytas lūžio rodiklis.

### LYDYMOSI TEMPERATŪRA

Lydimosi temperatūra nustatyta, naudojant ISO standartą 6321:2002 [89]. Kapiliaras 1,4–1,5 mm užpildytas 5 g aliejaus, pritvirtintas prie termometro taip, kad termometro galas su gyvsidabriu ir kapiliaras būtų viename aukštyje. Mėginys užšaldytas -30 °C ir termometras su kapiliaru įmerktas į stiklinę su vandeniu ir ledais. Pradinis kilimo taškas – riebalų lydymosi temperatūra.

### RIEBALŲ RŪGŠČIŲ KONCENTRACIJA

Riebalų rūgščių koncentracija nustatyta pagal ISO 12966-1:2014; ISO 12966-2:2017; ISO 12966-4:2015 [90, 91, 92] standartus. Riebalų rūgščių profilio įvertinimui naudotas „HP 6980“ dujų chromatografas su automatine mėginių paėmimo sistema. Purkštuvai (100:1), temperatūra chromatografe – 220 °C, o liepsnos jonizacijos detektoriuje – 240 °C. Riebalų rūgščių išskyrimas gautas naudojant stacionarios fazės kapiliarų kolonėlę („SPTM 2560“, 100 m ilgio, 0,25 mm pločio, plėvelės storis 0,20 μm). Chromatografijos sąlygos: temperatūra kolonėlėje prasidėjo nuo 80 °C, laikyta 5 min, vėliau buvo didinta iki 240 °C, ekspozicijos trukmė 30 min. Helio dujų pašalinimas vykdytas 20 cm/s greičiu. Injekcijos tūris į DC-LJD 1 μl.

### **2.3.3. Fitosterolių frakcijų gryninimas ir išskyrimas**

#### FITOSTEROLIŲ GRYNINIMAS

Kietafazė ekstrakcija, naudojant „Cromabond PSA“ kasetę, vykdyta tokia seka pagal modifikuotą Xu et al., [93] metodiką:

- Kasetė aktyvinta naudojant 10,0 ml *n*-heksano, srauto greitis 2,0 ml/min;
- 1,0 g bevandenio natrio sulfato tirpalo patalpintas į kasetę;
- Į kasetę įpilta 50 mg maistinio aliejaus, kuris buvo ištirpintas 4,0 ml *n*-heksano;
- Trigliceridai nuplauti 5,0 ml *n*-heksano / etilo eterio mišiniu (92:8), srauto greitis 1,0 ml/min;
- Fitosteroliai išplauti 10,0 ml *n*-heksano / etilo acetato mišiniu (75:25), srauto greitis 1,5 ml/min;
- Mišinys, sudarytas iš fitosterolių ir *n*-heksano / etilo acetato, išgarintas po azoto srove iki 1 ml;
- Mėginys supiltas į buteliuką ir laikytas iki analizės šaldiklyje -18 °C temperatūroje;
- Analizuojamas pavyzdys įšvirkštas į DC-LJD arba AESC sistemą.

Kietafazė ekstrakcija, naudojant „Cromabond C18“ kasetę, buvo vykdoma tokia seka pagal modifikuotą Wang et al., [94] metodiką:

- Kasetė aktyvinta 10,0 ml *n*-heksano, srauto greitis 2,0 ml/min;

- Į kasetę įpilta 50 mg maistinio aliejaus, kuris buvo ištirpintas 5,0 ml *n*-heksano;
- Trigliceridai nuplauti 10,0 ml *n*-heksano / etilo eterio mišiniu (98:2) ir *n*-heksano / etilo acetato mišiniu (96:4), srauto greitis 1,0 ml/min;
- Fitosteroliai išplauti 10,0 ml *n*-heksano / etilo acetato mišiniu (5:95), srauto greitis 1,5 ml/min;
- Mišinys, sudarytas iš fitosterolių ir *n*-heksano / etilo acetato, išgarintas po azoto srove iki 1 ml;
- Mėginys supiltas į buteliuką ir laikytas iki analizės šaldiklyje -18 °C temperatūroje;
- Analizuojamas pavyzdys įšvirkštas į DC-LJD arba AESC sistemą.

#### STANDARTINIŲ TIRPALŲ PARUOŠIMAS

Brasikasterolio, kampesterolio, stigmasterolio,  $\beta$ -sitosterolio ir dihidrocholesterolio standartai buvo paruošti pagal modifikuotą Xu et al., [93] metodiką, tirpinant kiekvieno junginio žinomą kiekį izopropanolyje. Gautų tirpalų koncentracija buvo 1 mg/ml. Darbiniai tirpalai buvo paruošti laipsniškai skiedžiant pradinius tirpalus iki 0,0625 mg/ml. Paruošti tirpalai laikyti šaldytuve.

#### FITOSTEROLIŲ CHROMATOGRAFINĖ ANALIZĖ

Fitosterolių kiekybiniam įvertinimui naudotas modifikuotas Almeida et al., [26] metodas. Mėginiai tirti „HP 6890“ dujų chromatografu su automatine mėginių paėmimo sistema. Purkštuvus (50:1), temperatūra chromatografe – 250 °C, o liepsnos jonizacijos detektoriuje – 300 °C. Fitosterolių išskyrimas gautas naudojant stacionarios fazės kapiliarų kolonėlę (30 m ilgio, 0,25 mm pločio, plėvelės storis 0,25  $\mu$ m). Chromatografijos sąlygos: temperatūra kolonėlėje prasidėjo nuo 150 °C/min., vėliau didėjo iki 300 °C po 10 °C/min., helio dujų pašalinimas vyko 1ml/min. greičiu, liepsnos jonizacijos detektorius papildytas azoto dujomis ir vandeniliu 30 ml/min., sintetinio oro srautas 300 ml/min., injektoriaus temperatūra 250 °C, injekcijos tūris 1  $\mu$ l. Fitosteroliai nustatyti pagal smailių pikus lyginant su standartais. Fitosterolių kiekis įvertintas, naudojant vidinį standartą – dihidrocholesterolį.

Fitosterolių kiekybinė analizė buvo atlikta modifikuojant Tamkutės et al., [95] metodą, naudojant „Waters AquityUPLC“, susidedančią iš tirpiklio tiekimo sistemos, automatinio mėginių ėmimo ir kolonėlės („Waters“, Milford, MA). Junginiams atskirti buvo naudota „Aquity BEH C18“ kolonėlė (50  $\times$  2,1 mm, 1,7  $\mu$ m; „Waters“, Milford, MA). Fitosterolių chromatografinis išskirstymas atliktas naudojant tokias sąlygas: 30 % A (0,1 % skruzdžių rūgšties vandenyje) ir 70 % B (0,1 % skruzdžių rūgšties acetonitrile), tada pakeičiant į 100 % B per 1 min. 100 % B laikant 5 min. Po to gradientas buvo grąžintas į pradines sąlygas per 0,5 min. Eliuentų srauto greitis buvo 0,4 ml/min., kolonėlės temperatūra 30 °C. Masės spektrai buvo nustatyti „MAXIS 4 G Q-TOF“ masių spektrometru („Bruker Daltonics“, Vokietija) naudojant cheminę jonizaciją atmosferos slėgyje. Fitosteroliai kiekybiškai buvo įvertinti pagal atitinkamų masių chromatogramų smailių plotus, sudarytus pagal kalibracines kreives.

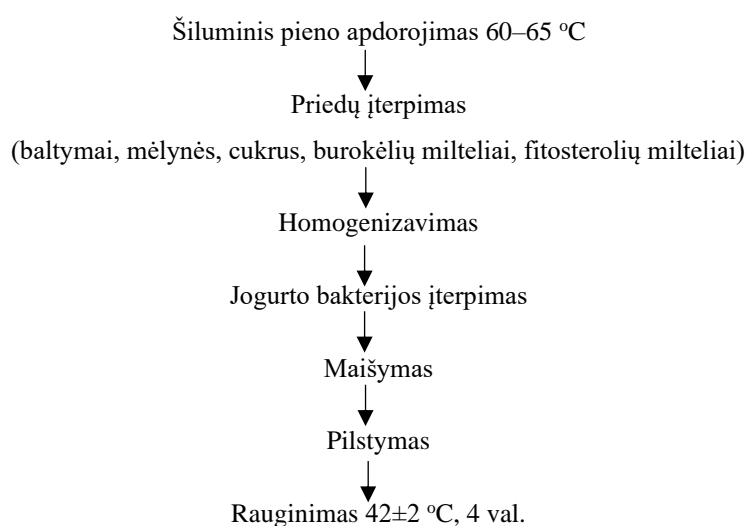
#### **2.3.4. Jogurto praturtinto fitosteroliais gamyba**

Jogurtų gamyba buvo vykdyta naudojant skirtingas fitosterolių koncentracijas (100 g produkto), kurios sudarė 0,8 g; 1,2 g; 1,6 g bei skirtingus termofilinių jogurto bakterijų kultūrų mišinius: YF-L903 ir YC-X11. Jogurtų receptūros pateiktos 6 lentelėje.

**6 lentelė.** Jogurtų praturtintų fitosteroliais receptūros

Jogurtų sudėtis, %						
Žaliavos	Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.4	Nr.5	Nr.6
Pienas	69,25	68,85	68,45	69,25	68,85	68,45
Riebalai	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Baltymai	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Išrūgų baltymų izoliatas	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Mėlynės	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
Cukrus	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Burokėlių milteliai	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fitosterolių milteliai	0,80	1,20	1,60	0,80	1,20	1,60
Jogurto bakterijos YF-L903	0,05	0,05	0,05	-	-	-
Jogurto bakterijos YC-X11	-	-	-	0,05	0,05	0,05
Viso:	100	100	100	100	100	100

Jogurtų praturtintų fitosteroliais gamybos schema pateikta 17 paveiksle.



**17 pav.** Jogurto gamybos schema termostatinio būdu

Produkto juslinis, fizikinis-cheminis ir mikrobiologinis vertinimas atliktas: pagaminimo dieną, po 1, 2, 3 savaičių. Iš viso pagaminta 72 jogurto mėginiai. Vertinant kiekvienos receptūros rodiklius buvo atlikti 3 pakartojimai.

#### **2.3.4.1. Jogurto savybių vertinimas laikymo metu**

##### JUSLINĖS

Pagaminto jogurto juslinės savybės buvo vertintos 5 balų (1-labai silpnai išreikštas požymis; 5-labai stipriai išreikštas požymis) sistemoje pagal tokius kriterijus: konsistencija / išvaizda (kreminumas, pasiskirstymas burnoje, vienalytiškumas, tirštumas burnoje, tirštumas vizualiai), kvapas (bendras kvapo intensyvumas, aštrus, pašalinis, gavus), skonis (bendras skonio intensyvumas, liekamasis skonis, aštrus, kartus, rūgštus) bei spalvos intensyvumas [96].

## FIZIKINĖS-CHEMINĖS

Jogurto pH buvo nustatytas po 1, 7, 14, 21 dienos su „Eutech instruments pH610” matuokliu.

## MIKROBIOLOGINĖS

Mėginiai tyrimams buvo paruošti remiantis ISO 6887-1:2017 [97] standartu. Tyrimams naudotos mitybos terpės ruoštos ir laikytos pagal ISO 11133:2014 [98] standartą. Bendras mikroorganizmų skaičius nustatytas pagal ISO 4833-1:2013 [99] standartą. Tyrimui buvo naudota mitybos terpė „Plate count agar“ (PCA). Pasibaigus inkubavimo laikui, lėkštelėse išaugę mikroorganizmai suskaičiuoti ir apskaičiuotas bendras mikroorganizmų, esančių tiriamajame mėginyje skaičius pagal formulę (2.7):

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}; \text{KSV/g} \quad (2.7)$$

$\Sigma C$  — kolonijų suma, iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių, kai bent vienoje lėkštelėje yra tarp 10 ir 300 kolonijų;

$n_1$  – pirmojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

$n_2$  – antrojo skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius;

$d$  – pirmojo vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas.

### **2.3.5. Statistinis duomenų apdorojimas**

Statistinė analizė buvo atlikta su SPSS paskaičiuojant aprašomąją statistiką tokia kaip vidurkis, standartinis nuokrypis, minimumas ir maksimumas. Taip pat buvo atlikta „ANOVA post-hoc“, su „Tukey“, ši analizė palygino tarp kurių grupių vidurkiai statistiškai reikšmingai skiriasi. Duomenys laikomi statistiškai patikimi, kai  $p \leq 0,05$ .

### 3. TIRIAMOJO DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Augalinių žaliavų cheminės sudėties įvertinimas

Siekiant išgauti fitosterolius iš augalinių žaliavų pirmiausiai reikia nustatyti pagrindines jų charakteristikas, todėl skirtingose augalinėse žaliavose buvo atliktas cheminės sudėties įvertinimas. Tyrimuose naudotos augalinės kilmės žaliavos yra pateiktos 18 paveiksle.



18 pav. Augalinės kilmės žaliavos

Fitosteroliai yra neatskiriama augalų ląstelių membranos dalis. Pagrindiniai fitosterolių šaltiniai yra augaliniai aliejai gauti iš kukurūzų, sojos pupelių, saulėgrąžų sėklų, riešutų ar jų vaisių.

Kiekviena žaliava pasižymi skirtinga chemine sudėtimi bei biologiškai aktyvių medžiagų koncentracija, kuri gali priklausyti nuo veislės, auginimo, klimatinio bei sandėliavimo sąlygų [8]. Skirtingose žaliavose nustatyti baltymų ir riebalų kiekiai yra pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. Žaliavose esantys baltymų ir riebalų kiekiai, %

Žaliavos	Riebalų kiekis, %			Baltymų kiekis, %		
	Vidurkis	SD	p	Vidurkis	SD	p
Kviečių sėlenos	2,77	0,10	b	15,16	0,25	d
Kviečių gemalai	5,13	0,15	b	18,04	0,21	c
Linų sėmenys	37,16	0,26	a	22,54	0,42	e
Kanapių sėklos	32,22	0,32	a	24,10	0,23	b
Graikiniai riešutai	34,06	0,28	a	19,04	0,37	a
Sojų pupelės	16,54	0,18	b	35,42	0,48	f
Sojų lecitinas	88,15	0,56	c	-	-	-

Atliktuose tyrimuose nustatyta, kad didžiausi baltymų kiekiai (SM) yra sojų pupelėse – 35,42 %, kanapių sėklose – 24,10 %, o mažiausias kiekis kviečių sėlenose – 15,16 %. Šie pateikti duomenys atitinka Leonard'o et al., [100] ir Li et al., [101] tyrimų rezultatus.

Didžiausi aliejų (žr. 7 lentelę) kiekiai (SM) buvo rasti sojos lecitine ir linų sėmenyse, kurie atitinkamai sudarė 88,15 % ir 37,66 %. Mažiausi aliejų kiekiai nustatyti kviečių sėlenose – 2,77 % ir kviečių gemaluose – 5,13 %. Analogiškus aliejų kiekius nustatė ir Zou et al., [102] analizuodamas riebalų rūgščių sudėtį kviečių sėlenose. Kaip rodo mokslinės publikacijos esant didesniai aliejaus kiekiui žaliavoje gali būti ir didesnės fitosterolių koncentracijos [26].

Tirtose žaliavose be baltymų ir riebalų taip pat aptinkamos mineralinės medžiagos. Skirtingose žaliavose nustatyti jų kiekiai yra pateikti 8 lentelėje.

**8 lentelė.** Žaliavose esantys mineralinių medžiagų kiekiai, %

Žaliavos	Mineralinių medžiagų kiekis, %		
	Vidurkis	SD	p
Kviečių sėlenos	4,08	0,14	a
Kviečių gemalai	4,10	0,12	a
Linų sėmenys	4,13	0,16	a
Kanapių sėklos	4,82	0,16	c
Graikiniai riešutai	3,51	0,20	b
Sojų pupelės	5,25	0,15	d

Tyrimų rezultatai parodė, kad mineralinių medžiagų (žr. 8 lentelę) kiekis visose žaliavose (SM) sudarė nuo 2,77 % iki 5,25 %. Didžiausias mineralinių medžiagų kiekis nustatytas sojų pupelėse. Literatūros duomenys rodo, kad mineralinių medžiagų kiekis sojų pupelėse gali kisti nuo 4,3 % iki 5,25 % [103].

Javų grūdai ir jų šalutiniai perdirbimo produktai visada pasižymi dideliais krakmolo ir cukrų kiekiais.

Skirtingose žaliavose nustatyti krakmolo ir cukrų kiekiai yra pateikti 9 lentelėje.

**9 lentelė.** Žaliavose esantys krakmolo ir cukrų kiekiai, %

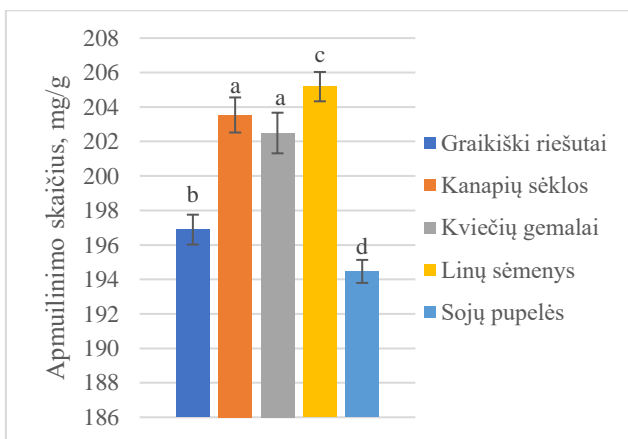
Žaliavos	Krakmolo kiekis, %			Cukrų kiekis, %		
	Vidurkis	SD	p	Vidurkis	SD	P
Kviečių sėlenos	29,84	0,57	d	5,98	0,11	a
Kviečių gemalai	29,29	0,33	c	6,04	0,20	a
Linų sėmenys	5,46	0,17	e	3,43	0,19	d
Kanapių sėklos	1,76	0,09	b	1,74	0,07	c
Graikiniai riešutai	4,10	0,20	a	3,02	0,20	b
Sojų pupelės	8,05	0,16	f	5,04	0,15	e

Minėtose žaliavose (SM) krakmolo kiekis sudarė 29,29–29,84 %, o cukrų 5,98–6,04 %. Mažiausi krakmolo ir cukrų kiekiai nustatyti kanapių sėklose, kurie atitinkamai sudarė 1,76 % ir 1,74 %. Šios maistinės medžiagos sąlygoja javų grūdų ir šalutinių produktų (kviečių gemalų ar sėlenų) didelę energinę vertę. Hu et al., [104] analizuodamas kviečių gemaluose esančių angliavandenių sudėtį nustatė, kad juose vyrauja gliukozė, arabinozė, ksilozė. Šio autoriaus tirti krakmolo ir cukrų kiekiai atitiko baigiamajame darbe gautus tyrimų rezultatus. Angliavandenių kiekiai kanapių sėklose bei jų produktuose priklauso nuo apdorojimo būdo [105].

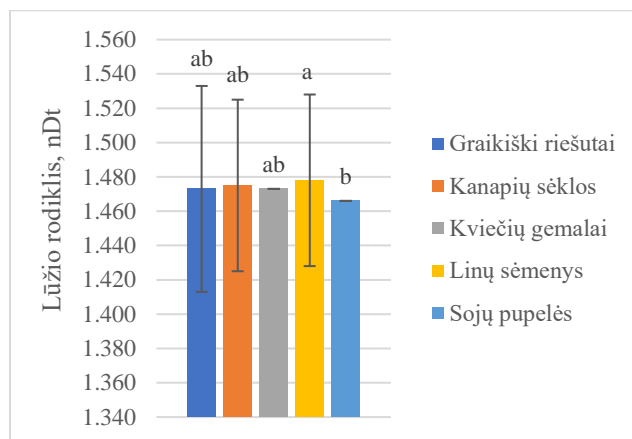
Skirtingose žaliavose nustatyti aliejaus technologiniai parametrai: apmuilinimo skaičius, lūžio rodiklis bei lydymosi temperatūra, kurie yra pateikti 19; 20 ir 21 paveiksluose.

Tyrimų rezultatai parodė, kad didžiausias apmuilinimo skaičius (žr. 19 pav.) nustatytas linų sėmenų aliejuje – 205,18 mg/g. Tai gali būti susiję su riebalų rūgščių sudėtimi šioje žaliavoje. Linų sėmenų aliejuje vyrauja  $\alpha$ -linoleno rūgštis, kuri gali sudaryti apie 53 % nuo visų riebalų rūgščių kiekio. Ši riebalų rūgštis dėl cheminės struktūros lengvai oksiduoja, todėl apmuilinimo skaičius gali įvairiai kisti. Tyrimuose apmuilinimo skaičius yra didesnis lyginant su literatūros duomenimis, kurioje šis

rodiklis siekia 188–195 mg/g [106, 107]. Mažiausias apmuilinimo skaičius nustatytas sojų pupelių aliejuje – 194,46 mg/g. Ikhazuagbe et al., [108] nustatė sojos pupelių aliejuje apmuilino skaičių 192 mg/g. Šis aliejus pasižymi gera riebalų rūgščių sudėtimi, kuriame daug polinesočiųjų riebalų rūgščių. Sojos pupelėse dėl esančių didelės koncentracijos antioksidantų riebalų rūgščių oksidacijos procesai gali būti lėtesni [109]. Žaliavų fiziko-cheminiai rodikliai yra svarbūs norint sėkmingai jas panaudoti naujų maisto produktų kūrimui. Nuo šių rodiklių gali priklausyti galutinių produktų juslinės ir technologinės savybės.

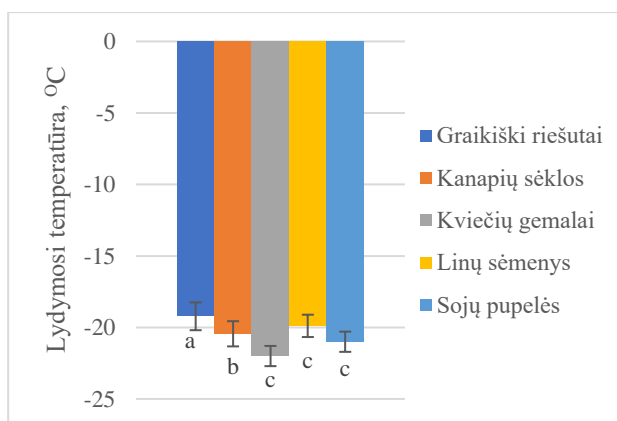


19 pav. Žaliavų apmuilinimo skaičius, mg/g



20 pav. Žaliavų lūžio rodiklis, nD<sup>t</sup>

Analizuojant lūžio rodiklius (žr. 20 pav.) skirtinguose aliejuose nustatyti nedideli skirtumai ( $p > 0,05$ ). Didžiausias lūžio rodiklis nustatytas linų sėmenų aliejuje – 1.478 nD<sup>t</sup>, o mažiausias sojų pupelių aliejuje – 1.466 nD<sup>t</sup>. Didesni lūžio rodikliai priklauso nuo medžiagų optinio tankio [110].



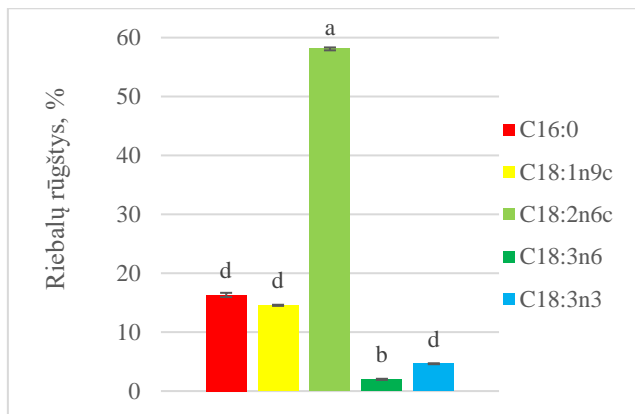
21 pav. Žaliavų lydymosi temperatūra, °C

Tyrimo rezultatai rodo, kad lydymosi temperatūra (žr. 21 pav.) kito nuo 19 °C iki 22 °C. Tai svarbus technologinis parametras pagal kurį galima spręsti apie aliejų panaudojimo galimybes maisto produktų naudojime. Lydymosi temperatūrą lemia aliejų grynumas, riebalų rūgščių sudėtis, autooksidacijos metu susiformavusios medžiagos. Linų sėmenų ir sojų pupelių aliejaus lydymosi temperatūros rodikliai sutampa su Ramamoorthy et al., [111] tyrimų rezultatais.

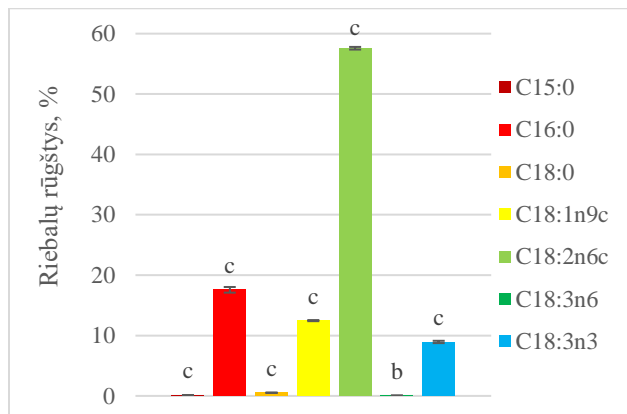
Riebalų rūgštys turi didelę įtaką žmonių sveikatingumui. Žmonių mityboje labai svarbios nepakeičiamos riebalų rūgštys, visų pirma tai linolo ir  $\alpha$ -linoleno. Iš  $\alpha$ -linoleno rūgšties organizme yra gaminamos eikazapentaeno ir dokozaheksaeno rūgštys. Visos šios rūgštys mažina organizmo uždegimines reakcijas, kraujo krešėjimą ir sergamumą širdies ligomis [112]. Paskutiniai tyrimai parodė, kad riebalų rūgštys gali būti potenciali alternatyva įprastiems antibiotikams. Jos taip pat

pasizymi antimikrobinu poveikiu ir daugelis mikroorganizmų skirtingai reaguoja į įvairias natūralias ir sintetines riebalų rūgštis [113]. Rogero et al., [114] tyrimai parodė, kad omega-3 ir ypač eikozapentaeno ir dokazaheksaeno rūgštys pasižymi priešūždegiminiu poveikiu ir gali palengvinti pacientų, sergančių COVID-19 virusu sveikatos būklę.

Skirtingų žaliavų aliejuose nustatytos riebalų rūgštys yra pateiktos 22 – 28 paveiksluose.

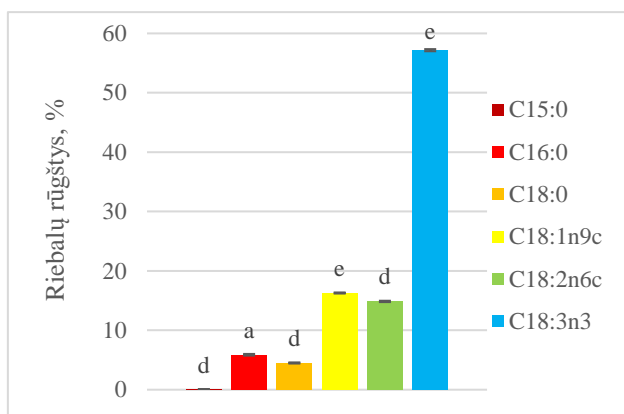


22 pav. Kviečių sėlenų RR sudėtis, %

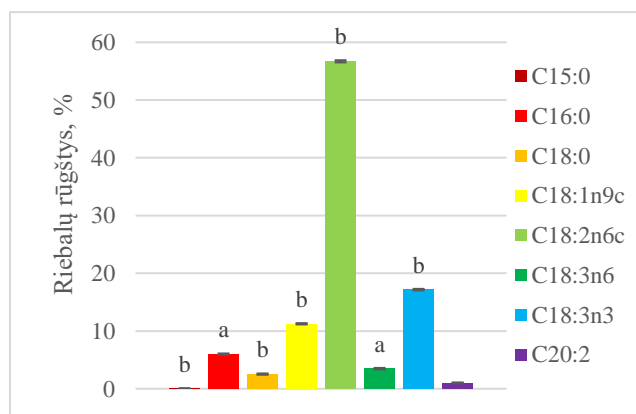


23 pav. Kviečių gemalų RR sudėtis, %

Kviečių sėlenose ir gemaluose vyraavo linolo rūgštis. Ši riebalų rūgštis kviečių sėlenose (žr. 22 pav.) sudarė – 58,09, %, kviečių gemaluose (žr. 23 pav.) – 57,58 %. Minėtose žaliavose palmitino rūgštis sudarė atitinkamai 16,32 % ir 17,57 %. Kviečių gemaluose  $\alpha$ -linoleno rūgšties koncentracija buvo 1,92 karto didesnė lyginant su kviečių sėlenomis. Tyrimų rezultatai sutampa su Zou et al., [115] atliktais tyrimais. Pastarieji mokslininkai analizuodami kviečių gemalų riebalų rūgščių sudėtį nustatė, kad linolo rūgštis sudaro 58,88 %.

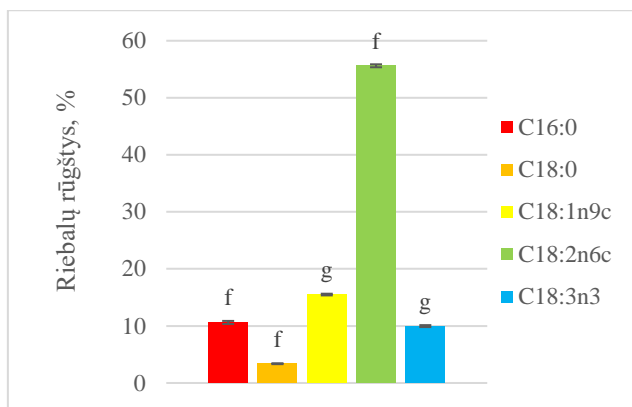


24 pav. Linų sėmenų RR sudėtis, %

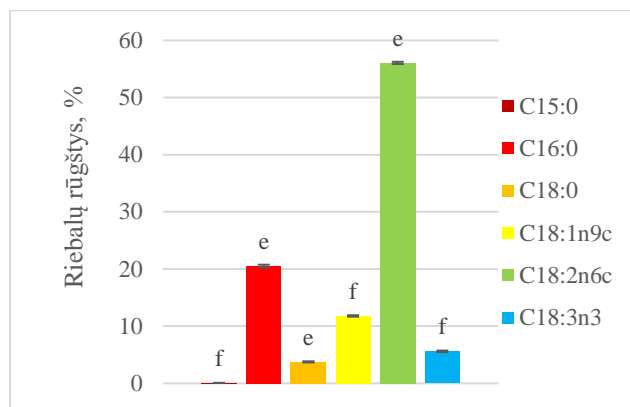


25 pav. Kanapių sėklų RR sudėtis, %

Linų sėmenyse (žr. 24 pav.) vyraavo  $\alpha$ -linoleno rūgštis, kuri sudarė – 57,17 %, oleino – 16,28 %, o linolo rūgštis – 14,87 %. Moksliniuose tyrimuose nustatyta, kad  $\alpha$ -linoleno rūgšties kiekis linų sėmenyse kinta nuo 39,90 % iki 60,42 % [116]. Kanapių sėklose (žr. 25 pav.) vyraavo linolo rūgštis – 56,71 %, antroje vietoje  $\alpha$ -linoleno – 17,16 %. Kanapių sėklose linolo rūgštis gali vidutiniškai sudaryti 58,41 %, o  $\alpha$ -linoleno – 16,26 % [117]. Minėtose žaliavose yra didelė polinesočiųjų riebalų rūgščių koncentracija. Įvairi riebalų rūgščių sudėtis ir kokybė aliejuose gali priklausyti nuo aliejaus kilmės ar jo laikymo sąlygų (temperatūros, tiesioginių spindulių poveikio, oksidacinių procesų. Esant netinkamoms sandėliavimo sąlygoms jos gali lengvai oksiduotis, apkarsti ir žmonių mityboje būti nevartojamos.).

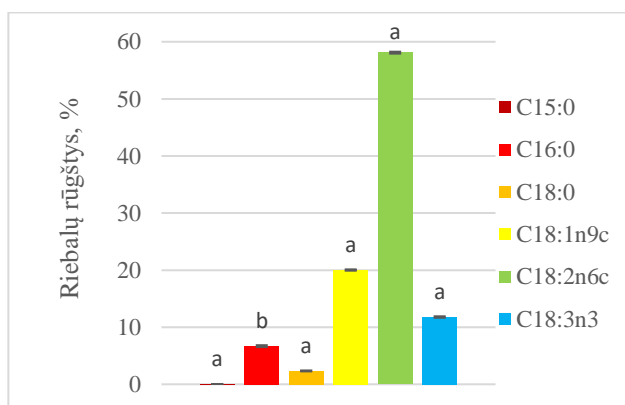


26 pav. Sojų pupelių RR sudėtis, %



27 pav. Sojų pupelių lecitino RR sudėtis, %

Sojų pupelėse (žr. 26 pav.) ir sojų lecitine (žr. 27 pav.) vyraavo taip pat linolo rūgštis – kuri atitinkamai žaliavose sudarė 55,61 % ir 56,06 %. Sojų pupelėse oleino rūgštis sudarė – 15,50 %, o palmitino rūgštis – 10,61 %. Sojų lecitine palmitino rūgštis sudarė – 20,52 %, o oleino rūgštis – 11,79 %. Priklausomai nuo žaliavos veislės, auginimo sąlygų linolo rūgšties kiekis gali kisti nuo 1,7 % iki 52,5 %, o palmitino rūgšties kiekis nuo 7,8 % iki 13,6 % [118]. Didžiausi sojos pupelių gamintojai yra Brazilija, JAV, Argentina Kinija, Indija. Sojų pupelių gamyba yra susijusi su daugeliu rodiklių, kaip auginimo, klimatinėmis sąlygomis, atsparumu abiotiniams ir biotiniams veiksniais. Tačiau sojos pupelių gamybos tempus gali mažinti per menkas natyvinis imunitetas. Nežiūrint visų neigiamų pasekmių, sojos pupelės ir jų produktai yra pagrindinė žaliava, kuri naudojama žmonių ir gyvūnų mityboje [119].



28 pav. Graikiškų riešutų RR sudėtis, %

Graikiškuose riešutuose (žr. 28 pav.) dominavo linolo rūgštis – 58,10 %, po to didžiausia koncentracija nustatyta oleino – 20,02 % ir  $\alpha$ -linoleno rūgšties – 11,78 %. Išanalizavus mokslinę literatūrą nustatyta, kad linolo rūgšties kiekis gali kisti nuo 59,19 % iki 69,65 %. Tai gali priklausyti nuo riešutų veislės, naudojamos analitinės įrangos bei tyrimų metodų [120].

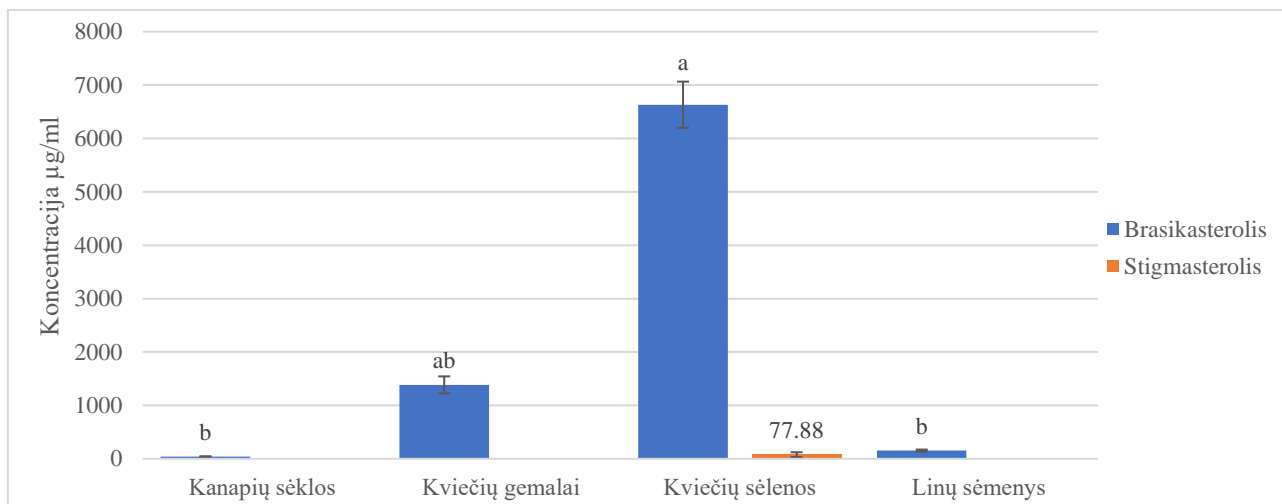
### 3.2. Aliejų ekstrakcijos iš augalinių žaliavų vertinimas

Tolimesnė riebalų ekstrakcija buvo vykdyta iš linų sėmenų. Ši žaliava pasirinkta todėl, kad yra auginama Lietuvoje. Linų sėmenys pasižymi geromis maistinėmis savybėmis. Juose yra daug baltymų, ląsteliena pasižymi prebiotinėmis savybėmis, dideli natūralių antioksidantų bei aliejaus kiekiai. Aliejuje daug polinesočiųjų riebalų rūgščių, kurios turi teigiamą poveikį žmonių sveikatai. Aliejaus gavyba Soksleto būdu išanalizuota 3.1. poskyryje „Augalinių žaliavų cheminės sudėties įvertinimas“.

### 3.2.1. Fitosterolių ekstrakcijos iš augalinių žaliavų aliejų palyginimas

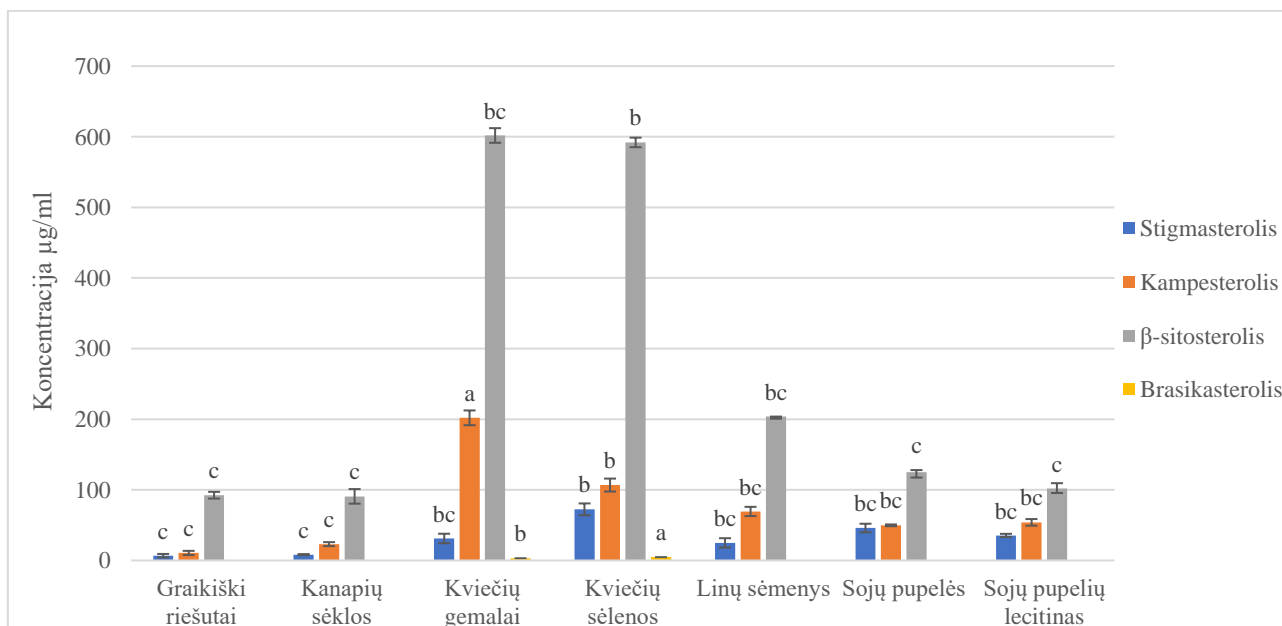
Fitosterolių išgryninimui iš linų sėmenų aliejaus buvo naudotos kietos fazės ekstrakcijos kasetės, o nustatymui aukšto efektyvumo skysčių bei dujų chromatografijos.

Fitosterolių glikozidų sudėties analizės po kietos fazės ekstrakcijos yra pateiktos 29 ir 30 paveiksluose.



29 pav. Fitosterolių glikozidų sudėtis po kietos fazės ekstrakcijos, µg/ml

Analizuojant žaliavų aliejus, kurie buvo išgryninti kietos fazės ekstrakcija (PSA kasetė) ir fitosteroliai nustatyti dujų chromatografijos metodu (žr. 29 pav.) kviečių sėlenose brasikasterolio koncentracija sudarė 6632,65 µg/ml. Kviečių gemaluose šio junginio koncentracija 4,79 karto mažesnė nei sėlenose. Kanapių sėklose ir linų sėmenyse brasikasterolio buvo nustatyta labai maža koncentracija. Stigmasterolio pėdsakai rasti tik kviečių sėlenose. Įvairių fitosterolių pasiskirstymas grūduose priklauso nuo grūdo morfologinės struktūros. Didžiausia koncentracija randama grūdo paviršiuje ir mažėja link endospermo, tačiau brasikasterolis grūduose pasiskirsto tolygiai [121].

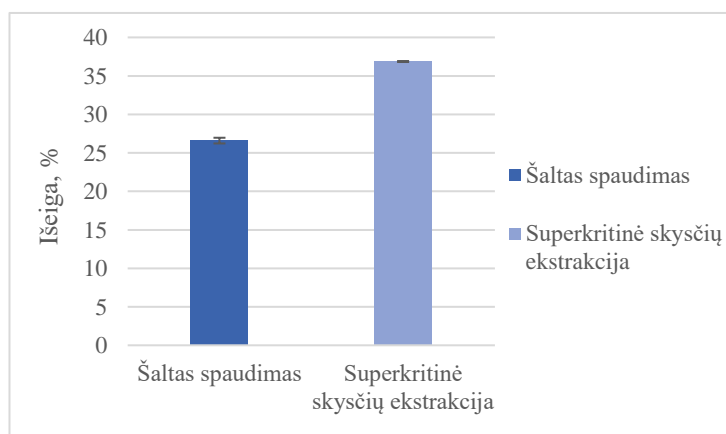


30 pav. Fitosterolių glikozidų sudėtis žaliavų aliejuose po kietos fazės ekstrakcijos, µg/ml

Tyrimo rezultatai, aliejus gryninant PSA kasetėmis ir fitosterolius nustatant aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodu parodė, kad visose tirtose žaliavose (žr. 30 pav.) vyrauja  $\beta$ -sitosterolis. Šio fitosterolio koncentracijos aliejuose atitinkamai buvo tokios: graikiškuose riešutuose – 92,44  $\mu\text{g/ml}$ , kanapių sėklose – 90,75  $\mu\text{g/ml}$ , kviečių gemaluose – 601,81  $\mu\text{g/ml}$ , kviečių sėlenose – 591,98  $\mu\text{g/ml}$ , linų sėmenyse – 203,75  $\mu\text{g/ml}$ , sojų pupelėse – 125,02  $\mu\text{g/ml}$  ir sojų pupelių lecitine – 101,80  $\mu\text{g/ml}$ . Kampesterolis buvo aptinkamas tokiomis koncentracijomis: graikiškuose riešutuose – 11,05  $\mu\text{g/ml}$ , kanapių sėklose – 23,12  $\mu\text{g/ml}$ , kviečių gemaluose – 201,97  $\mu\text{g/ml}$ , kviečių sėlenose – 106,77  $\mu\text{g/ml}$ , linų sėmenyse – 69,40  $\mu\text{g/ml}$ , sojų pupelėse – 49,76  $\mu\text{g/ml}$  ir sojų pupelių lecitine – 53,95  $\mu\text{g/ml}$ . Tirtuose bandiniuose stigmasterolio nustatytos mažos koncentracijos, o brasikasterolio rasti pėdsakai tik kviečių sėlenose ir kviečių gemaluose. Alves da Silva et al., [122] tirdamas skirtingus linų sėmenų aliejus nustatė, kad kampesterolis vidutiniškai sudaro – 624,1 mg/kg (481,0–825,4 mg/kg), stigmasterolis – 176,6 mg/kg (128,2–234,4 mg/kg),  $\beta$ -sitosterolis – 1472,8 mg/kg (1109,4–2012,9 mg/kg), bendras fitosterolių kiekis sudarė 2273,4 mg/kg (1725,7–3072,6 mg/kg). Leonard’as et al., [123] kanapių sėklų aliejuje nustatė fitosterolių tokias koncentracijas:  $\beta$ -sitosterolio – 1905,07 mg/kg, kampesterolio – 505,69 mg/kg. Kaip matosi iš pateiktų duomenų aliejuose fitosterolių koncentracijos gali būti skirtingos. Tai sąlygoja augalų genotipas, auginimo, klimatinės sąlygos bei naudojami ekstrakcijos metodai.

### 3.3. Aliejaus iš linų sėmenų skirtingais ekstrakcijos metodais įvertinimas

Tradiciniai aliejaus gavybos metodai yra nepakankamai tausojantys aplinką, sunaudojama daugiau cheminių medžiagų ir dujų pavidalu išskiriami kenksmingi junginiai. Išgaunant aliejų iš linų sėmenų buvo pasirinkti „draugiški“ aplinkai būdai, t. y. superkritinė skysčių ekstrakcija ir šaltas spaudimas. Aliejaus išeiga priklauso nuo jo ekstrakcijos metodo. Linų sėmenų aliejaus išeigos gautos skirtingais būdais pateiktos 31 paveiksle.



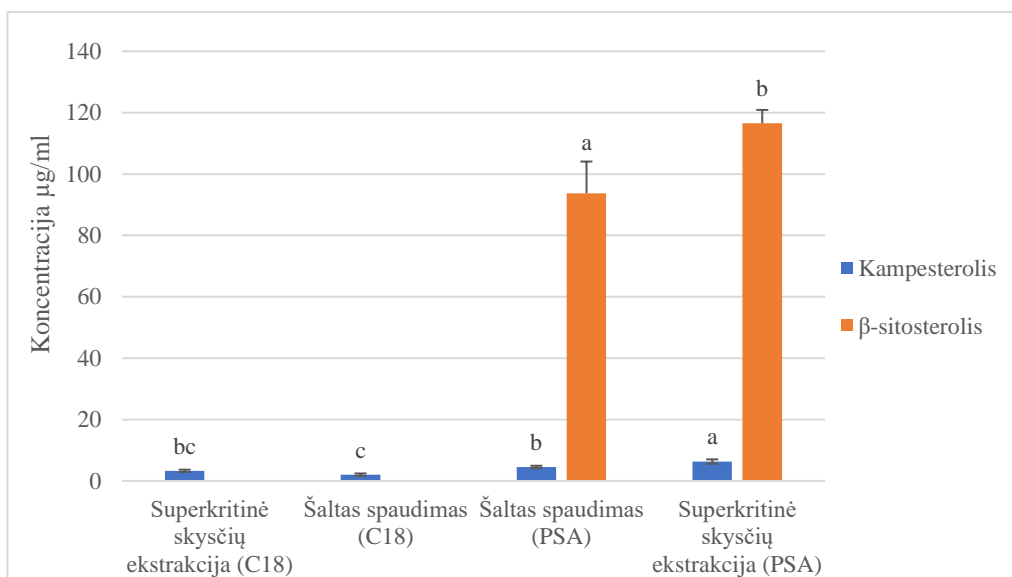
31 pav. Linų sėmenų aliejaus išeigos, %

Aliejaus išeiga iš linų sėmenų naudojant šalto spaudimo būdą gauta 26,6 %, o naudojant superkritinę skysčių ekstrakciją – 36,9 %. Superkritinės skysčių ekstrakcijos metodas aliejaus gavybai yra paprastas, efektyvus bei „draugiškas“ aplinkai. Gauta aliejaus išeiga buvo analogiška Soksleto ekstrakcijos būdu gautam aliejaus kiekiui, kuris sudarė 37,16 %. Naz’as et al., [124] analizavo skirtingų linų sėmenų veislių aliejaus išeigas naudojant Soksleto, šalto spaudimo ir superkritinės skysčių ekstrakcijos metodus. Spaudžiant aliejų šalto spaudimo būdu iš skirtingų linų veislių aliejaus išeiga sudarė nuo 25,4 % iki 26,7 %. Aliejų gavimui naudojant tas pačias linų veisles, bet taikant superkritinės skysčių ekstrakcijos metodą esminė įtaka aliejaus gavybai buvo skirtingų slėgių naudojimas. Esant 30 MPa aliejaus išeiga kito nuo 33,2 % iki 34,2 %, o esant 40

MPa slėgiui išeiga siekė 37,3 % – 38,5 %. Taikant superkritinę skysčių ekstrakciją gautame aliejuje buvo didesnis omega-3 riebalų rūgščių kiekis bei mažesnė laisvųjų riebalų rūgščių koncentracija.

### 3.3.1. Fitosterolių gryninimo iš linų sėmenų aliejaus analizė

Fitosterolių nustatymas naudojant aukšto efektyvumo skysčių chromatografiją yra tinkamas ir efektyvus metodas. Naudojant šį metodą svarbu tinkamai paruošti mėginius ir parinkti nustatymo parametrus. Tyrimo rezultatai parodė, kad naudojant skirtingas kietos fazės ekstrakcijos kasetes bei absorbentus, fitosterolių kiekiai skiriasi. Fitosterolių sudėtis linų sėmenyse yra pateikta 32 paveiksle.



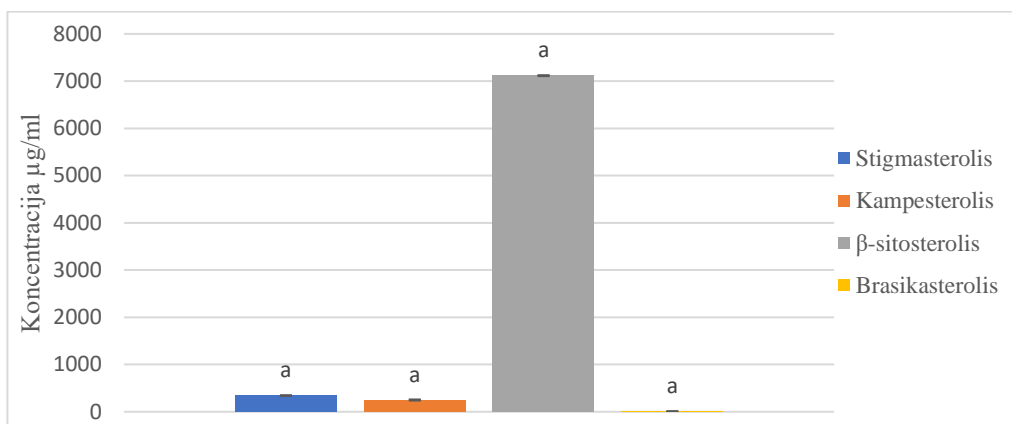
**32 pav.** Fitosterolių sudėtis linų sėmenyse, µg/ml  
C18; PSA – gryninimo kasetės

Nustatant kampesterolio ir β-sitosterolio kiekius, buvo naudojami skirtingi aliejų ekstrakcijos būdai (žr. 32 pav.). Fitosterolių gryninimui naudotos PSA ir C18 kasetės. Jų nustatymas atliktas aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodu. Iš šalto spaudimo būdu gauto aliejaus, naudojant PSA kasetę β-sitosterolio koncentracija siekė – 94 µg/ml, o naudojant C18 kasetę minėto junginio iš viso nerasta. Linų sėmenų aliejuje, kuris buvo gautas superkritinės skysčių ekstrakcijos būdu, gryninimui naudojant PSA kasetę β-sitosterolio koncentracija buvo gauta – 117 µg/ml, tačiau naudojant C18 kasetę taip pat šio junginio buvo nerasta. Nustatant kampesterolio kiekius linų sėmenų aliejuje nepriklausomai nuo aliejaus ekstrakcijos ir fitosterolių gryninimo metodų minėto junginio gautos nedidelės koncentracijos, kurios sudarė nuo 2 µg/ml iki 4 µg/ml. Fitosterolių ekstrakcijai tinkamiausios sąlygos yra naudojant aliejaus išgryninimui kietos fazės ekstrakcijos PSA kasetes ir gautą mėginį analizuojant aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodu.

Jogurtų prototipų sukūrimui buvo įsigytas komercinis fitosterolių mišinys ir nustatyti jame esantys fitosterolių kiekiai. Komercinio fitosterolių mišinio sudėtis yra pateikta 33 paveiksle.

Analizuojant komercinio fitosterolio rezultatus nustatyta, kad šiame mišinyje didžiausią kiekį sudarė β-sitosterolis – 7116,48 µg/ml, stigmasterolis 342,80 µg/ml, kampesterolis 249,01 µg/ml, o brasikasterolio rasti tik pėdsakai. Šie tyrimų rezultatai buvo panaudoti kuriant naujos sudėties jogurtus. Pastarųjų metų vykdyti tyrimai rodo, kad fitosteroliai pasižymi tokiais poveikiais: antivėžiniu, antioksidaciniu, antiuždegiminiu, antidiabetiniu ir cholesterolį mažinančiu [125,126].

Atsižvelgiant į fitosterolių tyrimų bei panaudojimo koncepciją, baigiamajame darbe nustatyti žaliavose esantys  $\beta$ -sitosterolio, stigmasterolio, kampesterolio ir brasikasterolio kiekiai, naudojant šiuolaikinius tyrimų metodus atitinka dabartines maisto mokslo vystymo tendencijas.



33 pav. Komercinio fitosterolių mišinio sudėtis, µg/ml.

### 3.4. Fitosterolių frakcijų taikymas funkcinio jogurto gamybai

Pastaruju metu vykdoma daug profilaktinių priemonių gerinant žmonių sveikatingumą. Viena iš tokių krypčių – funkcionalusis maistas, kuris suteikia ne tik pagrindines maistines medžiagas, bet ir papildomą teigiamą fiziologinį poveikį pvz., naudojant fitosterolius galima sumažinti sergamumą kardiovaskulinėmis, onkologinėmis ligomis bei ląstelių oksidacinio streso lygį. Tačiau naudoti sąvoką „funkcionalusis maistas“ galima tik atsižvelgiant į ES Komisijos reglamentus Nr. 432/2012 [9] ir Nr. 686/2014 [127]. Juose nurodoma, kad norint vartoti minėtus teiginius, vartotojui turi būti pateikiama informacija apie suvartojamą sterolių kiekį. Jis turi sudaryti ne mažiau kaip 0,8 g augalinių sterolių per parą. Norint pasiekti didesnę teigiamą fiziologinį poveikį žmonių sveikatingumui, sumažinti mažo tankio lipoproteinų kiekį kraujyje, funkcionalųjį maistą reikia vartoti ne trumpiau kaip 2–3 savaites po 1,5–3 g/parą. Atsižvelgiant į anksčiau minėtus teiginius, bandyminis jogurtas (žr. 34 pav.), kurio sudėtyje buvo skirtingos fitosterolių koncentracijos, atitinka šiuolaikinę funkcionaliojo maisto koncepciją.

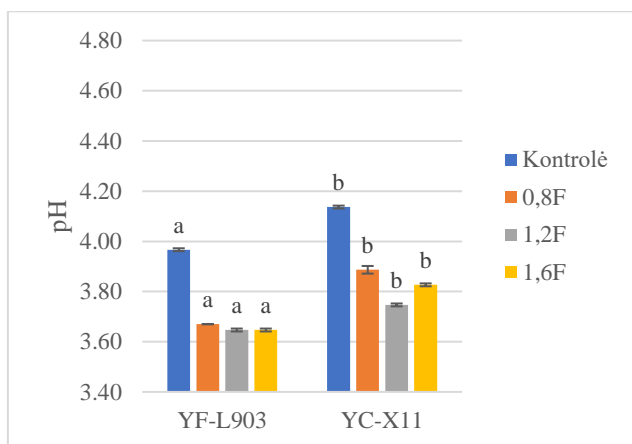


34 pav. Jogurtai praturtinti fitosteroliais

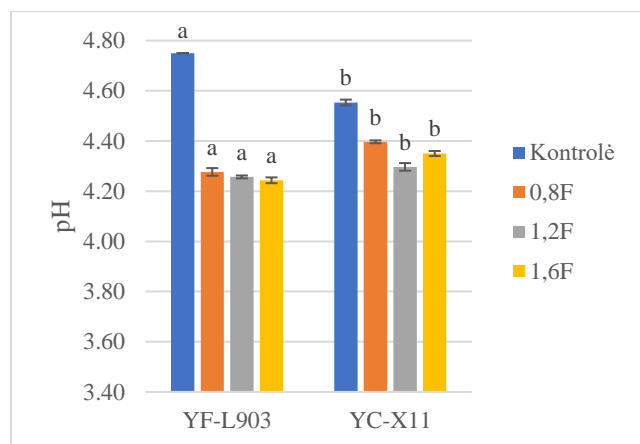
#### 3.4.1. Fitosterolių frakcijų įtaka funkcinio jogurto savybėms

Jogurtas – pieno produktas, kuriame naudojamos įvairios *Lactobacillus* ir *Streptococcus* mikroorganizmų kultūros, kurios suteikia produktui papildomą maistinę vertę. Tačiau jogurto praturtinimas skirtingomis fitosterolių koncentracijomis gali keisti fizikines-chemines, mikrobiologines ir juslines savybes. Jogurto bakterijų mišiniai YF-L903 ir YC-X11 yra sudaryti iš

*Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* mikroorganizmų kamienų. Kaip nurodo gamintojas „Chr. Hansen A/S“ šie mišiniai gali būti naudojami gaminant įvairių tipų jogurtą. Jogurtų prototipų, kurie yra praturtinti fitosteroliais, pH analizės yra pateiktos 35 – 38 paveiksluose.



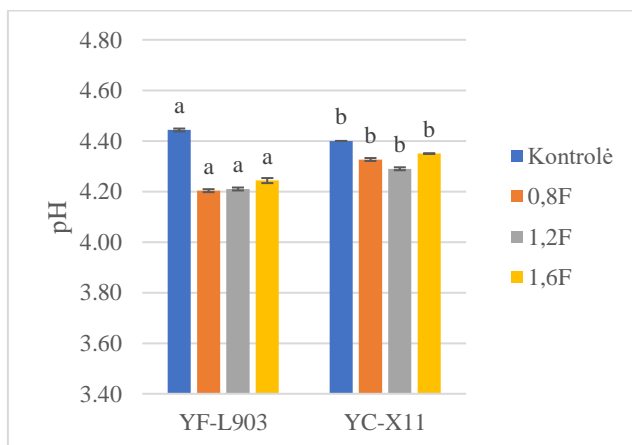
**35 pav.** Jogurtų prototipų pH po 1 dienos  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g



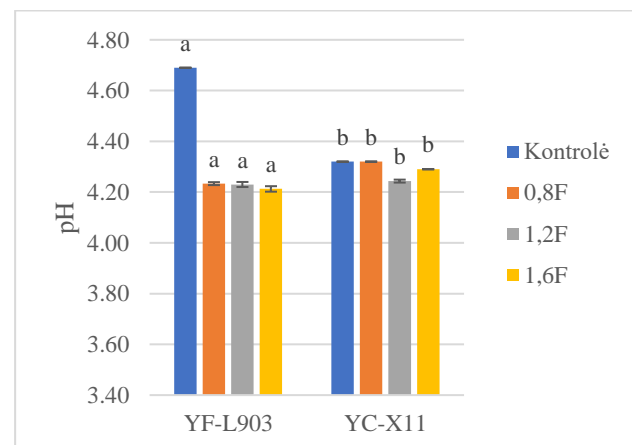
**36 pav.** Jogurtų prototipų pH po 7 dienų  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g

Vandenilio jonų koncentracija jogurtuose, praturtintuose skirtingomis fitosterolių koncentracijomis, po 1 dienos (žr. 35 pav.) sumažėjo, palyginus su kontroliniais bandiniais. Tačiau pH mažėjimo tendencijas lėmė ir naudojami skirtingi mikroorganizmų kamienai. Naudojant mikroorganizmų kamieną YF-L903 pH vidutiniškai sumažėjo 0,3 punkto, t. y. nuo 3,97 pH iki 3,65 pH. Skirtingos fitosterolių koncentracijos pH įtakai neturėjo. Naudojant mikroorganizmų kamieną YC-X11 kontrolinės grupės pH siekė 4,14, esant fitosterolių koncentracijai 0,8 g/100g – 3,89, 1,2 g/100g – 3,75 ir 1,6 g/100g – 3,83. Vandenilio jonų koncentracijos kitimo tendencijas daugiau lėmė naudojami mikroorganizmų kamienai nei skirtingos fitosterolių koncentracijos.

Analizuojant jogurtus po 7 dienų (žr. 36 pav.) kontroliniame bandinyje, kuriame buvo naudotas mikroorganizmų kamienas YF-L903 pH siekė 4,75. Fitosterolių panaudojimas vidutiniškai pH sumažino 0,47–0,51 punkto. Naudojant mikroorganizmų kamieną YC-X11 kontroliniame bei bandomuosiuose mėginiuose pH buvo didesnis palyginus su pirmuoju mikroorganizmų kamieniu. Antro kontrolinio bandinio pH siekė 4,55, o bandiniuose mažiausias pH gautas esant fitosterolių koncentracijai 1,2 g/100g ir siekė 4,30.



**37 pav.** Jogurtų prototipų pH po 14 dienų  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g

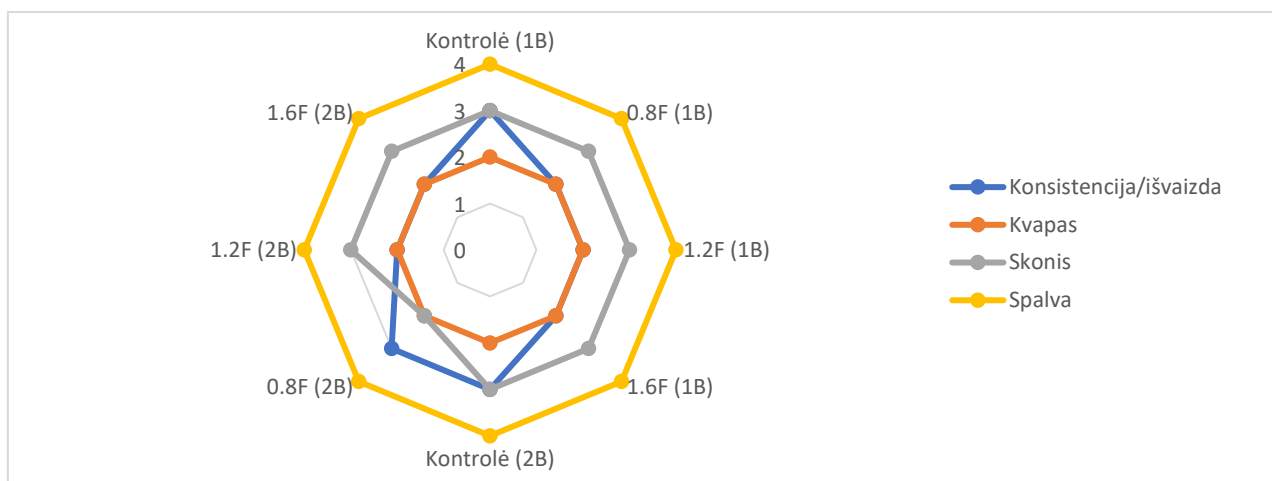


**38 pav.** Jogurtų prototipų pH po 21 dienos  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g

Analizuojant jogurtų pH dinamiką po 14 dienų (žr. 37 pav.) nustatyta, kad bandomuosiuose mėginiuose, naudojant mikroorganizmų kamieną YF-L903, vandenilio jonų koncentracija buvo mažesnė palyginus su bandiniais, kuriuose buvo naudotas mikroorganizmų kamienas YC-X11. Abejais tyrimų atvejais galima konstatuoti, kad fitosterolių panaudojimas jogurtuose mažina vandenilio jonų koncentraciją. Didelės įtakos fitosterolių koncentracija pH sumažėjimui neturėjo, skirtumai buvo statistiškai nepatikimi ( $p > 0,05$ ).

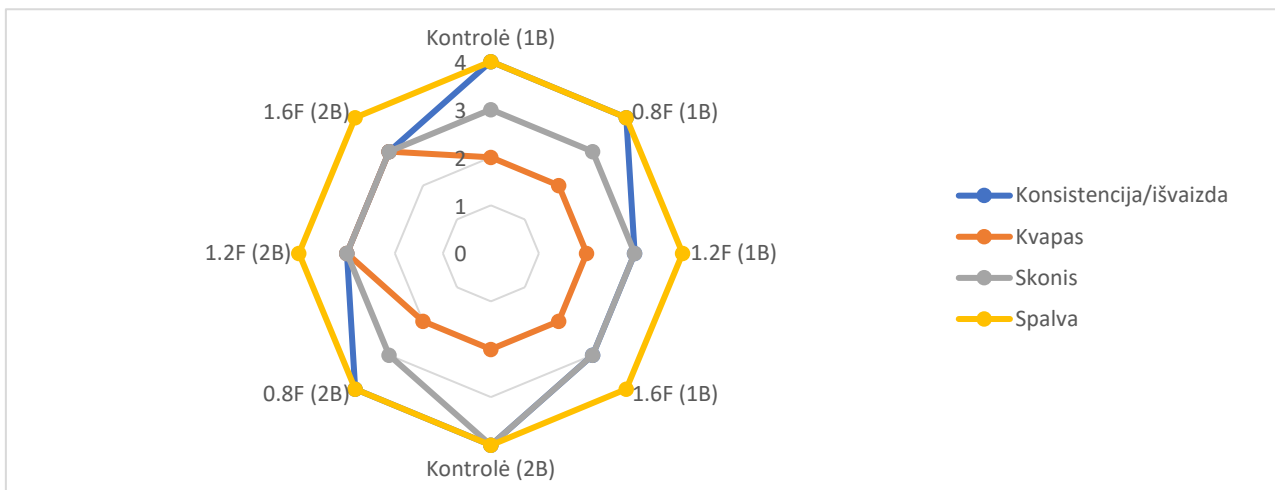
Vandenilio jonų koncentracija bandyminiuose jogurtuose po 21 dienos (žr. 38 pav.) buvo mažesnė palyginus su kontroliniais mėginiais. Didžiausias pH sumažėjimo skirtumas bandyminiuose mėginiuose nustatytas naudojant mikroorganizmų kamieną YF-L903. Šis skirtumas sudarė 0,46–0,48 punkto ir jis buvo statistiškai nepatikimas ( $p > 0,05$ ). Naudojant mikroorganizmų kamieną YC-X11 mažiausias pH sumažėjimas nustatytas naudojant fitosterolių koncentraciją 1,2 g/100g ir siekė 0,08 punkto ( $p > 0,05$ ). Comunian et al., [128] tyrimuose jogurtas buvo praturtintas fitosteroliais, kurių naudojimas turėjo įtakos jogurto pH ir rūgštingumui, pH vertės kito nuo 4,02 iki 4,14, bet įtakos galutinei produkto kokybei neturėjo. Moschakis et al., [129] nustatė, kad jogurtą praturtinus fitosteroliais, tyrimo pradžioje pH siekė 6,65, tačiau po 300 min pH buvo – 4,47.

Po vandenilio jonų koncentracijos nustatymo buvo atliktas jogurtų juslinis vertinimas. Tiriamųjų jogurtų juslinių savybių analizės yra pateiktos 39 – 42 paveiksluose.



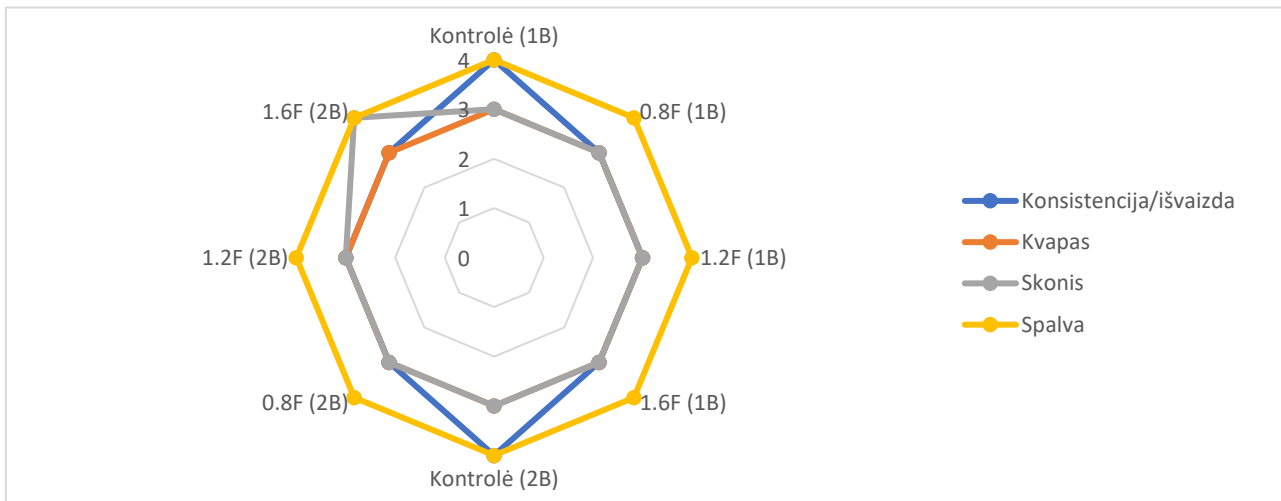
**39 pav.** Tiriamųjų jogurtų juslinės savybės po 1 dienos  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g

Jogurtų juslinės savybės po 1 dienos (žr. 39 pav.) buvo beveik vienodos naudojant YF-L903 (1B) ir YC-X11 (2B) mikroorganizmų mišinius bei skirtingas fitosterolių koncentracijas. Naudojant mikroorganizmų mišinį YC-X11 jogurto kremiškumas buvo intensyvesnis ir vidutiniškai sudarė 3 balus, visuose kituose jogurtuose ši savybė buvo vertinama 2 balais. Esant fitosterolių koncentracijai jogurte 1,2 g ir 1,6 g bei naudojant YC-X11 mikroorganizmų kamieną nustatytas intensyvesnis kartumas ir rūgštumas.



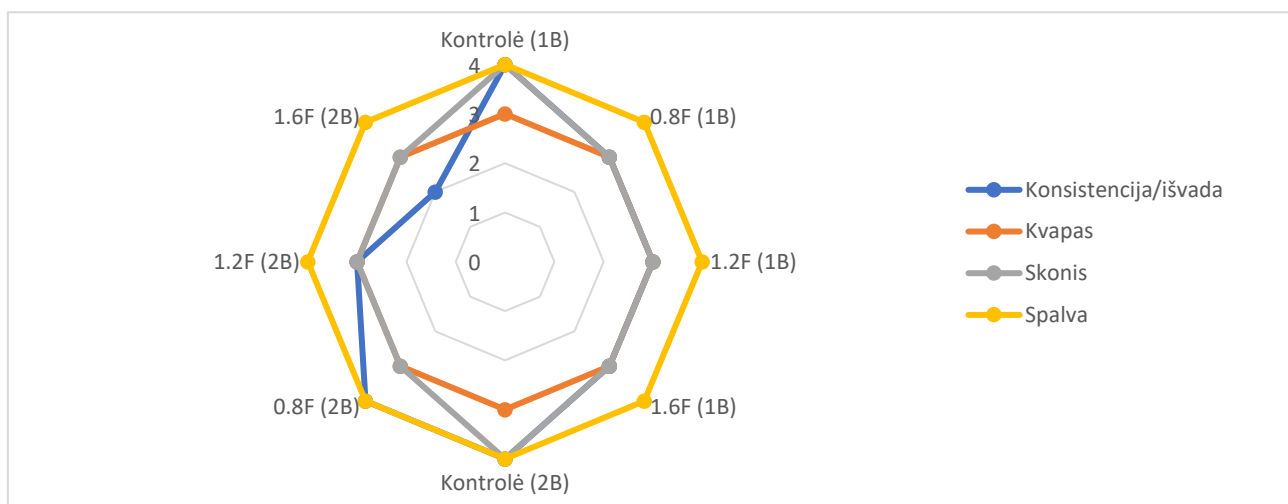
**40 pav.** Tiriamųjų jogurtų juslinės savybės po 7 dienų  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g

Jogurte, kuriame buvo didesnis fitosterolių kiekis (1,2 g ir 1,6 g) ir naudotas mikroorganizmų mišinys YC-X11 (2B), kremiškumas po 7 dienų (žr. 40 pav.) buvo mažesnis nei kituose mėginiuose. Taip pat šiuose mėginiuose sumažėjo liekamasis skonis. Jogurto mėginiuose, kuriuose buvo naudotas YC-X11 (2B) mikroorganizmų mišinys padidėjo tirštumas, lyginant su YF-L903 (1B) bakterijų mišiniu. Tačiau nepriklausomai nuo naudojamo mikroorganizmų mišinio bei fitosterolių koncentracijos, kontroliniame ir tiriamuosiuose jogurtų mėginiuose neįvertinamas aštrumas, kartumas ir rūgštumas. Kontroliniuose bandiniuose buvo geriau išreikštas vienalytiškumas ir pasiskirstymas burnoje.



**41 pav.** Tiriamųjų jogurtų juslinės savybės po 14 dienų  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g

Laikant jogurtą šaldytuve 5 °C temperatūroje po 14 dienų (žr. 41 pav.) kremiškumo savybės visuose tirtuose pavyzdžiuose nepakito. Didėjant fitosterolių koncentracijai produkte buvo nustatyti daugiau išreikšti bendro ir pašalinio kvapų intensyvumai. Visuose mėginiuose didėjo rūgštumas, tačiau aštrumas ir kartumas buvo silpnai išreikštas ir jie įvertinti 1 balu. Kontroliniai mėginiai pasižymėjo geresniu vienalytiškumu, gaivesniu kvapu ir pasiskirstymu burnoje lyginant su jogurtais praturtintais fitosteroliais.



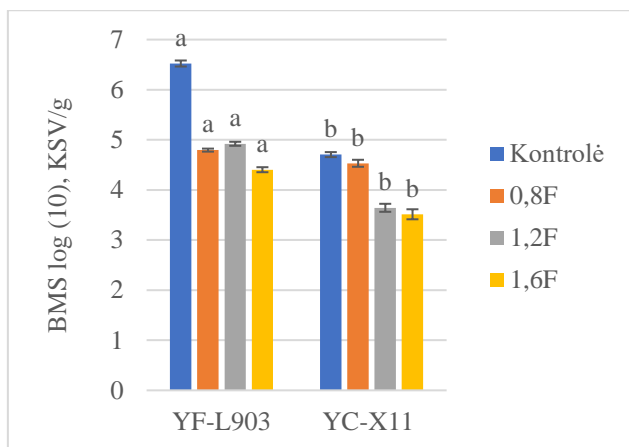
**42 pav.** Tiriųjų jogurtų juslinės savybės po 21 dienos  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g

Analizuojant jogurtų juslines savybes po 21 dienos (žr. 42 pav.) nustatyta, kad jogurto, kurio sudėtyje fitosterolių koncentracija 1,6 g ir bakterijų kultūrų mišinys YC-X11 (2B) vienalytiškumas buvo mažesnis lyginant su kitais jogurtų mėginiais. Šiame jogurte labai matėsi ir jautėsi neištirpusios fitosterolių dalelės. Produkto rūgštus skonis išliko tik naudojant YF-L903 (1B) bakterijų kultūrų mišinį. Kiti analizuojami rodikliai: kartumas, aštrumas, aštraus ir pašalinio kvapo intensyvumas visuose mėginiuose buvo silpnai išreikštas. Kontroliniuose mėginiuose po 21 dienos buvo geresnis vienalytiškumas, pasiskirstymas burnoje ir gaivesnis kvapas lyginant su jogurtais, kurie praturtinti įvairiomis fitosterolių koncentracijomis. Comunian et al., [128] nustatė, kad jogurte praturtintu fitosteroliais buvo mažiau išreikšti kvapo, spalvos, tekstūros ir skonio intensyvumai. Izadi et al., [130] nustatė, kad jogurto praturtinimas fitosteroliais pagerino produkto konsistenciją, bet sumažino klampumą palyginus su kontroliniu jogurtu. Fitosterolių pasiskirstymas tiriamuosiuose mėginiuose nebuvo homogeniškas ir jie buvo randamai apatiniame jogurto sluoksnyje arba nuosėdose. Juslinės analizės tyrimai parodė, kad reikšmingo skirtumo tarp kontrolės ir fitosteroliais praturtinto jogurto nenustatyta.

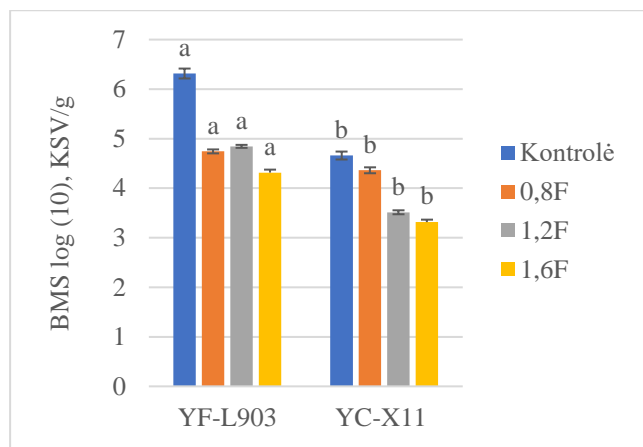
Apibendrinat šiuos duomenis galima teigti, kad geriausios jogurto juslinės savybės buvo pasiektos naudojant bakterijų kultūrų mišinį YC-X11 (2B) ir esant fitosterolių koncentracijai ne daugiau kaip 1,2 g/100g. Vien tik fitosterolių panaudojimas jogurtų gamyboje gali būti susijęs su produkto oksidacinėmis savybėmis. Siekiant padidinti fitosterolių poveikį žmonių sveikatingumui dažniausiai yra vartojami deriniai, kurių sudėtyje gali būti prebiotikai [78].

Jogurto papildymas mikroorganizmų kamienais *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* suteikia produktui specifinį skonį bei aromatą. Šis jogurto skonis ir kvapas atsiranda dėka minėtų mikroorganizmų veiklos bei susiformavusių metabolinių produktų. Dėl šių medžiagų jogurte keičiasi mikrobiologinė sudėtis, kuri priklauso nuo naudojamų mikroorganizmų kamienų, produkto sudedamųjų dalių, laikymo temperatūros bei kitų priedų.

Jogurtų prototipuose, praturtintuose fitosteroliais, nustatytas bendras mikroorganizmų skaičius, kuris yra pateiktas 43 – 46 paveiksluose.



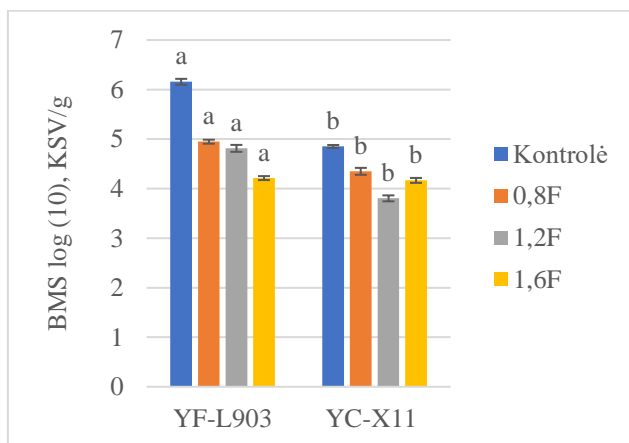
**43 pav.** BMS jogurtų prototipuose, po 1 dienos  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g  
YF-L903; YC-X11 – mikroorganizmų kultūrų mišiniai



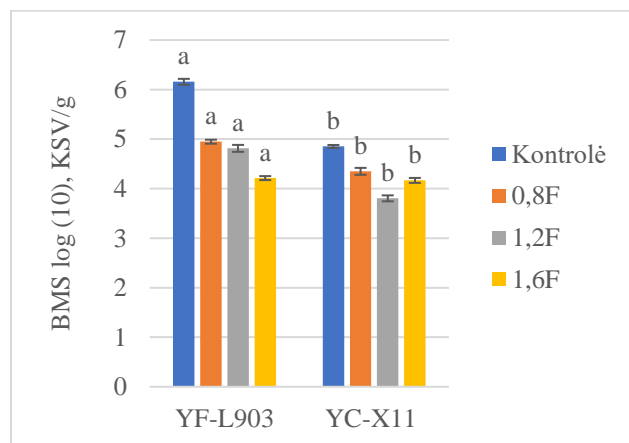
**44 pav.** BMS jogurtų prototipuose, po 7 dienų  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g  
YF-L903; YC-X11 – mikroorganizmų kultūrų mišiniai

Didžiausias bendras mikroorganizmų skaičius (BMS) po 1 dienos (žr. 43 pav.) nustatytas kontroliniame mėginyje naudojant YF-L903 bakterijų kultūrų mišinį. Pridėjus papildomai į jogurtą fitosterolių pasikeitė mikroorganizmų kiekis. Mažiausias bakterijų skaičius nustatytas jogurte, kuriame fitosterolių kiekis sudarė 1,6 g/100g, tačiau šis skirtumas buvo statistiškai nepatikimas ( $p > 0,05$ ). Jogurto sudėtyje naudojant bakterijų kultūrų mišinį YC-X11 bandomuosiuose mėginiuose bakterijų skaičius buvo mažiausias esant fitosterolių koncentracijai 1,2 g/100g ir 1,6 g/100g. Šis skirtumas buvo statistiškai nepatikimas ( $p > 0,05$ ). Atlikti tyrimai parodė, kad bakterijų kiekis priklausė nuo naudojamų mikroorganizmų kamienų bei fitosterolių koncentracijos.

Tos pačios bendro bakterijų skaičius kitimo tendencijos buvo nustatytos ir po 7 dienų (žr. 44 pav.). Didžiausias bakterijų skaičius nustatytas kontrolinėje grupėje naudojant mikroorganizmų kamienų mišinį YF-L903. Mažiausias mikroorganizmų skaičius naudojant mikroorganizmų kamienų mišinį YC-X11 bei esant fitosterolių koncentracijai 1,2 g/100g ir 1,6 g/100g. Tačiau abejais tyrimų atvejais statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta ( $p > 0,05$ ).



**45 pav.** BMS jogurtų prototipuose, po 14 dienų  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g  
YF-L903; YC-X11 – mikroorganizmų kultūrų mišiniai



**46 pav.** BMS jogurtų prototipuose, po 21 dienos  
F – fitosteroliai; 0,8; 1,2; 1,6 – koncentracija /100g  
YF-L903; YC-X11 – mikroorganizmų kultūrų mišiniai

Analizuojant bakterijų koncentracijas jogurtuose po 14 (žr. 45 pav.) ir 21 (žr. 46 pav.) dienos nustatytos tos pačios bakterijų skaičiaus kitimo tendencijos. Naudojant mikroorganizmų kamienų mišinį YF-L903 nustatytas didesnis bendras bakterijų skaičius lyginant su jogurtais, kuriuose

naudotas mikroorganizmų kamienų mišinys YC-X11. Bendras bakterijų skaičius lyginant kontrolinius ir bandomuosius mėginius buvo statistiškai nepatikimas ( $p > 0,05$ ).

Per visą tyrimų laikotarpį (21 dieną), bakterijų skaičius buvo mažiausias jogurtuose esant mikroorganizmų kamienų mišiniui YC-X11 bei fitosterolių koncentracijai 1,2 g/100g ir 1,6 g/100g. Geriausi jogurto technologiniai ir jusliniai rodikliai gauti naudojant bakterijų kultūrų mišinį YC-X11, kurį sudaro *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* bei fitosterolių koncentracija produkte 1,2 g/100g. Tyrimo pabaigoje jogurtas buvo tinkamas vartoti maistui. Esant fitosterolių koncentracijai 1,6 g/100g blogėjo jogurto vienalytiškumas. Fitosterolių tirpumas gali padidėti pieno riebaluose [131]. Piene randama didelė riebalų rūgščių įvairovė, kuri priklausomai nuo įvairių mokslinių šaltinių gali kisti nuo 270 iki 400 [132]. Kaip nurodo Kumar'as et al., [113] riebalų rūgštys pasižymi antimikrobinėmis savybėmis ir jų poveikį gali stiprinti fitosterolių panaudojimas. Choi et al., [133] nustatė, kad fitosteroliai kartu su riebalų rūgštimis gali sudaryti fitosterolių esterius, kurie pasižymi dideliu antimikrobinio poveikiu ir to pasėkoje jogurtuose sumažėja bendras bakterijų skaičius. Benattouche et al., [134] tyrė fermentacijos procesų eigą jogurtuose. Autoriai nustatė, kad naudojant mikroorganizmų kamienus *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus bulgaricus* gali padidėti eksopolisacharidų gamyba. Šis junginys pasižymi antimikrobinio poveikiu ir inhibuoja *Staphylococcus aureus* ATCC 250923 ir *Escherichia coli* ATCC 250922 mikroorganizmų kamienų aktyvumą. Be to eksopolisacharidas pasižymi antioksidaciniu poveikiu ir gali skatinti laisvųjų radikalų pašalinimą iš žmogaus organizmo. Taigi mikroorganizmų kamienų mišinių YF-L903 ir YC-X11, kuriuose yra *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* bei fitosterolių, panaudojimas jogurtų gamyboje turi įtakos bendram bakterijų skaičiaus kitimui ir prailgina jogurto naudojimo laiką.

## IŠVADOS

1. Vertinant augalinių žaliavų (kviečių sėlenų, kviečių gemalų, linų sėmenų, kanapių sėklų, graikiškų riešutų, sojų pupelių bei sojų pupelių lecitino) charakteristikas, atlikta cheminės sudėties analizė. Nustatyta, kad:
  - didžiausias baltymų kiekis yra sojos pupelėse – 35,42 % (SM), o mažiausias – kviečių sėlenose (15,16 % (SM)). Didžiausias riebalų kiekis nustatytas linų sėmenyse – 37,16 %, mažiausias – kviečių sėlenose (2,77 %).
  - didžiausias apmuilinimo skaičius yra linų sėmenyse – 205,18 mg/g, o mažiausias sojos pupelėse – 194,46 mg/g. Didžiausias lūžio rodiklis nustatytas linų sėmenyse – 1,478, mažiausias – sojos pupelėse (1,466  $n_D^{20}$ ). Aukščiausia aliejaus lydymosi temperatūra nustatyta kviečių gemaluose – 22 °C, žemiausia – graikiškų riešutų bandinyje (19,2 °C).
  - visose tirtose žaliavose vyravo linolo rūgštis, kuri sudarė nuo 56,06 % iki 58,10 %, išskyrus linų sėmenis, kuriose didžiausią kiekį sudarė  $\alpha$ -linoleno rūgštis – 57,17 %.
2. Įvykdytas linų sėmenų aliejaus išskyrimas, naudojant skirtingus ekstrakcijos metodus: šaltą spaudimą, superkritinę skysčių ir Soksleto ekstrakcijas. Efektyviausias ir aplinkai „draugiškiausias“ aliejaus ekstrakcijos metodas – superkritinė skysčių ekstrakcija.
3. Atlikta aliejuose esančių fitosterolių, po kietos fazės ekstrakcijos, sudėties analizė dujų ir aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodais:
  - analizuojant fitosterolių sudėtį dujų chromatografijos metodu kviečių gemaluose ir sėlenose nustatytas tik brasikasterolis, kuris sudarė atitinkamai 1384,84 ir 6632,65  $\mu\text{g/ml}$ .
  - naudojant aukšto efektyvumo skysčių chromatografiją didžiausi  $\beta$ -sitosterolio kiekiai nustatyti kviečių gemaluose ir kviečių sėlenose (atitinkamai 601,81  $\mu\text{g/ml}$  ir 591,98  $\mu\text{g/ml}$ ), o mažiausi kiekiai – graikiškuose riešutuose ir kanapių sėklose (atitinkamai 92,44  $\mu\text{g/ml}$  ir 90,75  $\mu\text{g/ml}$ ). Didžiausias kampesterolio kiekis nustatytas kviečių gemaluose (201,97  $\mu\text{g/ml}$ ), mažiausias – graikiškuose riešutuose (11,05  $\mu\text{g/ml}$ ). Bandiniuose nustatytos nedidelės stigmasterolio koncentracijos, o brasikasterolio rasti tik pėdsakai.
  - tinkamiausios sąlygos fitosterolių ekstrakcijai yra aliejaus išgryninimas kietos fazės ekstrakcijos būdu, naudojant PSA kasetes, ir gautą mėginį analizuojant aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodu.
4. Sukurti jogurtų prototipai naudojant skirtingas fitosterolių koncentracijas (0,8, 1,2, 1,6 g/100 g) bei termofilinius jogurto bakterijų kamienų mišinius YF-L903 ir YC-X11.
5. Įvertintos sukurtų jogurto prototipų juslinės, fizinės, cheminės ir mikrobiologinės savybės:
  - priimtinausi jusliniai rodikliai nustatyti jogurte, gautame naudojant bakterijų kultūrų mišinį YC-X11 ir fitosterolius – 1,2 g/100g. Fitosterolių pasiskirstymas jogurte buvo vienalytiškas, o kartumas, aštrumas, pašalinio kvapo intensyvumas buvo silpnai išreikšti.
  - po 21 tyrimų dienos vandenilio jonų koncentracija naudojant mikroorganizmų kamienų mišinius YF-L903 ir YC-X11 atitinkamai sudarė 4,23 ir 4,24 esant fitosterolių koncentracijai jogurtų prototipuose 1,2 g/100g.
  - tyrimo pabaigoje bendras mikroorganizmų skaičius jogurte naudojant mikroorganizmų kamienų mišinius YF-L903 ir YC-X11 atitinkamai sudarė 4,81 KSV/g ir 3,80 KSV/g esant fitosterolių koncentracijai jogurtų prototipuose 1,2 g/100g.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. *Higienos institutas* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-10-28]. Prieiga per: <http://www.hi.lt/sveikatos-informacijos-centras.html>.
2. OGBEL, R. J., et al. A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian Journal of Plant Science and Research* [interaktyvus]. 2015, **5**(4), 10-21 [žiūrėta 2020-10-28]. Prieiga per: <https://www.imedpub.com/articles/a-review-on-dietary-phytosterols-their-occurrence-metabolism-and-health-benefits.pdf>.
3. ESCHE, R. *New Methodologies for the Analysis of Phytosterols and Their Intact Esters: Applications to Cereals, Nuts and Edible Plant Oils*: dissertation [interaktyvus]. Technische Universität München, 2014 [žiūrėta 2020-01-28]. Prieiga per: <https://www.semanticscholar.org/paper/New-Methodologies-for-the-Analysis-of-Phytosterols-Esche/0661274ae9bd9df0d09ac68eb68138a08a08b7f8>.
4. BRADFORD, P. G. & AWAD, A. B. Modulation of signal transduction in cancer cells by phytosterols. *BioFactors* [interaktyvus]. 2010, **36**, 241-247 [žiūrėta 2020-06-21]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/biof.97>.
5. OTHMAN, R. A. & MOGHADASIAN, M. H. Experimental and clinical evidence of cardiovascular benefits of plant sterols. In *Functional Foods and Cardiovascular Disease* [interaktyvus]. CRC Press, 2012, 111-140 [žiūrėta 2020-06-21]. ISBN 978-1-4200-7110-8. Prieiga per: CRC Press.
6. KOHLER, J., et al. Plant sterol enriched functional food and atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology* [interaktyvus]. 2017, **174**(11), 1281-1289 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/bph.13764>.
7. FENG, S., et al. Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues. *Comprehensive reviews in food science and food safety* [interaktyvus]. 2020, **19**, 1243-1267 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12560>.
8. RAS, R. T. & TRAUTWEIN, E. A. Consumer purchase behaviour of foods with added phytosterols in six European countries: Data from a post-launch monitoring survey. *Food and Chemical Toxicology* [interaktyvus]. 2017, **110**, 42-48 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.003>.
9. EUROPOS KOMISIJA. *Dėl tam tikrų leidžiamų vartoti teiginių apie maisto produktų sveikumą, išskyrus teiginius apie susirgimo rizikos mažinimą, vaikų vystymąsi ir sveikatą, sąrašo sudarymo* [interaktyvus]. 2012 m. gegužės 16 d., Nr. 432/2012 [žiūrėta 2021-05-13] Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/>.
10. KYTIDOU, K., et al. Plant Glycosides and Glycosidases: A Treasure-Trove for Therapeutics. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2020, **11**(357), 6-7 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00357>.
11. BERGMANN, K., et al. Cholesterol and Plant Sterol Absorption: Recent Insights. *The American Journal of Cardiology* [interaktyvus]. 2005, **96**(1), 10-14 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.03.014>.
12. PATEL, S. B., et al. Lipid Transfer Proteins ABCG5 and ABCG8: more than a defense against xenosterols. *Journal of Lipid Research* [interaktyvus]. 2018, **59**, 1103-1113 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1194/jlr.R084244>.

13. NAKANO, T., et al. A Newly Integrated Model for Intestinal Cholesterol Absorption and Efflux Reappraises How Plant Sterol Intake Reduces Circulating Cholesterol Levels. *Nutrients* [interaktyvus]. 2019, **11**, 310 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/nu11020310>.
14. *Pathologia* [interaktyvus]. 2021 [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://pathologia.ed.ac.uk/topic/apoptosis/>.
15. TRAUTWEIN, A. E., et al. LDL-Cholesterol Lowering of Plant Sterols and Stanols—Which Factors Influence Their Efficacy? *Nutrients* [interaktyvus]. 2018, **10**, 1262 [žiūrėta 2020-06-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/nu10091262>.
16. KANG, J., et al. Molecular species determination of oligosaccharides and glycoconjugates in soybean lecithin powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [interaktyvus]. 2019, **99**, 1525-1532 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9328>.
17. RAS, R. T., et al. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: A meta-analysis of randomised controlled studies. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2014, **112**, 214-219 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1017/S0007114514000750>.
18. TADA, H., et al. Sitosterolemia, hypercholesterolemia, and coronary artery disease. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* [interaktyvus]. 2018, **25**, 783-789 [žiūrėta 2020-06-24]. Prieiga per: <http://doi.org/10.5551/jat.RV17024>.
19. SAEED, A. A., et al. Increased flux of the plant sterols campesterol and sitosterol across a disrupted blood brain barrier. *Steroids* [interaktyvus]. 2015, **99**, 183-188 [žiūrėta 2020-08-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.005>.
20. BERGER, A., et al. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease* [interaktyvus]. 2004, **3**(1), 5 [žiūrėta 2020-08-15]. Prieiga per: <http://www.lipidworld.com/content/3/1/5>.
21. SHAHI, M. M., et al. Effects of phytosterol supplementation on serum levels of lipid profiles, liver enzymes, inflammatory markers, adiponectin, and leptin in patients affected by nonalcoholic fatty liver disease: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of the American College of Nutrition* [interaktyvus]. 2018, **37**(8), 651-658 [žiūrėta 2020-06-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1466739>.
22. GHAEDI, E., et al. Possible anti-obesity effects of phytosterols and phytostanols supplementation in humans: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2019, **33**(5), 1246-1257 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/ptr.6319>.
23. ERRASFA, M. Blood Hemostasis Dysfunction and Inflammation in COVID-19 Patients: Viral and Host Active Molecules as Therapeutic Targets. *The Open Toxicology Journal* [interaktyvus]. 2020, **7**, 3 [žiūrėta 2020-06-24]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.2174/1874340402107010001>.
24. FAKIH, O., et al. Exploring the biophysical properties of phytosterols in the plasma membrane for novel cancer prevention strategies. *Biochimie* [interaktyvus]. 2018, **153**, 150-161 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.028>.
25. ORTIZ-ESCARZA, J. M., et al. On the peroxy radical scavenging ability of  $\beta$ -sitosterol in lipid media: A theoretical study. *Journal of Physical Organic Chemistry* [interaktyvus]. 2021, **34**, 4123 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/poc.4123>.

26. ALMEIDA, C. A. S., et al. One-step rapid extraction of phytosterols from vegetable oils. *Food Research International* [interaktyvus]. 2020, **130** [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108891>.
27. FERNANDES, P. & CABRAL, J. M. S. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. 2007, **98**, 2335-2350 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.006>.
28. FEDIOL (The EU Vegetable Oil and Proteinmeal Industry). *Annual Statistics: Vegetable oils production, imports, exports and consumption* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2021-03-20]. Prieiga per: <https://www.fediol.eu/>.
29. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2021-03-20]. Prieiga per: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cb1329en>.
30. YANG, R., et al. Phytosterol Contents of Edible Oils and Their Contributions to Estimated Phytosterol Intake in the Chinese Diet. *Foods* [interaktyvus]. 2019, **8**, 334 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/foods8080334>.
31. BOLLING, B. W., et al. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutrition Research Reviews* [interaktyvus]. 2011, **24**, 244-275 [žiūrėta 2020-06-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1017/S095442241100014X>.
32. LIU, Y., et al. Protocol for a randomized controlled trial to test the acceptability and adherence to 6-months of walnut supplementation in Chinese adults at high risk of cardiovascular disease. *Nutrition Journal* [interaktyvus]. 2021, **20**(3) [žiūrėta 2020-04-21]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s12937-020-00660-7>.
33. WANG, P., et al. Association of natural intake of dietary plant sterols with carotid intima-media thickness and blood lipids in Chinese adults: a cross-section study. *PLoS One* [interaktyvus]. 2012, **7**, 1-7 [žiūrėta 2020-04-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032736>.
34. AWIKA, J. M. Health promoting effects of cereal and cereal products. In: TOKUŞOĞLU, Ö. & HALL, C. *Fruit and Cereal Bioactives: Sources, Chemistry, and Applications*, [interaktyvus]. CRC Press, 2011, 9-17 [žiūrėta 2020-10-28]. ISBN 13:978-1-4398-0667-8. Prieiga per: CRC Press.
35. RACETTE, S. B., et al. Natural Dietary Phytosterols. *Journal of AOAC International* [interaktyvus]. 2015, **98**(3), 679 [žiūrėta 2020-05-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGERacette>.
36. PHILLIPS, K. M., et al. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, **53**, 9436-9445 [žiūrėta 2020-05-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf051505h>.
37. MARANGONI, F. & POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research* [interaktyvus]. 2010, **61**(3), 193-199 [žiūrėta 2020-05-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.001>.
38. DECLOEDT, A. I., et al. Fractional factorial design-based optimisation and application of an extraction and UPLC-MS/MS detection method for the quantification of phytosterols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [interaktyvus]. 2016, **408**, 7731-7744 [žiūrėta 2020-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9870-8>.

39. CASSIM, A. M., et al. Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Progress in Lipid Research* [interaktyvus]. 2019 **73**, 1-27 [žiūrėta 2020-06-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.002>.
40. GARCÍA-GONZÁLEZ, A., et al. Characterization of press and solvent extraction oils from new sunflower seeds with modified phytosterol compositions. *Society of Chemical Industry* [interaktyvus]. 2021, **101**, 101-109 [žiūrėta 2021-02-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10619>.
41. DECLOEDT, A. I., et al. Plant-Based Beverages as Good Sources of Free and Glycosidic Plant Sterols. *Nutrients* [interaktyvus]. 2018, **10**, 21 [žiūrėta 2020-05-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/nu10010021>.
42. MANIET, G., et al. Recovery of sterols from vegetable oil distillate by enzymatic and non-enzymatic processes. *Comptes Rendus Chimie* [interaktyvus]. 2019, **22**, 347-353 [žiūrėta 2020-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.01.004>.
43. ALBERDI – CEDEÑO, J., et al. A new methodology capable of characterizing most volatile and less volatile minor edible oils components in a single chromatographic run without solvents or reagents. Detection of new components. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2017, **221**, 1135-1144 [žiūrėta 2020-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.046>.
44. UBEYITOGULLARI, A & CIFTCI, O. N. In vitro bioaccessibility of novel low-crystallinity phytosterol nanoparticles in non-fat and regular-fat foods. *Food Research International* [interaktyvus]. 2019, **123**, 27- 35 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.014>.
45. UDDIN, M. S., et al. Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review. *Separation Science and Technology* [interaktyvus]. 2018, **53**(14), 2206-2223 [žiūrėta 2020-04-22]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1454472>.
46. GOLOLO, S. S., et al. Isolation of a mixture of Phytosterol compounds from the n-Hexane extract of *Jatropha lagarinthoides* (Sond) collected from Zebediela sub-region in Limpopo province, South Africa. *Journal Chemical Pharmaceutical Sciences*. 2016, **9**(4), 3084-3087. ISSN 0974-2115.
47. NYSTRÖM, L. Analysis methods of phytosterols. In XU, Zhimin. & HOWARD, Luke R. *Analysis of Antioxidant Rich Phytochemicals* [interaktyvus]. Wiley, 2012, 313-351 [žiūrėta 2020-07-21]. ISBN:9781118229378. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/9781118229378.ch10>.
48. NURMI, T., et al. Distribution and composition of phytosterols and steryl ferulates i wheat grain and bran fractions. *Journal Cereal Sciences* [interaktyvus]. 2012, **56**, 379-388 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.04.010>.
49. ROIAINI, M., et al. Effect of extraction methods on yield, oxidative value, phytosterols and antioxidant content of cocoa butter. *International Food Researcher Journal* [interaktyvus]. 2016, **23**(1), 47-54 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per: [http://ifrj.upm.edu.my/23%20\(01\)%202016/\(8\).pdf](http://ifrj.upm.edu.my/23%20(01)%202016/(8).pdf).
50. HERCHI, W., et al., Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. 2009, **47** 880-885 [žiūrėta 2020-10-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.07.001>.
51. XU, L & LIU, S. Forecasting structure of natural products through color formation process by thin layer chromatography. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2021, 127496 [žiūrėta 2020-10-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127496>.

52. CILIBERTI, M. G., et al. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* Reduce Cell Proliferation in Sheep Fed Flaxseed during Post Partum. *Marine drugs* [interaktyvus]. 2017, **217**(15), 216 [žiūrėta 2020-10-08]. Prieiga per: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmd15070216>.
53. FRANCAVILLA, M., et al. Extraction, characterization and in vivo neuromodulatory activity of phytosterols from microalga *dunaliella tertiolecta*. *Current Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2012, **19**(18), 3058-3067 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.2174/092986712800672021>.
54. PHILLIPS, K. M., et al. Analysis of steryl glucosides in foods and dietary supplements by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Food Lipids* [interaktyvus]. 2005, **12**, 124-140 [žiūrėta 2020-10-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2005.00011.x>.
55. LUCCI, P., et al. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. In: CALDERON, Leonardo. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* [interaktyvus]. Intech, 2012, 129-130 [žiūrėta 2021-02-04]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.5772/47736>.
56. MOGADDAM, M. R. A., et al. Dispersive solid phase extraction combined with solidification of floating organic drop–liquid–liquid microextraction using in situ formation of deep eutectic solvent for extraction of phytosterols from edible oil samples. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 2020, **1630**(25), 461523 [žiūrėta 2020-10-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461523>.
57. BISWAS, S., et al. An insight into functional food. *Journal of the Gujarat Research Society*. 2019, **21**(8), 746-451. ISSN 0374-8588.
58. ERGIN, F., et al. Effect of total solids standardization using different methods on mineral content of yoghurt. *Mljekarstvo* [interaktyvus]. 2021, **71**(2) 103-111 [žiūrėta 2021-03-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2021.0203>.
59. MUDGIL, D & BARAK, S. Dairy-Based Functional Beverages. In: GRUMEZESCU, A. M & HOLBAN, A. M. *Milk-based beverages* [interaktyvus]. Elsevier, 2019, 67-89 [žiūrėta 2020-11-12]. ISBN: 978-0-12-815711-4. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-2.00003-7>.
60. MINJ, J., et al. Significance of Fortification of Beneficial Natural Ingredients in Milk and Milk Products. In: PREEDY, V. L., et al. *Handbook of Food Fortification and Health: From Concepts to Public Health Applications* [interaktyvus]. Springer Science, 2020, 88-109 [žiūrėta 2020-11-12]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4\\_5#DOI](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4_5#DOI).
61. GALANAKIS, C. M. Functionality of Food Components and Emerging Technologies. *Foods* [interaktyvus]. 2021, **10**, 128 [žiūrėta 2020-12-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/foods10010128>.
62. SANTOSA, V. S., et al. Nanostructured lipid carriers loaded with free phytosterols for food applications. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2019, **298**, 125053 [žiūrėta 2020-12-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125053>.
63. KAMGANG NZEKOU, F., et al. Development of a functional whey cheese (ricotta) enriched in phytosterols: Evaluation of the suitability of whey cheese matrix and processing for phytosterols supplementation. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2021, 1-6 [žiūrėta 2020-12-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110479>.

64. TOLVE, R., et al. Microencapsulation as a Tool for the Formulation of Functional Foods: The Phytosterols' Case Study. *Foods* [interaktyvus]. 2020, **9**, 470 [žiūrėta 2020-12-21] Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/foods9040470>.
65. MCCLEMENTS, D. J. & ÖZTÜRK, B. Utilization of Nanotechnology to Improve the Handling, Storage and Biocompatibility of Bioactive Lipids in Food Applications. *Foods* [interaktyvus]. 2021, **10**, 365 [žiūrėta 2020-12-21] Prieiga per: <https://dx.doi.org/10.3390%2Ffoods10020365>.
66. NINGTYAS, D. W., et al. Flavour profiles of functional reduced-fat cream cheese: Effects of  $\beta$ -glucan, phytosterols, and probiotic *L. rhamnosus*. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2019, **105**, 16-22 [žiūrėta 2020-12-21] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.063>.
67. MELALEUCA, INC. (US). *Dietary supplement compositions for cardiovascular health. Patent application publication*. Int. Cl: A61K 31/575; A61K 31/122; A61K 31/385; A61K 9/48; A23L 33/10; A61K 38/48; A61K 9/00; A23L 33/11; A23L 33/12; A61K 31/202; A61K 9/20. US 2017/0209463 A1, 2017 07 27. United States Patent Application Publication [žiūrėta 2020-12-20]. Prieiga per: Google Patents.
68. LOTTE FINE CHEMICAL CO., LTD. (SK). *Functional beverage. Patent application publication*. Int. Cl: A23L 2/38; A23L 2/66; A23C 9/156; A23L 2/56; A23C 9/152; A23C 9/133. US 2017/0027194 A1, 2017 02 02. United States Application publication [žiūrėta 2020-12-20]. Prieiga per: Google Patents.
69. MATSUTANI CHEMICAL INDUSTRY CO.,LTD., Hyogo (JP). *Powdered plant sterol ester-containing preparations, method for preparing the same and foods and drinks containing the same. Patent application publication*. Int. Cl: A23L 1/30; A61K 47/00; A61K 38/17; A23L 1/308; A23L 2/52. US 9, 462, 823 B2, 2016 10 11. United States Application publication [žiūrėta 2020-12-20]. Prieiga per: Google Patents.
70. NAGARAJAPPAA, V. & BATTULAA, S. N. Effect of fortification of milk with omega-3 fatty acids, phytosterols and soluble fibre on the sensory, physicochemical and microbiological properties of milk. *Journal Science Food Agricultural* [interaktyvus]. 2017, **97**, 4160-4168 [žiūrėta 2020-12-21] Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8286>.
71. GHAYOUR, N., et al. Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. *Food Hydrocoll* [interaktyvus]. 2019, **87**, 394-403 [žiūrėta 2020-12-21] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.031>.
72. MALMIRI, H. J., et al. Nano-additives for Food Industries. In: MALMIRI, H. J., et al. *Nanobiotechnology in Food: Concepts, Applications and Perspectives* [interaktyvus]. 2019, 46-58 [žiūrėta 2020-12-28]. ISBN 978-3-030-05846-3. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-05846-3>.
73. DASGUPTA, N., et al. Nanoemulsions in food: market demand. *Environmental Chemistry Letters* [interaktyvus]. 2019, **17**, 1003-1009 [žiūrėta 2021-02-02] Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01216-9>.
74. LAS CONDES (CL). *Dispersion of phytosterols. Patent application publication*. Int. Cl: A61K 31/575; A61P 3/06; A23D 7/005; A23C 9/13; A23C 9/152; A23L 27/60; A23L 33/11. US 9,629,378 B2, 2017 04 25. United States Application publication [žiūrėta 2020-12-20]. Prieiga per: Google Patents.

75. GIES, M., et al. Incorporation and stability of carotenoids in a functional fermented maize yogurt-like product containing phytosterols. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2019, **111**, 105-110 [žiūrėta 2020-12-21] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.103>.
76. HELENO, S. A., et al. Development of dairy beverages functionalized with pure ergosterol and mycoesterol extracts: an alternative to phytosterol-based beverages. *Food Function* [interaktyvus]. 2017, **8**, 103-110 [žiūrėta 2020-12-28] Prieiga per: <https://doi.org/10.1039/c6fo01600f>.
77. CORREA, R. C. G., et al. The emerging use of mycoesterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2017, **67**, 19-35 [žiūrėta 2020-12-27] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.012>.
78. MOUSSA OLFA, B., et al. The Combined Effect of Phytosterols and Lactulose Supplementation on Yoghurt Quality. *Journal of Food and Nutrition Research* [interaktyvus]. 2019, **7**(4), 261-269 [žiūrėta 2020-12-27] Prieiga per: <http://www.sciepub.com/journal/JFNR>.
79. PARSA, P., et al. Optimisation of probiotic yoghurt production enriched with phytosterols. *International Journal of Dairy Technology* [interaktyvus]. 2015, **68**(4) [žiūrėta 2020-12-28] Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12207>.
80. ABDEL-HAMEED, E. S., et al. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, **160**, 31-38 [žiūrėta 2020-12-28] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.060>.
81. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 20483:2013], *Cereals and pulses — Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content — Kjeldahl method* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
82. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 11085:2015], *Cereals, cereals-based products and animal feeding stuffs — Determination of crude fat and total fat content by the Randall extraction method* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
83. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 2171:2007], *Cereals, pulses and by-products — Determination of ash yield by incineration* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
84. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 15914:2004], *Animal feeding stuffs — Enzymatic determination of total starch content* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
85. MRIDULA, D., et al. Screw pressing performance of whole and dehulled flaxseed and some physico-chemical characteristics of flaxseed oil. *Journal Food Science Technology* [interaktyvus]. 2015, **52**(3), 1498-1506 [žiūrėta 2021-03-05]. Prieiga per: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13197-013-1132-6>.
86. BENDIF, H., et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Rosmarinus eriocalyx* growing in Algeria: Chemical composition and antioxidant activity of extracts and their solid plant materials. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2018, **111**, 768-774. [žiūrėta 2021-03-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.056>.

87. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 3657:2013], *Animal and vegetable fats and oils — Determination of saponification value* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
88. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 6320:2017], *Animal and vegetable fats and oils — Determination of refractive index* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
89. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 6321:2002], *Animal and vegetable fats and oils — Determination of melting point in open capillary tubes (slip point)* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
90. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 12966-1:2014], *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
91. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 12966-2:2017], *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
92. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 12966-4:2015], *Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 4: Determination by capillary gas chromatography* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
93. XU, B., et al. Determination of free steroidal compounds in vegetable oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-offlight mass spectrometry. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, **245**, 415-425 [žiūrėta 2021-01-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.114>.
94. WANG, et al. Quantitative determination of free and esterified phytosterol profile in nuts and seeds commonly consumed in China by SPE/GC–MS. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2019, **100**, 353-361 [žiūrėta 2021-01-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.077>.
95. TAMKUTĖ, L., et al. Fractionation of cranberry pomace lipids by supercritical carbon dioxide extraction and on-line separation of extracts at low temperatures. *The Journal of Supercritical Fluids* [interaktyvus]. 2020, **163**, 104884. [žiūrėta 2021-03-17] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104884>.
96. LIUTKEVIČIUS, A ir kt. Rūgpienio su konjuguota linolo rūgštimi ir probiotikais savybės bei technologijos ypatumai. *Veterinarija ir Zootechnika* [interaktyvus]. 2009, **45**(67), 33-40. [žiūrėta 2021-04-07] Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/258606660>.
97. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 6887-1:2017], *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
98. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 11133:2014], *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and*

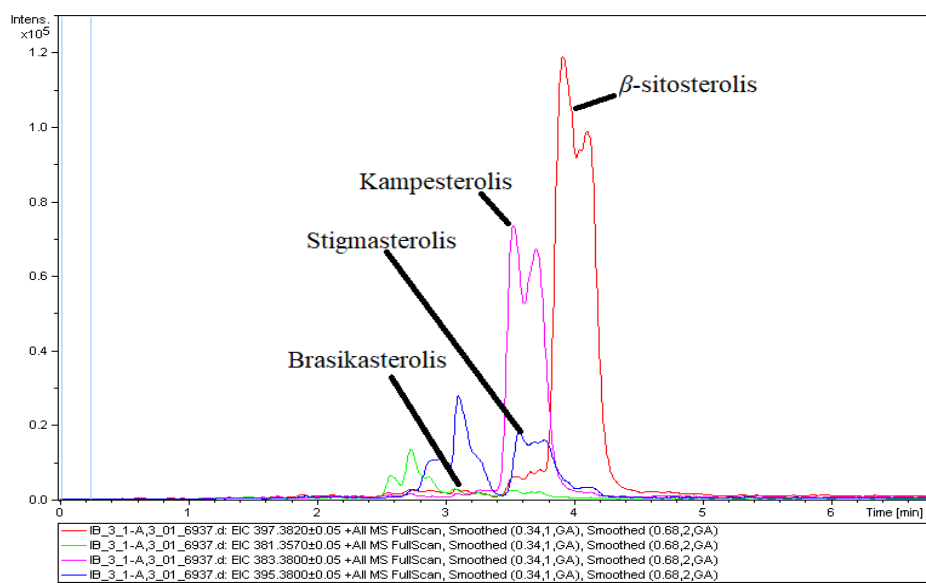
- performance testing of culture media dilutions* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
99. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. [ISO 4833-1:2013]. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique* [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-02-22]. Prieiga per: <https://www.iso.org/standards.html>.
  100. LEONARD, W. et al. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safet* [interaktyvus]. 2020, **19**, 282-308. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12517>.
  101. LI, M. et al. Nutritional evaluation of whole soybean curd made from different soybean materials based on amino acid profiles. *Food Quality and Safety* [interaktyvus]. 2020, **4**, 41-50. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa011>.
  102. ZOU, Y., et al. Effect of roasting on physico-chemical properties, antioxidant capacity, and oxidative stability of wheat germ oil. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2018, **90**, 246-253. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://www.x-mol.com/paperRedirect/493797>.
  103. ETIOSA, O. R., et al. Mineral and Proximate Composition of Soya Bean. *Asian Journal of Physical and Chemical Sciences* [interaktyvus]. 2017, **4**(3), 1-6. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.9734/AJOPACS/2017/38530>.
  104. HU, L., et al. Structural Properties of Homogeneous Polysaccharide Fraction Released from Wheat Germ by Hydrothermal Treatment. *Carbohydrate Polymers* [interaktyvus]. 2020, **240**, 116238. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116238>.
  105. SHEN, P., et al. The impact of hempseed dehulling on chemical composition, structure properties and aromatic profile of hemp protein isolate. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2020, 105889. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://www.x-mol.com/paperRedirect/1247732268673208320>.
  106. EGANATHAN, P., et al. Oil analysis in seeds of *Salicornia brachiata*. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2006, **23**, 177-179. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.05.007>.
  107. SYMONIUK, E., et al. Oxidative stability and the chemical composition of market cold-pressed linseed oil. *Archives of Applied Science Research* [interaktyvus]. 2013, **5**(1):5-8. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700055>.
  108. IKHAZUAGBE, H., et al. Correlative studies on the properties of rubber seed and soybean oil-based alkyd resins and their blends. *Journal of Coatings Technology and Research* [interaktyvus]. 2020, **6**. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://www.x-mol.com/paperRedirect/1323711641915985920>.
  109. ZHAO, X., et al. Distribution and effects of natural selenium in soybean proteins and its protective role in soybean  $\beta$ -conglycinin (7S globulins) under AAPH-induced oxidative stress. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2019, **272**(30), 201-209. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.039>.
  110. MIGUEL, A., et al. Effect of tomato (*Solanum lycopersicum*L.) lycopene-rich extract on the kinetics of rancidity and shelf-life of linseed (*Linum usitatissimum*L.) oil. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, **302**, 125327. [žiūrėta 2021-04-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125327>.

- 111.RAMAMOORTHY, S. K., et al. Preparation and Characterization of Biobased Thermoset Polymers from Renewable Resources and Their Use in Composites. *Composites from Renewable Materials* [interaktyvus]. 2017, **11**. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/9781119441632.ch55>.
- 112.SMITH, R. S., et al. Ion Channel Functions in Early Brain Development. *Trends in Neurosciences* [interaktyvus]. 2020, **43**(2), 103-114. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.12.004>.
- 113.KUMAR, P., et al. Fatty Acids as Antibiofilm and Antivirulence Agents. *Trends in Microbiology* [interaktyvus]. 2020, **28**(9), 8-16. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.014>.
- 114.ROGERO, M. M., et al. Potential benefits and risks of omega-3 fatty acids supplementation to patients with COVID-19. *Free Radical Biology and Medicine* [interaktyvus]. 2020, **156**(20), 190-199. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.freeradbiomed.2020.07.005>.
- 115.ZOU, Y., et al. Effect of roasting on physico-chemical properties, antioxidant capacity, and oxidative stability of wheat germ oil. *LWT - Food Science and Technology Medicine* [interaktyvus]. 2018, **90**, 246-253. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.038>.
- 116.NUNES, C., et al. Microstructural analysis of lime paste with the addition of linseed oil, stand oil, and rapeseed oil. *Construction and Building Materials* [interaktyvus]. 2020, **238**, 117780. [Žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://www.x-mol.com/paperRedirect/5997760>.
- 117.BABIKER, E. E., et al. Effect of roasting on antioxidative properties, polyphenol profile and fatty acids composition of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *LWT-Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2021, **139**, 110537. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110537>.
- 118.HAGELY, K., et al. Molecular-assisted breeding for soybean with high oleic/low linolenic acid and elevated vitamin E in the seed oil. *Molecular Breeding* [interaktyvus]. 2021, **41**(3), 1-13. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01184-y>.
- 119.ISHIKAWA, Y. & FURUYA, J. Soybean Rust and Resistant Cultivar Effects on Global Soybean Supply and Demand. *Japan Agricultural Research Quarterly* [interaktyvus]. 2021, **55**(1), 59-67. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.6090/jarq.55.59>.
- 120.QIAN, J., et al. NMR detection of fatty acids content in walnut oil and compared with liquid chromatography. *Journal of Food Measurement and Characterization* [interaktyvus]. 2021, 1-11. [žiūrėta 2021-04-22] Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00813-0>.
- 121.GANGOPADHYAY, N., et al. Brans of the roller-milled barley fractions rich in polyphenols and health-promoting lipophilic molecules. *Journal of Cereal Science* [interaktyvus]. 2018, **83**, 213-221. [Žiūrėta 2021-05-05] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.017>.
- 122.ALVES DA SILVA S., et al. Phytosterols Content in Vegetable Oils of Brazil: Coconut, Safflower, Linseed and Evening Primrose. *Article - Food/Feed Science and Technology* [interaktyvus]. 2020, **63**, 20190216. [žiūrėta 2021-05-05] Prieiga per: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190216>.
- 123.LEONARD W., et al. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety* [interaktyvus]. 2020, **19**, 282-308. [Žiūrėta 2021-05-05] Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12517>.

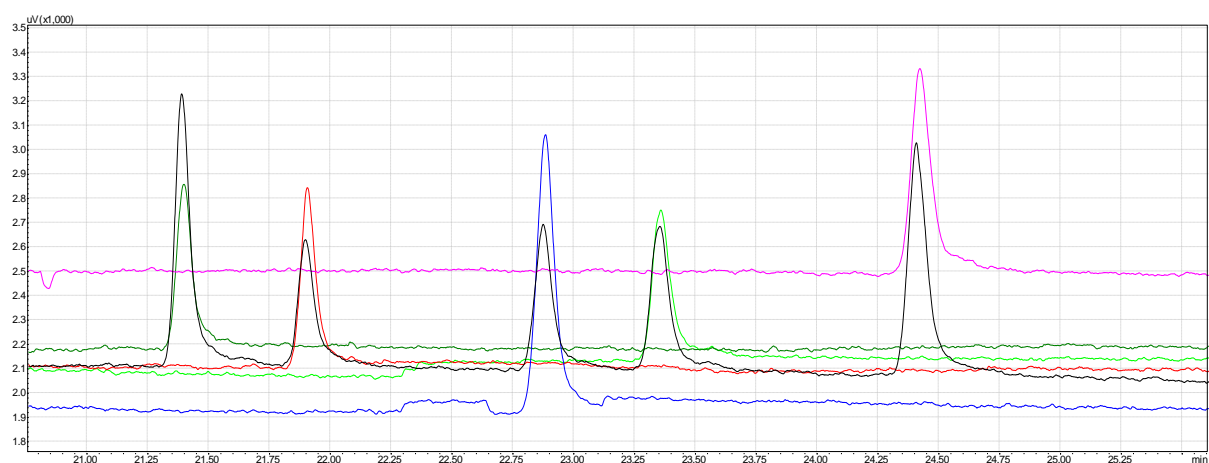
124. Naz, S., et al. Comparison of flaxseed oil characteristics of three Pakistani varieties obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and two conventional extraction methods. *International Food Research Journal* [interaktyvus]. 2019, **26**(5), 1599-1607. [žiūrėta 2021-05-05] Prieiga per: <http://www.ifrj.upm.edu.my>.
125. VEZZA, T., et al. Phytosterols: Nutritional Health Players in the Management of Obesity and Its Related Disorders. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2020, **9**, 1266. [žiūrėta 2021-05-13] Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/antiox9121266>.
126. SALEHI, B., et al. Phytosterols: From Preclinical Evidence to Potential Clinical Applications. *Frontiers in Pharmacology* [interaktyvus]. 2021, **11**, 599959. [žiūrėta 2021-05-13] Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.599959>.
127. EUROPOS KOMISIJA. *Kuriuo iš dalies keičiamos reglamentų (EB) Nr. 983/2009 ir (ES) Nr. 384/2010 nuostatos dėl tam tikrų sveikumo teiginių, susijusių su augalinių sterolių ir augalinių stanolių poveikiu ir MTL cholesterolio kiekio kraujyje mažinimu, vartojimo sąlygu* [interaktyvus]. 2014 m. birželio 20 d., Nr. 686/2014 [žiūrėta 2021-05-13] Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/>.
128. COMUNIAN, T. A., et al. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2017, **237**, 948-956. [žiūrėta 2021-05-05] Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.071>.
129. MOSCHAKIS, T., et al. Modulating the physical state and functionality of phytosterols by emulsification and organogel formation: Application in a model yogurt system. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2017, **33**, 386-395. [žiūrėta 2021-05-12] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.007>.
130. IZADI, Z., et al. Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, **52**(8), 5341-5346. [žiūrėta 2021-05-12] Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1593-2>.
131. FENG, S., et al., A review on chemical and physical modifications of phytosterols and their influence on bioavailability and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2021, 1-20. [žiūrėta 2021-05-12] Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1888692>.
132. GALLIER, S., et al. The Milk Fat Globule Membrane: Structure, Methodology for its Study, and Functionality. In: BOLAND, M. *Food Structures, Digestion and Health* [interaktyvus] Elsevier Inc. All rights reserved, 2014, 107-142. [žiūrėta 2021-05-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404610-8.00004-9>.
133. CHOI, N., et al. Production of phytosteryl ester from echium oil in a recirculating packed bed reactor using an immobilized lipase. *Journal of Oleo Science* [interaktyvus]. 2017, **66**(12), 1329-35. [žiūrėta 2021-05-12] Prieiga per: <https://doi.org/10.5650/jos.ess17070>.
134. BENATTOUCHE, Z., et al. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria isolated from yogurt. *International Journal of Food Studies* [interaktyvus], 2018, **7**, 30-37. [žiūrėta 2021-05-10] Prieiga per: <https://doi.org/10.7455/ijfs/7.2.2018.a3>.

## PRIEDAI

### 1 priedas. Linų sėmenų chromatograma. Aukšto efektyvumo skysčių chromatografija



**2 priedas. Standartų chromatograma: raudona – brasikasterolis, mėlyna – kampesterolis, žalia – stigmasterolis, rožinė –  $\beta$ -sitosterolis. Dujų chromatografijos metodas**



### 3 priedas. Brasikasterolio kalibracinė kreivė

