



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Šaltalankio uogų išspaudų frakcijų pritaikymas duonos mitybinei vertei ir kokybei pagerinti

Baigiamasis magistro projektas

Laura Baužaitė

Projekto autorė

prof. dr. P. R. Venskutonis

Vadovas

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Šaltalankio uogų išspaudų frakcijų pritaikymas duonos mitybinei vertei ir kokybei pagerinti

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Laura Baužaitė

Projekto autorė

prof. dr. P. R. Venskutonis

Vadovas

vyr. m. d. dr. Žadeikė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Laura Baužaitė

Šaltalankio uogų išspaudų frakcijų pritaikymas duonos mitybinei vertei ir kokybei pagerinti

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) 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 mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Laura Baužaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Baužaitė, Laura. Šaltalankio uogų išspaudų frakcijų pritaikymas duonos mitybinei vertei ir kokybei pagerinti. Magistro baigiamasis projektas / vadovas prof./doc. dr. P. R. Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: šaltalankių sėklos, odelės, išspaudos, ekstraktai, duona, mitybinės vertės pagerinimas.

Kaunas, 2021. 66 p.

Santrauka

Šaltalankių uogų išspaudos, kurias sudaro sėklos, odelės (egzokarpis) ir minkštimo (mezokarpio ir endocarpio) liekanos, pasižymi unikalia bioaktyvių komponentų sudėtimi. Jose yra vertingų lipidų, maistinių skaidulų ir fenolinių junginių, kurie pasižymi antioksidaciniu aktyvumu ir gali būti naudingais žmogaus sveikatai. Šiuo metu uogų perdirbimo metu sudarančios išspaudos panaudojamos neefektyviai arba net išmetamos ir dėl to prarandama daug vertingos žaliavos, kuri galėtų būti pritaikyta funkcionaliems maisto produktams bei maisto papildams kurti.

Šio darbo tikslas – pritaikyti aukšto slėgio ekstrakcijos metodais pagrįstą biorafinavimo procesą dygliuotųjų šaltalankių (lot. *Hippophae rhamnoides* L.) uogų išspaudų frakcionavimui siekiant išgauti iš jų funkcionaliuosius komponentus, bei įvertinti jų panaudojimo galimybes duonos mitybinei vertei padidinti.

Išspaudos buvo mechaniškai frakcionuojamos atskiriant sėklas nuo kitų dalių ir sumaltos. Didžiausias dalelių dydžio pasiskirstymo vidurkis pagal paviršiaus plotą buvo nustatytas šaltalankių odelėse praėjusiose per 0,5 mm dydžio sietą ($224 \pm 9 \mu\text{m}$), o didžiausias dalelių dydžio pasiskirstymas pagal tūrį buvo sėklose ($553 \pm 40 \mu\text{m}$) ir odelėse ($546 \pm 30 \mu\text{m}$) praėjusiose per 0,5 mm dydžio sietą. Sumaltos frakcijos buvo ekstrahuojamos superkriziniu anglies dvideginiu ir iš išspaudų, sėklų ir odelių gauta atitinkamai 10,73%, 14,67% ir 10,35% ekstrakto. Odelių ekstraktas pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu: ABTS^{•+} sujungimo geba – $52,2 \pm 0,7$ mg trolokso ekvivalentų (TE)/g, deguonies radikalo absorbcijos geba (ORAC) – $59,1 \pm 1,0$ mg TE/g, bendrasis fenolinių junginių kiekis (TPC) – $7,15 \pm 0,04$ mg galo rūgšties ekvivalentų (GAE)/g).

Nuriebalintos superkriziniu CO₂ išspaudų frakcijos buvo toliau ekstrahuojamos poliškais tirpikliais – etanoliu ir vandeni. Didžiausia išeiga gauta iš šaltalankių odelių 15,38 %, o naudojant etanolį ir vandenį didžiausia išeiga gauta iš nefrakcionuotų išspaudų - 16,29 %. Iš visų etanolinių ekstraktų didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo išspaudų ekstraktas (ABTS^{•+} – $253,2 \pm 1,1$ mg TE/g, ORAC – $331,6 \pm 21,3$ mg TE/g, TPC – $72,9 \pm 1,7$ mg TE/g), o naudojant etanolį ir vandenį sėklų ekstraktas (ABTS^{•+} – $426,7 \pm 0,6$ mg TE/g, ORAC – $535,4 \pm 24,8$ mg TE/g, TPC – $131,5 \pm 4,4$ mg GAE/g ekstrakto).

Nuriebalintos šaltalankio uogų išspaudų frakcijos buvo išbandytos duonos receptūroje, pakeičiant jomis dalį miltų. Buvo įvertinta tokio pakeitimo įtaka duonos tūriui, akytumui, drėgnumui, spalvai, baltymų ir mineralinių medžiagų kiekiui, antioksidacinėms savybėms. Nustatyta, kad didinant pridedamą į tešlą išspaudų kiekį duonos spalva tapo vis tamsesne. Pridėtos šaltalankių išspaudos reikšmingai pakeitė duonos skonį. Taigi atlikti tyrimai parodė, kad šaltalankių uogų išspaudos pasižymi bioaktyviais junginiais, jų sudėtis lemia duonos padidėjusį antioksidacinį aktyvumą ir

tekstūros savybes, todėl šaltalankių uogų išspaudos gali būti naudojamos didesnės pridėtinės vertės produktų kūrimui.

Baužaitė, Laura. Application of Sea Buckthorn Berry Pomace Fractions for Increasing Nutritional Value and Quality of Bread. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. P. R. Venskutonis; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: sea buckthorn seeds, skins, pulp, extracts, bread, nutritional improvement.

Kaunas, 2021. 66 p.

Summary

Sea buckthorn berry pomace, which consists of seeds, skin and pulp residues, has a unique composition of nutrients and bioactive components. They include valuable lipids, proteins, dietary fiber and phenolic compounds which have antioxidant activity and can be beneficial to human health. At present, the pomace that is generated during berry processing is used inefficiently or even discarded, resulting in the loss of a lot of valuable raw material that could be used in the development of functional foods, food supplements, cosmetics and other purposes.

The aim of this work is to apply a high-pressure extraction-based biorefining process for the fractionation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry pomace in order to extract their functional components, and to evaluate their use for increasing the nutritional value of bread.

The pomace seeds were separated from the other parts and ground. The highest mean of particle size distribution by surface area was found in buckthorn skins crushed through a 0.5 mm sieve ($224 \pm 9 \mu\text{m}$), and the highest particle size distribution by volume was found in seeds ($553 \pm 40 \mu\text{m}$) and skins ($546 \pm 30 \mu\text{m}$) crushed through a 0,5 mm sieve. The ground fractions were extracted with supercritical carbon dioxide to give 10.73%, 14.67% and 10.35% of the extract from the pulp, seeds and skins, respectively. The cuticle extract had the highest antioxidant activity: ABTS^{•+} binding capacity - 52.2 ± 0.7 mg trolox equivalents (TE)/g, oxygen radical absorption capacity (ORAC) - 59.1 ± 1.0 mg TE/g, total phenolic content (TPC) - 7.15 ± 0.04 mg gallic acid equivalents (GAE)/g).

The defatted by supercritical CO₂ pomace fractions were further extracted with polar solvents - ethanol and water. the highest yield was obtained for sea buckthorn skins 15.38%, and with ethanol and water the highest yield was obtained for pulp 16.29%. Of all ethanol extracts, the extract of pomace had the highest antioxidant activity (ABTS^{•+} - 253.2 ± 1.1 mg TE/g, ORAC - 331.6 ± 21.3 mg TE/g, TPC - 72.9 ± 1.7 mg TE/g) and using ethanol and water seed extract (ABTS^{•+} - 426.7 ± 0.6 mg TE / g, ORAC - 535.4 ± 24.8 mg TE / g, TPC - 131.5 ± 4.4 mg GAE / g extract).

Defatted sea buckthorn berry pomace fractions were tested in the bread recipe by replacing part of the flour with them. The effect of such a change on bread volume, porosity, moisture, color, protein and mineral content, antioxidant properties was evaluated. It was found that when the dough was added to the dough, the final color of the bread darkened, the higher the concentration of the bread added, the darker the color of the baked bread. The added sea buckthorn pulp significantly changed the taste of the bread. Thus, research has shown that sea buckthorn berries have bioactive compounds, their composition determines the antioxidant and textural properties of bread, so sea buckthorn berries can be used to develop higher value-added products.

TURINYS

LENTELIŲ SĄRAŠAS	9
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	10
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	11
ĮVADAS	12
1. ŠALTALANKIŲ UOGOS, JŲ SUDĖTIS, PERDIRBIMAS IR PANAUDOJIMAS: LITERATŪROS ANALIZĖ	14
1.1. Šaltalankiai	14
1.1.1. <i>Hippophae rhamnoides L</i>	14
1.2. Šaltalankių sudėtis, savybės ir panaudojimas	16
1.2.1. Cheminė sudėtis.....	16
1.2.2. Bioaktyvūs junginiai.....	17
1.2.3. Antioksidantinės savybės	18
1.2.4. Pritaikymas ir panaudojimas	19
1.2.5. Gydomosios savybės	19
1.3. Ekstrakcijos metodai	20
1.3.1. Ekstrakcija superkritiniais skysčiais.....	20
1.3.2. Subkritinė vandens ekstrakcija.....	22
1.3.3. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais	22
1.4. Uogų šalutinių produktų pritaikymas funkcionaliajam maistui	23
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	24
2.1. Tyrimo objektai	24
2.2. Standartiniai tyrimų metodai	24
2.2.1. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas.....	24
2.2.2. Drėgmės ir sausųjų medžiagų kiekio nustatymas.....	24
2.2.3. Baltymų kiekio nustatymas	25
2.2.4. Bendro lipidų kiekio nustatymas	26
2.2.5. Skaidulinių medžiagų nustatymas	26
2.2.6. Uogų sėklų, išspaudų ir jų mišinio dalelių dydžio.....	27
2.2.7. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE - CO ₂)	28
2.2.8. Ekstrakcija suslėgtais skysčiais	28
2.2.9. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu.....	29
2.2.10. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin – Ciocalteu metodu.....	30
2.2.11. 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS ^{•+}) laisvųjų radikalų katijonų surišimo metodas	30
2.2.12. Deguonies radikalų absorbcijos gebos nustatymas (ORAC).....	31
2.2.13. Tokoferolių ir fitosterolių nustatymas	31
2.2.14. Triacilglicerolių sudėties nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu	32
2.2.15. Karotinoidų analizė	32
2.2.16. Duonos su skirtingomis šaltalankių frakcijomis gamyba	32
2.2.17. Drėgmės kiekio nustatymas duonoje.....	33
2.2.18. Duonos tūrio nustatymas	33
2.2.19. Duonos minkštimo aktyvumo nustatymas.....	34

2.2.20. Duonos spalvos įvertinimas.....	34
2.2.21. Juslinė duonos analizė	34
2.2.22. Virškinimo <i>in vitro</i> proceso įvertinimas.....	35
2.2.23. Statistinė analizė	35
3.TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	36
3.1. Šaltalankių sėklų, išspaudų ir jų mišinio cheminės sudėties įvertinimas	36
3.2. Skaidulinių medžiagų įvertinimas skirtinguose šaltalankių frakcijose.....	37
3.3. Šaltalankių frakcijų dalelių pasiskirstymas	37
3.4. Ekstrakcijų nepoliniais tirpikliais įvertinimas	39
3.5. Ekstrakcijų poliniais tirpikliais įvertinimas	42
3.6. Riebalų rūgščių įvertinimas	43
3.7. Skirtingų šaltalankių frakcijų ekstraktų, gautų skirtingais ekstrakcijos metodais antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.	44
3.8. Tokoferolių ir fitosterolių sudėties įvertinimas skirtinguose šaltalankių frakcijose.....	46
3.9. Triacilglicerolių sudėtis skirtinguose šaltalankių frakcijose gautose skirtingais ekstrakcijos metodais.....	48
3.10. Bendras karotenoidų ir β – karoteno kiekis šaltalankių frakcijų ekstraktuose po SKE – CO ₂ . 48	
3.11. Duona su šaltalankių skirtingomis frakcijomis	49
3.12. Duonos su skirtingomis šaltalankių frakcijomis po ekstrakcijos spalvos įvertinimas.....	51
3.13. Baltymų kiekio priklausomybė nuo skirtingų šaltalankių ekstraktų liekanų duonoje.....	52
3.14. Skirtingų duonos rūšių juslinė analizė.....	52
3.15. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas virškinimo metu	53
IŠVADOS	55
PADĖKA	56
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	57

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Šaltalankių vaisiuose esančių bioaktyvių ingredientų sudėtis ir jų reikšmė žmogaus sveikatai [21, 35, 36]	17
2 lentelė. Medžiagų kritiniai parametrai [53]	21
3 lentelė. Funkcinio maisto rūšių apibūdinimai [65]	23
4 lentelė. Prancūziškos duonos receptūros ingredientai	33
5 lentelė. Šaltalankių prieš ir po SKE-CO ₂ cheminė sudėtis	36
6 lentelė. Šaltalankių frakcijų dalelių dydžio pasiskirstymas	38
7 lentelė. Riebalų rūgščių esančių skirtinguose šaltalankių frakcijose priklausomybė nuo ekstrakcijos metodų	44
8 lentelė. Šaltalankių ekstraktų bendrasis fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas... 45	45
9 lentelė. Tokoferolių ir fitosterolių sudėties palyginimas šaltalankių sėklose, odelėse ir išpaudose po SKE – CO ₂	47
10 lentelė. Tokoferolių ir fitosterolių sudėties palyginimas šaltalankių sėklose, odelėse ir išpaudose po Soksleto ekstrakcijos (SOK)	47
11 lentelė. Duonos minkštimo aktyvumo, tūrio ir drėgmės kiekio priklausomybė nuo skirtingų duonos rūšių	50
12 lentelė. Šaltalankių ekstraktų liekanų po SKE – CO ₂ poveikis duonos spalvai	51
13 lentelė. Duonos su skirtingomis šaltalankių frakcijomis įtaka baltymų kiekiui	52
14 lentelė. Antioksidantų aktyvumas skirtingose virškinimo fazėse	54

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Šaltalankių augalas [13].....	15
2 pav. <i>Hippophae rhamnoides ssp. rhamnoides</i> skirtingo dydžio ir spalvos uogos.....	15
3 pav. CO ₂ tankio – slėgio fazių diagrama [53]	20
4 pav. Superkritinių skysčių ekstrakcinės sistemos schema [53]	28
5 pav. Pagreitinotos skysčių ekstrakcijos schema[53].....	29
6 pav. Skaidulinių medžiagų įvertinimas skirtingose šaltalankių frakcijose prieš ir po superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE – CO ₂) ir ekstrakciją padidinto slėgio aplinkoje su etanoliu (ETPS – EtOH).....	37
7 pav. Šaltalankių skirtingų frakcijų susmulkintų per 0,2 mm dydžio sietą pasiskirstymas pagal dažnį	38
8 pav. Šaltalankių skirtingų frakcijų susmulkintų per 0,5 mm dydžio sietą pasiskirstymas pagal dažnį	39
9 pav. Šaltalankių žaliavos (0,2 mm) ekstrakcijos išėigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės. SKE-CO ₂ ekstraktai gauti esant 60 °C temperatūrai ir 35 MPa slėgiui, naudojant ekstraktoriaus 50 cm ³ tūrio ceļę.....	40
10 pav. Šaltalankių žaliavos (0,2 mm) ekstrakcijos išėigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės. SKE – CO ₂ ekstraktai gauti 60 °C temperatūroje ir 35 MPa slėgyje, naudojant ekstraktoriaus 500 cm ³ tūrio ceļę.	41
11 pav. Šaltalankių sėklų ekstraktų išėigų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo. (SKE – CO ₂ , superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu esant 60 °C temperatūrai; SOK + heskanas soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas, gautas esant 75 °C temperatūrai)	41
12 pav. Šaltalankių odelių ekstraktų išėigų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo(SKE – CO ₂ , superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu esant 60 °C temperatūrai; SOK+heskanas soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas esant 75 °C temperatūrai)	42
13 pav. Šaltalankių išspaudų ekstraktų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo. (SKE – CO ₂ , superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu esant 60 °C temperatūrai; SOK+heskanas soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas esant 75 °C temperatūrai)	42
14 pav. Šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų mišinio ekstraktų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo. (ASE –H ₂ O, pagreitinotos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas esant 130 °C temperatūrai; ASE – EtOH, pagreitinotos ekstrakcijos etanolinis ekstraktas esant 70 °C temperatūrai).....	43
15 pav. A – Duona be priedų (kontrolė) ir B – duona su šaltalankių ultragarsu veiktomis ir fermentuotos išspaudomis 5%	49
16 pav. A – Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 10 % ir B – su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 5 %.....	50
17 pav. Juslinės analizės rezultatų priklausomybė nuo skirtingų rūšių duonos	53
18 pav. Duonos bendrųjų oksidantų priklausomybė nuo skirtingų virškinimo fazių.....	54

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

SKE – CO₂ – superkartinė ekstrakcija anglies dvideginiu

SOK – Soksleto ekstrakcija

ETPS – ekstrakcija padidinto slėgio aplinkoje

ETPS – EtOH – H₂O – ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje su etanoliu ir vandeniu

SM – sausa medžiaga

ABTS – 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis

TAG – triacilgliceroliai

AAPH – 2,2' – azobio (2 – amidinpropano) dihidrochloridas

BKK – bendro karotenoidų kiekis

TE – Trolokso ekvivalentas

GRE – Galo rūgšties ekvivalentas

IVADAS

Maisto praradimas ir švaistymas yra tapę visuotinėmis problemomis visame pasaulyje [1] ir yra labai aktualios temos siekiant kovoti su badu. Pagrindinės to atsiradimo priežastys gali būti labai įvairios, jos skiriasi visame pasaulyje ir priklauso nuo konkrečių sąlygų bei vietos situacijų tam tikrose šalyse. Dažniausiai maisto nuostoliams poveikį daro augalininkystė ir jos modeliai, vidinė infrastruktūra, pajėgumai bei maisto vartojimo praktika [2]. Manoma, kad visame pasaulyje 30–50 % žemės ūkio maisto produktų medžiagų (maždaug 1,3 mlrd. tonų per metus) yra švaistomos, o vaisiai ir daržovės sudaro 44 % visų nuostolių. Taigi, vaisių ir daržovių perdirbimo likučiai yra rimta maisto pramonės atliekų susidarymo problema. Nors yra žinoma, kad jie yra vertingi ir pigūs maistinių bei kitų medžiagų šaltiniai, kurie gali būti panaudojami įvairiai [3], tačiau vis dar nėra išvystytos šios maisto frakcijos panaudojimo galimybės.

Įvairios uogos ir vaisiai yra naudingi sveikatai dėl juose esančių vertingų maistinių medžiagų, ypačingai yra vertinami dėl jų sudėtyje aptinkamų bioaktyvių fitocheminių antioksidantų (dažniausiai randami polifenolio junginiai, priklausantys flavonoidams ir fenolio rūgštims). Daugelis uogų ir vaisių rūšių pasižymi puikiomis skonio savybėmis, tačiau yra vartojamos šviežios, nes greitai genda. Didelė jų derliaus dalis yra perdirbama į ilgesnio tinkamumo vartoti produktus, pavyzdžiui, sultis, uogienes, tyreles ir kt. Perdirbant uogas, pvz., iš jų spaudžiant sultis, sėklos, išspaudos ir kitos dalys yra pašalinamos kaip šalutinis gamybos produktas, nors yra žinoma, kad ir šiose uogų dalyse yra aptinkamas didelis kiekis vertingų maistinių medžiagų [4].

Šaltalankiai pasižymi unikalia bioaktyvių komponentų sudėtimi, juose gausu vitaminų (C, A, E, K), mineralų (Fe, Mg, Na, Ca), aminorūgščių, karotinoidų pigmentų, flavonoidų, taip pat aptinkama augalinių sterolių ir riebalų rūgščių. Cheminė *H. rhamnoides* sudėtis ir didelis veiklių junginių kiekis daro teigiamą poveikį žmogaus organizmui, pasižymi sveikatą stiprinančiomis savybėmis [5]. Tyrimai rodo, kad šaltalankiai ir iš jų gaminami produktai teikia įvairią naudą organizmui: slopina trombocitų agregaciją, pasižymi antioksidaciniu, antibakteriniu, priešuždegiminiu ir priešvėžiniu poveikiais [4]. Šaltalankių ekstraktai pasižymi imunomoduliuojančiu ir antioksidaciniu aktyvumu. Jie yra naudingi gydant skrandžio opas [6]. Ekstraktų šalutiniuose produktuose galima rasti daug įvairių vertingų bioaktyvių sudedamųjų dalių, kurios gali būti naudingos kuriant funkcinius maisto produktus [4]. Funkcinis maistas – tai maistas, kurio funkcijos gali pagerinti sveikatą ir sumažinti ligų riziką arba atidėti jų atsiradimą. Didėjantis sąmoningumas apie funkcinius maisto produktus paskatino mokslininkus siekti gaminti maistą, kuris prisidėtų prie sveikatos gerinimo [7, 8].

Maisto pramonėje stengiamasi įtraukti naudingų maistingų ingredientų į įvairius gaminamus produktus siekiant suteikti pridėtinę vertę galutiniams maisto produktams. Šaltalankiai yra puiki uoga, kuri gali būti panaudojama maisto pramonėje. Šio augalo uogos turi unikalų lipidų profilį uogų minkštyme, sėklose, žievelėse bei pasižymi didelėmis vitamino C, karotenoidų, tokoferolių ir kitų bioaktyvių junginių koncentracijomis. Nors šaltalankiai vis dar yra mažai paplitę maisto pramonėje, tačiau jie gali būti viena iš perspektyviausių maisto sudedamųjų dalių dėl turimų specifinių fizikinių ir cheminių savybių ir reikšmingo teigiamo poveikio sveikatai. Jutimo kokybės požiūriu šaltalankiai turi aiškiai apibrėžtą rūgštų ir sutraukiantį skonį, todėl jų panaudojimas maisto pramonėje yra gan sudėtingas iššūkis [9]. Mokslinėje literatūroje yra aptinkama mažai informacijos apie ekstrakcijos su superkritinės būklės CO₂ nuriebalintų žaliavų panaudojimą duonos gamyboje. Taigi, stengiantis sumažinti maisto švaistymą bei pagerinti maisto produktų vertę, šiame darbe yra siekiama ištirti šaltalankių uogų išspaudų panaudojimo galimybes praturtinant duonos produktus.

Darbo tikslas – išgauti funkcionaliuosius komponentus iš dygliuotųjų šaltalankių (lot. *Hippophae rhamnoides L.*) uogų išspaudų naudojant aukšto slėgio ekstrakcijos metodus ir taikant efektyvų daugiapakopį biorafinavimo procesą bei įvertinti išgautų ekstraktų panaudojimo galimybes praturtinant duoną.

Darbo uždaviniai:

1. atlikti literatūros analizę apie šaltalankių uogų ir jų išspaudų cheminę sudėtį, ekstrakcijos metodus ir liekanų po ekstrakcijos panaudojimą duonos produktuose;
2. nustatyti nefrakcionuotų šaltalankių išspaudų, mechaniškai atskirtų sėklų ir kitų dalių (odelių bei minkštimo likučių) cheminę sudėtį;
3. ištirti ekstrahavimo kinetiką;
4. išanalizuoti po superkritinės ekstrakcijos su CO₂ bei pagreitinotos ekstrakcijos tirpikliais gautų ekstraktų cheminę sudėtį ir antioksidacinį aktyvumą;
5. įvertinti šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų įtaką duonos cheminei sudėčiai ir antioksidaciniam aktyvumui ir juslinėms savybėms;
6. ištirti antioksidantų išsiskyrimą skirtinguose duonos virškinimo *in vitro* proceso etapuose.

1. ŠALTALANKIŲ UOGOS, JŲ SUDĖTIS, PERDIRBIMAS IR PANAUDOJIMAS: LITERATŪROS ANALIZĖ

Mokslinės literatūros apžvalgos metu supažindinama su šaltalankiais, jų rūšimis, pateikiama jų cheminė sudėtis, aprašomos fizikinės charakteristikos. Šiame skyriuje aprašomi taikomi ekstrahavimo metodai, reikalingi ekstraktams išgauti bei supažindinama su uogų šalutinių produktų panaudojimo galimybėmis funkcionaliojo maisto gamyboje.

1.1. Šaltalankiai

Šiame poskyryje yra supažindinama su šaltalankiais ir jų rūšimis, plačiausiai paplitusios rūšies pagrindinėmis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis ir panaudojimu.

1.1.1. *Hippophae rhamnoides* L

Žilakrūminių šeimą (lot. *Elaeagnaceae*) sudaro trys augalų gentys: šaltalankiai (lot. *Hippophae*), šeferdijai (lot. *Shepherdia*) ir žilakrūmiai (lot. *Elaeagnus*), kuriems priklauso maždaug 45 rūšys [10]. Žodis *Hippophae* yra kilęs iš lotyniško žodžio „*Hippo*“, kuris reiškia arklį ir „*Phaos*“, reiškiančio blizgesį [11].

Visos *Hippophae* genties rūšys yra kilusios iš Eurazijos ir vadinamos šaltalankiais [12]. *Hippophae* genčiai yra būdinga didžiulė biologinė įvairovė [5]. *Hippophae* genties klasifikacija buvo vis keičiama ir modifikuojama. Iš pradžių *Hippophae* gentį sudarė tik viena rūšis, tai yra *H. rhamnoides*, su trimis porūšiais – *rhamnoides*, *salicifolia* ir *tibetiana*. Šiuo metu *H. rhamnoides* yra suskirstytas į 9 geografiškai atskirtus porūšius: *carpathica*, *caucasica*, *gyantsensis*, *mongolica*, *sinensis*, *turkestanica*, *yunnanensis*, *rhamnoides* ir *fluviatilis* [12]. Pagrindiniai skirtumai tarp šių porūšių yra: dydis, forma, šoninių venų skaičius lapuose, spalva ir žvaigždės formos plaukelių kiekis [13]. Visi *Hippophae* rūšių vaisiai ir lapai pasižymi dideliu maistinių medžiagų ir bioaktyviųjų junginių kiekiu. Šios rūšys yra panaudojamos maisto, farmacijos ir sveikatos priežiūros produktuose [14].

Hippophae rhamnoides – plačiausiai paplitusi, komerciškai svarbi rūšis dar gali būti skirstoma į 9 porūšius. Šaltalankiai – žiemai atsparūs lapuočių krūmai. Jie auga Europoje ir Azijoje: Kinijoje, Mongolijoje, Rusijoje, Kazachstane, Turkijoje, Rumunijoje, Šveicarijoje, Vokietijoje, Prancūzijoje, Britanijoje ir link šiaurės – Suomijoje, Švedijoje ir Norvegijoje. Suomijoje dažniausias porūšis yra *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*, o Kinijoje *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*. Šaltalankiai yra atsparūs temperatūrai, druskai, sausrai ir gali fiksuoti azotą. Šie augalai gali prisitaikyti net prie ekstremalių klimato sąlygų, kai temperatūra svyruoja nuo -43°C iki $+40^{\circ}\text{C}$. Šaltalankis greitai sudaro plačią šaknų sistemą [11, 12, 15, 16]. Jis gali būti nuo 2 iki 4 metrų aukščio. Pagrindinis kamienas yra sudarytas iš storos ir šiurkščios žievės. Jaunos šakos yra pilkos spalvos, ant jų būna adatos formos erškėčiai. Šio augalo lapai yra pailgi, viršutinis paviršius žalios, o apatinis sidabrinės spalvos (žr. 1 pav.). Šaltalankių dygliuotas krūmas natūraliai gali augti smėlingoje dirvoje nuo 1200 iki 4500 metrų aukštyje. Augalas gali būti kultivuojamas šaltojo ir vidutinio klimato zonose [17, 18].



1 pav. Šaltalankių augalas [13]

Šaltalankių sodinukai gali būti moteriškos ir vyriškos lyties. Jų lytį nustatyti galima tik žydėjimo metu. Vyrišką pumpurą sudaro nuo 4–6 bežiedžių gėlių, kurios gamina žiedadulkes ir yra paskirstomas vėjo. Moterišką pumpurą sudaro viena bežiedė gėlė su viena kiaušide ir viena kiaušialąste. Išaugintų vaisių skaičius priklauso nuo auginimo sąlygų. Moteriškos lyties augalai gamina į uogas panašius vaisius, kurių skersmuo 6–9 mm, jie yra minkšti, sultingi ir turtingi aliejais. Uogos gali būti geltonos, oranžinės ir raudonos spalvos, jų dydis ir masė skiriasi (žr. 2 pav.). Vaisiai turi rūgštų skonį ir unikalų aromatą, kuris primena ananasus. Šaltalankių sėklos būna tamsiai rudos, blizgios spalvos, ovalios, panašios į elipsę formos ir nuo 2,8–4,2 mm dydžio [11, 12] Augalas dažniausiai žydi balandžio mėnesį, o vaisius galima rinkti nuo rugpjūčio iki spalio mėnesio [18].



2 pav. *Hippophae rhamnoides ssp. rhamnoides* skirtingo dydžio ir spalvos uogos

Šaltalankių uogos ir lapai šimtus metų buvo naudojami medicininiais tikslais tokiose šalyse kaip Rusija ir Kinija [15]. Šio augalo uogos yra žaliava tradiciškai naudojama gaminant liaudiškus vaistus, maistą bei kuriant maistines medžiagas. Kinijoje jos buvo naudojamos įvairioms ligoms gydyti, pvz., odos sužalojimams, skrandžio ir gleivinių sužalojimams, plaučių sutrikimams, širdies ir kraujagyslių ligoms. Daugybė šaltalankių veislių pasižymi išskirtinėmis savybėmis – atsparumu šalčiui, kenkėjams ir ligoms [16, 19]. Šis augalas gali būti naudojamas norint išvengti dirvožemio erozijos [15]. Visos šio augalo dalys laikomas geru bioaktyviųjų junginių, pvz., karotenoidų, tokoferolių, sterinų, flavonoidų, lipidų, vitaminų, taninų, mineralų, šaltiniu. Tai lemia platų šio augalo natūralių antioksidantų panaudojimą [20].

1.2. Šaltalankių sudėtis, savybės ir panaudojimas

Šiame skyrelyje yra aprašoma cheminė šaltalankių sudėtis (pateikiama juose aptinkamų bioaktyviųjų junginių sudėtis), jų fizikinės ir cheminės savybės, aprašomas teigiamas gydomasis jų poveikis ir pristatomos jų panaudojimo ir pritaikymo sritys.

1.2.1. Cheminė sudėtis

Šaltalankio vaisiuose, lapuose, aliejuje ir kituose produktuose yra daug bioaktyvių medžiagų: fenolinių junginių (tokių kaip flavanoidų: rutinas, kvercetas, kaempferolis arba myricetas), vitaminų (tokoferoliai, karotenoidai, askorbo rūgštis, folatai, vitaminai B1, B2 ir K), baltymų, aminorūgščių ir mineralų (Fe, Ca, P ir K) [21]. Šiame augale yra organinių rūgščių: chino rūgšties, obuolių rūgšties, oksalo rūgšties ir vyno rūgšties, riebalų rūgščių, taip pat nesočiųjų riebalų rūgščių, pvz., oleino rūgšties, linolo rūgšties, linoleno rūgšties ir fitosterolių, kaip β -sitosterolis, ergosterolis [22].

Šaltalankių uogų sudėtis labai priklauso nuo jų kilmės, rūšies, porūšio, veislės ir augimo vietos, taip pat ir nuo derliaus nuėmimo laiko, oro sąlygų ir nokinimo aplinkybių [15, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29]. Šaltalankių uogos yra sudarytos iš minkštimo (68 %), sėklų (23 %) ir žievelių (7,75 %). Jos yra labai maistingos, tačiau labai rūgščios ir jas valgyti nėra malonu, kai jos yra žalios [30]. Šaltalankių uogose gausu organinių rūgščių, aminorūgščių, riebalų rūgščių, antioksidantų ir vitaminų, pvz., askorbo rūgšties. Dažniausiai nustatomi antioksidantai: karotenoidai (zeaksantinas, likopenas ir β -karotinas), taip pat flavonoidai (kvercetas, kaempferolis) [15]. Uogose, sultyse ir sėklose yra gausu mineralinių elementų. Uogose yra vitaminų: A, B, C, D, E, F, K, P, mineralinių medžiagų: natrio druskos, kalio, kalcio, taip pat angliavandenių, cukraus, baltymų, nesočiųjų riebalų rūgščių, taninų ir pektinų, triterpenoidų, fosfolipidų, kumarino, katechinų, leukoentocianų, flavonolių, alkaloidų, serotoninai [12]. Sultyse dažniausiai aptinkama bent 24 cheminiai elementai, pvz., jose galima rasti azoto, fosforo, geležies, mangano, boro, kalcio, aliuminio, silicio [30].

Šaltalankių lapuose gausu fenolinių junginių, pasižyminčių antioksidaciniu aktyvumu, pvz., galo rūgšties, kofeino rūgšties, chlorogeninės rūgšties, cinamono rūgšties, sinopo rūgšties, p-kumaro rūgšties, p-hidroksibenzoinės rūgšties, gentisino rūgšties, siringinės rūgšties, ferulo ir elaginės rūgšties, o šakniavaisyje - galo ir siringino rūgščių. Lapuose yra angliavandenių: sacharozės, gliukozės, fruktozės ir nemažas kiekis baltymų [31].

Šaltalankių vaisiuose yra daug pigmentų ir lipoproteinų, kurie yra vaisių membranoje ir mezokarpoje. Jų vaisių membranoje yra karoteno lipoproteinų kompleksai, joje poliniai lipidai gali jungtis į struktūras tarp polinių ir nepolinių karotenoidų dalių [30, 32].

Vaisiai turi specifinį kvapą, kurį sudaro apytiksliai 45 junginiai. Į tuos junginius įeina esteriai, alkoholiai, aldehidai, ketonai ir terpenai. Šio kvapo didžiąją dalį sudaro terpenai, pvz., limonenas, α -terpinenas, *cis*- ir *trans*- *ocimene* maždaug 1 %. Kai kuriems žmonėms šis kvapas primena citrusinius vaisius ar uogas, o skandinavai jį traktuoja kaip ananasų kvapą [22].

1.2.2. Bioaktyvūs junginiai

Įvairiose šaltalankių dalyse, kurios yra naudojamos liaudies medicinoje, (lapuose, stiebuose, ūgliuose) yra gausu bioaktyviųjų junginių (randama daugiau nei 200 bioaktyviųjų junginių) [31] (žr. 1 lentelė). Plačiausiai yra tyrinėjamos būtent šaltalankių uogos [33]. Minkštyme ir sėklų aliejuose galima aptikti bioaktyviųjų junginių: fitosterolių, karotenoidų ir tokoferolių [15, 34]. Vitaminas E (tokoferolių, mineralų ir flavonoidų pavidalu) gali sustiprinti kraujagyslių kapiliarų sienelės [35]. Minkštimo aliejuje yra gausu palmitoleino rūgšties. Ši riebalų rūgštis yra pagrindinė odos riebalų sudedamoji dalis. Minkštimo aliejus gali būti naudojamas kosmetikoje [15, 34].

1 lentelė. Šaltalankių vaisiuose esančių bioaktyviųjų ingredientų sudėtis ir jų reikšmė žmogaus sveikatai [21, 35, 36]

Junginiai	Savybės
Polifenoliai	Antioksidacinės
Flavanoidai	Gali slopinti trombozę ir hipertenziją, skatinti žaizdų gijimą
Flavanoliai: katechinas, kaempferolis, kvercetas, izorhamnetinas, miricetas, rutinas, proantocianidiniai	Antioksidacinės, stabilizuoja askorbo rūgštį
Fenolio rūgštys	Apsaugo nuo nepageidaujamos mikrofloros vystymosi
Karotenoidai: δ -karotinas, γ -karotinas, likopenas, zeaksantinas.	Antioksidacinės, priežvėžinės
Tokoferoliai: α -tokoferolis, β -tokoferolis, γ -tokoferolis	Antioksidacinės
Steroliai, fitosteroliai, sitosteroliai	Gali sumažinti cholesterolio kiekį kraujyje, svarbūs gydant nudegimus, sintetinant steroidinius hormonus ir kitus biologiškai aktyvius junginius
Amino rūgštys: asparaginas, prolinas, treoninas, serinas	Gali sumažinti cholesterolio kiekį kraujyje, pasižymi antimutageniniu poveikiu
Vitaminas E (α -tokoferolis)	Antioksidacinės
Vitaminas C	Antioksidacinės, gali dalyvauti kolageno skaidulų sintezėje, pašalina laisvuosius radikalus ir stiprina imunitetą
Vitaminai: B1, B2, B6	Naudingi fermentų kofaktoriai (kofermentai)
Makroelementai	Suteikia energijos, organizmas juos vartoja dideliais kiekiais
Mikroelementai	Reikalingi organizmui atlikti įvairias fiziologines funkcijas

Sėklų aliejuose aptinkami dideli linolo ir α -linoleno rūgšties kiekiai [15, 37]. Šaltalankių uogose gausu antioksidacinių savybių turinčių polifenolių [15, 26, 38, 39]. Flavonoidai, pvz., flavonolio glikozidai ir proanthocianidinai su tokiais komponentais kaip flavanoliai ir fenolio rūgštys yra laikomi labai svarbia bioaktyviųjų junginių grupe. Flavonoliai yra pagrindinė flavonoidų grupė, kuri dažniausiai augaluose aptinkama glikozidų pavidalu (pvz., aglikonai turi daug potencialo pagerinti širdies ir kraujagyslių sistemą)[26, 40, 41].

Iš šaltalankių uogų galima išskirti daug bioaktyviųjų junginių: hipofėjaus cerebrsida, oleanolio rūgštį, ursolio rūgštį, 19-alfa-hidroksikursolio rūgštį, dulcioinę rūgštį, 5-hidroksimetil-2-furankarboksaldhidą, cirsiumaldhidą, oktakozano rūgštį, palmitino rūgštį ir 1-O-heksadekanoleniną. Iš šaltalankių išspaudų išeksrahuotas izorhamnetinas pasižymi antioksidaciniu aktyvumu [11].

Šaltalankių lapuose gausu flavonoidų, ypatingai daug aptinkama katechino ir mikricetino. Uogose aptinkami pagrindiniai flavonoidai yra kvercetas, kaempferolis ir izorhamnetinas bei jų glikozidai. Užaugusiose ir subrendusiose uogose yra mažiau flavonoidų negu lapuose [31].

Šaltalankių uogose yra 13,7 % sočiųjų (pvz., palmitino rūgštis) ir 86,3 % nesočiųjų riebalų rūgščių (pvz., oleino rūgštis (omega-9), palmitoleino rūgštis (omega-7), linolo rūgštis (omega-6) ir linoleno rūgštis (omega-3)). Pagrindinės šaltalankių uogų riebalų rūgštys yra palmitoleinė ir palmitino rūgštys [42].

1.2.3. Antioksidantinės savybės

Gyvieji organizmai gamina reaktyviasias deguonies rūšis (ROS), tai yra normalus ląstelių metabolizmas. Kai šių ROS koncentracijos yra mažos ar vidutinės, jos atlieka funkcijas fiziologiniuose ląstelių procesuose, tačiau esant didesnėms koncentracijoms gali sukelti lipidų, baltymų ir DNR modifikacijas [43].

ROS gali sukelti DNR modifikacijas keliais būdais: vykstant bazių skilimui, nutrūkstiant vienguboms arba dviguboms DNR, įvykstant purino, pirimidino jungimosi modifikacijoms, mutacijoms ar translokacijoms ir persikryžiuvimui su baltymais [43].

Reaktyviosios deguonies rūšys (ROS), pvz., superoksido anijonai, vandenilio peroksidas (H_2O_2) ir hidroksilo radikalai yra atsakingi už oksidacinį pažeidimą ir yra susiję su širdies bei kraujagyslių, kepenų, vėžio ir kitomis lėtinėmis, uždegiminėmis ligomis. Neuroninis audinys yra labai jautrus oksidaciniam stresui, todėl jis labai reikšmingas ir susijęs su ūminėmis ir lėtinėmis neurodegeneracinėmis ligomis. Oksidaciniu stresu yra vadinamas oksidantų ar antioksidantų pusiausvyros pasikeitimas oksidantų naudai [43].

Nervų ląstelės yra labai jautrios degeneracijai, kurią sukelia reaktyviosios deguonies rūšys (ROS). ROS galima suskirstyti į laisvuosius radikalus ir ne radikalus. Molekulės, kurios turi vieną ar daugiau nesuporuotų elektronų, vadinamos laisvaisiais radikalais. Neradikalios formos susidaro, kai du laisvieji radikalai dalinasi savo nesuporuotais elektronais. Pagrindiniai endogeniniai oksidantai yra: superoksido anijonas (O_2^-), vandenilio peroksidas (H_2O_2), hidroksilo radikalas ($\bullet OH$), hipochlorido rūgštis ($HOCl$), peroksilo radikalai ($ROO\bullet$), hidroperoksilo radikalas (HOO). ROS susidarymo šaltiniai yra įvairūs ir santykinis jų poveikis priklauso nuo aplinkos sąlygų. Dažniausiai ROS

reakcijos būna ribotos difuzijos, todėl poveikis ląstelių funkcijai priklauso nuo biomolekulių artumo, skirtingi pažeidimai daro ne vienodą poveikį.

Laisvuosius radikalus galima gauti iš daugelio elementų, tačiau biologinėse sistemose svarbiausiais yra laikomi tie, kuriuose yra deguonies ir azoto. Hipoksiją sukelia laisvųjų radikalų susidarymas, kuris ir yra oksidacinio streso sukėlėjas [43, 44, 45]. Oksidacinis stresas daro reikšmingą poveikį sveikatai sukeldamas įvairius negalavimus ar ligas, pvz., nėštumo komplikacijos [45]. Moksliniai tyrimai rodo, kad natūralūs antioksidantai (karotenoidai, tokoferoliai ir flavonoidai) gali sustabdyti ir išgydyti su oksidaciniu stresu susijusias ligas [46].

1.2.4. Pritaikymas ir panaudojimas

Prekyboje aptinkama daugybė produktų sukurtų iš šaltalankių uogų, lapų ir žievės ekstraktų. Šaltalankiai gali būti naudojami maisto pramonėje ir kosmetikoje. Dažniausiai gaunami apdoroti produktai yra aliejus, sultys, arbata, uogienė, saldainiai, alkoholiniai gėrimai (likeriai), sausainiai, vitamino C tabletės, maistiniai dažikliai, vaistai, veido kremai ir šampūnai [12, 47]. Šaltalankių pritaikymas kosmetikos pramonėje yra labai platus. Iš jų gali būti gaminamos įvairios priemonės, pvz., drėkinamieji, odos senėjimą lėtinantys kremai, prevenciniai šampūnai nuo plaukų slinkimo ir pleiskanų bei įvairūs kūno losjonai [12].

Centrinėje Azijoje ir Europoje yra panaudojamos beveik visos šio augalo dalys (vaisiai, lapai, šaknys ir žievės). Šaltalankiai čia yra vartojami kaip maisto papildas, jų dalys naudojamos malkoms, degalams, pašarams ar kaip dekoracija namuose [22].

Siekiant išvengti sveikatos problemų yra stengiamasi vartoti sveiką maistą, o tą maisto pramonėje užtikrinti padeda natūralūs bioaktyviųjų medžiagų šaltiniai. Šaltalankių vegetatyvinių dalių ekstraktai gali būti naudojami kaip maisto priedai, papildai ir ingredientai funkciniam maisto produktams. Šaltalankių vegetatyvinių dalių ekstraktai pasižymi antioksidantiniu ir antimikrobiniu poveikiu [31]. Šių augalų aliejai yra naudojami kaip komerciniai kosmetikos produktai bei maisto papildų šaltiniai [30].

1.2.5. Gydomosios savybės

Hippophae rhamnoides L. yra naudojamas kaip tradicinis augalinis vaistas gydyti kosulį, palengvinti virškinimą, malšinti skausmą ir pagerinti kraujotaką. Šaltalankių šakos ir lapai naudojami siekiant sustabdyti viduriavimą, o jų ekstraktai gali būti naudojami gydyti kolitą ir enterokolitą. Vidurinėje Azijoje lapai naudojami virškinimo trakto ir dermatologiniams sutrikimams gydyti, taip pat kompresams reumatoidinio artrito atvejais [18]. Rusijoje šaltalankiai yra naudojami hepatitui, odos sutrikimams ir astmai gydyti. Jie turi kardio apsauginį aktyvumą bei atlieka gydomąjį poveikį širdies ir kraujagyslių sistemai, slopina kraujo trombocitų aktyvaciją, mažina cholesterolio koncentraciją, kraujospūdį [22].

Šaltalankių aliejaus lipofiliniai junginiai, pvz., α ir γ -linoleno rūgštys, turi teigiamą antidepresantinį poveikį centrinei nervų sistemai ir smegenų funkcijoms. Palmitoleino rūgštis, kuri yra aptinkama jų aliejuje, veikia regeneracinius procesus epidermyje ir skatina žaizdų gijimą. Šaltalankių aliejus gali suaktyvinti fiziologines odos funkcijas, todėl suaktyvėja jos regeneracija, sumažėja randai. Iš šių augalų išgaunami aliejai skatina žaizdų ir nekrozinio audinio gijimą [48]. Iš uogų išgautas aliejus gali būti naudojamas gydyti gastritą, skrandžio opas, gimdos eroziją ir lytinių organų uždegimus [11].

Šaltalankių sėklų aliejuje yra daug nesočiųjų riebalų rūgščių, tokoferolių, karotinoidų ir flavonoidų, kurie pasižymi antibakteriniu, antiaterogeniniu ir kardio apsauginiu poveikiu. Šis aliejus apsaugo nuo hipoksijos sukeliama transvaskulinio skysčio nutekėjimo ir nuo anglies tetrachlorido (CCl₄) toksiškumo kepenims [46].

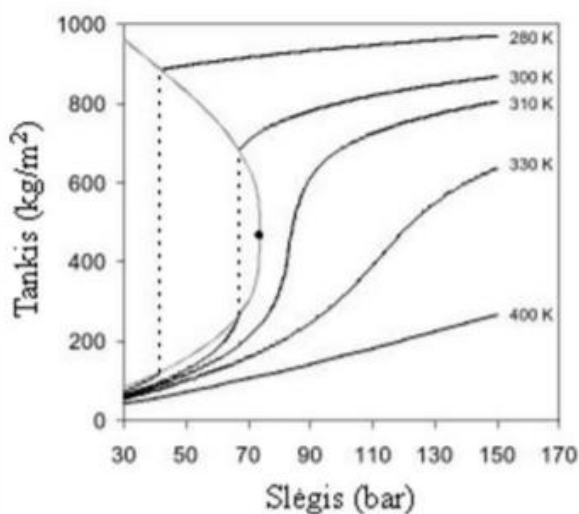
1.3. Ekstrakcijos metodai

Antioksidantai iš augalo audinių yra išgaunami naudojant įprastus ekstrahavimo metodus, pvz., ekstrakcija iš kietojo skysčio, naudojant metanolį, etanolį ir acetoną. Tyrėjai siekia sukurti patikimus ir greitus metodus bioaktyviųjų junginių išgavimui iš augalų siekiant padidinti jų terapinį funkcionalumą [20]. *H. rhamnoides* uogose yra daug bioaktyviųjų junginių, kuriuos išgauti yra naudojami įprasti ekstrahavimo būdai: Soksletas ir maceracija (šiais būdais sunaudojama daug toksinio tirpiklio, pvz., metanolio).

Norint panaudoti bioaktyvų augalų ekstraktą farmacijos ir kosmetikos gaminiuose yra ieškoma efektyvaus ekstrahavimo proceso, kuriame naudojami toksiški tirpikliai būtų pakeičiami biologiškai skaidžiais ir netoksinais tirpikliais, pvz., vandeniui ar etanoliumi [49]. Dėl šios priežasties buvo sukurta keletas ekstrahavimo būdų: suslėgto skysčio ekstrahavimas, superkritinio skysčio ekstrahavimas (SKE), ultragarsinis ekstrahavimas, ekstrahavimas mikrobangomis (MAE) bei subkritinė vandens ekstrakcija (SWE). Naudojant šiuos ekstrahavimo būdus taip pat yra taupoma energija [20, 49, 50, 51].

1.3.1. Ekstrakcija superkritiniais skysčiais

Pastaraisiais metais superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu (SKE-CO₂) pradėta laikyti itin perspektyvia alternatyva įprastam tirpiklių ekstrahavimui, nes ji teikia daug privalumų, įskaitant tai, kad liekanose nelieta tirpiklio ir pasižymi geresniu aromatinių medžiagų sulaikymu. SKE-CO₂ naudojama ekstrahuoti iš įvairių augalinių medžiagų eterinius, sėklinius aliejus ir karotinoidus [52]. Skystas tirpiklis, kuris yra pasiekęs tam tikrą slėgį ir temperatūrą virš jo kritinio taško, vadinamas superkritiniu skysčiu (žr. 3 pav.).



3 pav. CO₂ tankio – slėgio fazijų diagrama [53]

Nors superkritinio skysčio tankis yra panašus į skysčio normaliomis sąlygomis, tačiau jo klampa yra panaši į dujas. Galima sakyti, kad superkritinio skysčio būseną yra, kai skystis ir dujos negali būti atskiriami vienas nuo kito, arba tokia būseną, kurioje skystis yra suspaudžiamas [54].

Superkritinių skysčių pagrindiniai privalumai yra jų paprastumas ir lėtas *termolabilių*¹ junginių skaidymas. SKE užtrunka trumpiau nei įprastas ekstrahavimas. Superkritinių skysčių masės greitis yra didesnis nei skystų tirpiklių [33, 55].

Skystis, kuris yra aukštesnėje nei kritinė temperatūra ir yra kritiniame slėgyje, yra vadinamas superkritinės būklės. Superkritinis skystis yra unikalus tuo, kad jo tankis priklauso nuo slėgio [33, 55]. Superkritinio skysčio tirpikliai (pvz., anglies dioksidas) yra tarpininkai tarp skysčio ir dujų. Jie yra laikomi svarbiais atskyrimo procesuose, remiantis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, kurias lengvai galima valdyti slėgiu ir temperatūra (pvz., tankis, klampumas, difuziškumas ir dielektrinė konstanta). Tam tikrų medžiagų superkritinės sąlygos yra pavaizduotos 2 lentelėje (žr. 2 lentelė).

2 lentelė. Medžiagų kritiniai parametrai [53]

Medžiaga	Kritinė temperatūra, °C	Kritinis slėgis, atm	Kritinis tankis, 10 ³ kg/m ³
CO ₂	31,3	72,9	0,47
N ₂ O	36,5	72,5	0,45
SF ₆	45,5	37,1	0,74
NH ₃	132,5	112,5	0,24
H ₂ O	374	227	0,34
<i>n</i> -C ₄ H ₁₀	152	37,5	0,23
<i>n</i> -C ₅ H ₁₂	197	33,3	0,23

Naudojant SKE būdą mitybos produktams ekstrahuoti, nereikia tirpiklio, todėl šis metodas yra ekologiškas ir saugus [33, 55]. Pirmą kartą apie superkritinių skysčių galią buvo kalbėta daugiau nei prieš šimtmetį. Superkritinės ekstrakcijos technologijas, skirtas pramoninėms reikmėms, pirmasis atskleidė Zoselis Maksas Plankas 1969 m [56].

SKE veikimo principą sudaro natūralių medžiagų ekstrahavimas skuperkritinės būsenos skysčiu, kuris yra apibrėžtomis temperatūros ir slėgio sąlygomis. Naudojant kontroliuojamą slėgio sumažinimą ekstraktas yra atskiriamas nuo tirpiklio. Superkritinis tirpiklis – anglies dioksidas, dėl savo nepolinės prigimties suteikia patogią galimybę išskirti augalinius, eterinius aliejus, sterinus, kai kuriuos vitaminus ir kitus augaliniuose aliejuose esančius natūralius produktus. Jis gali lengvai prasiskverbti pro kietą matricą ir ištirpinti norimą ekstraktą dėl dvigubų dujinių ir į skystį panašių savybių [55, 57], tačiau dėl mažo poliškumo yra ne toks efektyvus ekstrahuojant labiau polinius junginius iš natūralių matricų [54].

Daugybė junginių gali būti naudojami, kaip superkritiniai skysčiai. Anglies dioksidas dažniausiai naudojamas dėl savo vidutinės kritinės temperatūros (31,3 °C) ir slėgio (72,9 atm.) [54]. Anglies dioksidas kambario temperatūroje yra dujos, todėl baigus ekstrahavimą ir suslėgus sistemą, iš esmės pašalinama CO₂ ir gaunamas tirpiklio neturintis ekstraktas [54]. Ekstrakcijos greitį galima

¹ Termolabili medžiaga – tai tokia medžiaga, kuri pasikeičia arba yra visiškai sunaikinama, kai yra pasiekiamas arba viršijama tam tikra nustatyta temperatūra.

kontroliuoti keičiant temperatūrą ir slėgį ekstrahavimo inde. Šie veiksniai daro poveikį superkritinio anglies dioksido tirpimui [55, 57].

Taigi, SKE sudarytas iš šių pagrindinių etapų: tirpiųjų junginių ekstrahavimas iš matricos, kai kietasis mėginys sugeria superkritinį tirpiklį ir analitų ištirpinimo iš matricos tirpikliu. Kito etapo metu analitai yra atskiriami nuo superkritinio tirpiklio (jie yra transportuojami ir pašalinami) [58].

1.3.2. Subkritisė vandens ekstrakcija

Naudojant subkritisę vandens ekstrakciją (SWE) yra reikalingas karštas vanduo, esant atitinkamam slėgiui. Svarbu, kad vanduo būtų skystoje būsenoje ir apibrėžtoje temperatūroje, nes tik tada galima selektyviai išgauti įvairių klasių junginius. Vykdamt ekstrahavimą žemesnėje temperatūroje išekstrahuojama daugiau polinių junginių, o aukštesnėje jų išgaunama mažiau. Keičiant eksploatacinius parametrus šis ekstrakcijos būdas suteikia galimybę valdyti išgaunamų ekstraktų sudėtį. Subkritisę vandens ekstrakciją galima naudoti eterinių aliejų ir antioksidantų ekstrakcijai [20].

Ekstrahavimas mikrobangomis vis dažniau naudojamas natūralių produktų ekstrakcijai dėl to, kad tai yra pigus ir greitas metodas. Šiuo būdu yra sumažinamas ekstrahavimo laikas ir tirpiklio poreikis. MAE yra labiau pritaikytas išskirti polinius junginius nei SFE, kadangi kaitinimas MAE atveju priklauso nuo tirpiklio sugerties mikrobangų krosnelėje. MAE ji yra didelė tokiems tirpikliams, kurie turi stiprų dipolinį momentą, pvz., vanduo ar alkoholis [49].

1.3.3. Pagreitinta ekstrakcija organiniais tirpikliais

Pagreitinta tirpiklių ekstrakcija (ASE)- kaip vienas iš netradicinių energijos taupymo metodų pirmą kartą aprašytas Richterio ir kt. (1996) [59]. ASE yra vienas iš naujausių metodų, sukurtas kietiems mėginiams ekstrahuoti [60]. Šis metodas apima ekstrakciją naudojant skystus tirpiklius aukštesnėje temperatūroje ir slėgyje, tokiu būdu pagerinant ekstrahavimo efektyvumą. Šis ekstrahavimo būdas suteikia galimybę naudoti tirpiklius aukštesnėje nei jų atmosferos virimo temperatūroje, todėl sustiprėja tirpumo ir masės perdavimo savybės [61]. ASE yra automatizuota greito ekstrahavimo technika, kurioje naudojami įprasti tirpikliai esant aukštai temperatūrai ir slėgiui. Šiuo būdu yra padidinamas organinių junginių ekstrahavimo iš kietų ir pusiau kietų matricų efektyvumas. ASE techniką galima naudoti siekiant išgauti medžiagas, kurių masė yra 1–100 g. Jos privalumai yra mažas tirpiklių suvartojimas ir pritaikomumas įvairioms matricoms, įskaitant natūralius produktus [59]. Šios technikos veikimo principas yra pagrįstas tirpiklio (vandens ar organinio tirpiklio) kaitinimo-lydymo procesu esant aukštam slėgiui, kuris neleidžia virti [59, 62].

ASE veikimo principas yra labai paprastas. Mėginys yra dedamas į nerūdijančio plieno ceļę, kaitinamą iki 50–200 ° C temperatūros. Paprastai į ląstelę pumpuojamas tas pats organinis tirpiklis arba tirpiklių derinys, kuris naudojamas ekstrahuojant Soksletą, o spaudžiant ekstrahavimo ceļę, tirpikliai laikomi skystoje būsenoje. [60].

Ekstrahavimo efektyvumas pagreitinotos ekstrakcijos tirpikliais priklauso nuo įvairių parametų, pvz., ekstrahavimo tirpiklio, temperatūros, slėgio, statinio laiko ir ciklų skaičiaus [63]. Ekstrahavimo temperatūra daro poveikį desorbcijos pajėgumui, tirpiklio klampumui ir tikslinių junginių tirpumui, todėl veikia ir ekstrahavimo efektyvumą [63, 64].

1.4. Uogų šalutinių produktų pritaikymas funkcionaliajam maistui

Funkcionaliojo maisto sąvoka pirmą kartą paminėta japonų mokslininkų 1984 m., kurie tyrinėjo mitybos, fiziologinių sistemų stiprinimo ir moduliacijos ryšius. Japonijos Sveikatos apsaugos ministerija 1991 m. nustatė konkrečios su sveikata susijusios maisto kategorijos, vadinamos „maistas, skirtas specifiskai sveikatos reikmėms“ patvirtinimo taisyklės, kurios apėmė konkrečius teiginius apie šio tipo maisto produktų vartojimą. Parduodamuose funkciniuose maisto produktuose aptinkama pridėtų technologiškai sukurtų ingredientų, kurie daro teigiamą poveikį sveikatai. „Funkcinio maisto“ terminas jau yra apibrėžtas keletą kartų, tačiau nėra vieningos šios maisto grupės apibūdinimo sąvokos. Pagal tai, koks yra funkcinės savybės įtraukimo į maistą tikslas, išskiriamos kelios funkcinio maisto rūšys: sustiprintas, praturtintas, pakeistas ir patobulintas (žr. 3 lentelė) [65].

3 lentelė. Funkcinio maisto rūšių apibūdinimai [65]

Funkcinio maisto rūšys	Apibūdinimas	Pavyzdžiai
Sustiprintas produktas	Maistas, kuris praturtintas papildomomis maistinėmis medžiagomis	Vaisių sultys, sustiprintos vitaminu C
Praturtintas produktas	Maistas su pridėtomis naujomis maistinėmis medžiagomis ar komponentais, kurių įprastai tame maiste nėra aptinkama	Margarinas su augaliniu sterolio esteriu, probiotikais, prebiotikais
Pakeistas produktas	Maistas, iš kurio yra pašalinamas kenksmingas komponentas ir jis yra pakeičiamas kita teigiamą poveikį darančia medžiaga	Tam tikri pluoštai, pvz., riebalų atpalaidavimo priemonės mėsos ar ledų produktuose
Patobulintas produktas	Maistas, kuriame vienas iš komponentų yra natūraliai sustiprinamas taikant specialias auginimo sąlygas, naują pašarų sudėtį, genetines manipuliacijas	Kiaušiniai su padidėjusiu omega-3 kiekiu gaunami pakeitus vištų auginimui skirtus pašarus

Džiovintų šaltalankių šalutiniuose produktuose yra gausu vertingų maistinių ir bioaktyviųjų junginių, todėl jie gali būti naudojami pašarams, maisto pramonėje pritaikomi funkcinio maisto gamyboje taip pat panaudojami farmacijoje [66]. Šaltalankio (*Hippophae rhamnoides*) uogoms būdingas didelis rūgštingumas, malonus skonis ir kvapas, geltona spalva, todėl jų įdėjimas į duoną galėtų ją praturtinti ir pakeisti įprastus šio produkto parametrus (spalvą, skonį, naudingumą sveikatai) [67]. Šaltalankių išspaudų liekanose yra daug fenolio junginių ir kvapiųjų medžiagų, todėl jie pasižymi dideliu antioksidaciniu ir antimikrobiniu aktyvumu. Deja dažniausiai didelis šių liekanų kiekis lieka nepanaudotas [68], nors ši šaltalankių frakcija gali būti panaudojama funkcionaliojo maisto gamyboje, pvz., duonos su sustiprintu antioksidaciniu aktyvumu gamybai [69].

Keptas maistas yra vienas iš dažniausiai vartojamų maisto produktų pasaulyje. Pasaulyje kiekvienais metais duonos yra suvartojama daugiau kaip devyni milijardai kilogramų. Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) rekomenduoja vienam gyventojui suvartoti apie 250 g per dieną iš rupių miltų pagamintos duonos. Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio yra skiriama funkcionaliosios kvietinių miltų duonos gamybai, kuri galėtų pagerinti sveikatą. Kvietinė duona yra geras energijos šaltinis, joje yra nepakeičiamos žmogaus organizmui reikalingos medžiagos, tačiau jos antioksidacinis aktyvumas yra mažas. Siekiant sustiprinti duonos antioksidacinį pajėgumą, ją galima praturtinti natūraliomis žaliavomis, kuriose yra gausu fenolio antioksidantų, pvz., grūdais, sėklomis, prieskoniais, žolelėmis ir žaliųjų augalų dalimis, vaisiais ar daržovėmis ir maisto pramonės atliekomis [69].

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

Šiame skyriuje pateikiami tyrimo objektai ir aprašomi naudoti standartiniai tyrimo metodai (mineralinių medžiagų, sausųjų medžiagų ir kt., medžiagų kiekio nustatymo ir procesų pvz., ekstrakcijos tirpkliais ir dujų chromatografijos atlikimo, metodikos).

2.1. Tyrimo objektai

Tyrimams buvo naudojami džiovinti šaltalankiai, kurie sietų pagalba buvo išfrakcionuoti į sėklas, odeles ir išspaudas. Vėliau šios frakcijos sumalamos laboratoriniu malūnu „Retsch ZM 200“. Džiovintos šaltalankių sėklos, odelės ir išspaudos nuriebalinamos superkritinės ekstrakcijos būdu su anglies dvideginiu (SKE-CO₂).

2.2. Standartiniai tyrimų metodai

2.2.1. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Tyrimui atlikti pasveriami tušti tigliukai, vėliau į juos įdedama apie 2-5 g paruošto šaltalankių vidutinio bandinio pasvėrus 0,0002 g tikslumu. Tuomet paruošti tigliukai su šaltalankių bandiniais išdžiovinami ir apanglinami kaitinant apie 30 min ant Kjeldalio plytelės traukos spintoje. Stebima, kad bandinys neužsiliepsnotų. Po to tigliukai pernešami į mufelinę krosnį, kurios temperatūra 500-550 °C, ir joje kaitinama. Kaitinimas vyksta tol, kol produktai pavirsta šviesios spalvos pelenais. Tuomet tiglio su pelenais atvėsinamas eksikatoriuje ir yra pasveriamas.

Mineralinių medžiagų kiekis tiriamuose bandiniuose apskaičiuojamas pagal gautų pelenų masę. Standartinė paklaida apskaičiuojama pagal formulę:

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

S imties standartinis nuokrypis,

n – imties vienetų skaičius.

2.2.2. Drėgmės ir sausųjų medžiagų kiekio nustatymas

Tyrimo metu į biuksus įpilama truputį smėlio, įdedama stiklinė lazdelė. Biuksai kaitinami džiovavimo krosnelėje. Iškaitinti jie yra vėsinami apie 30 min eksikatoriuje ir pasveriami analitinėmis svarstyklėmis. Po to biuksai dar kartą pakaitinami 30 min ir vėl yra atvėsinami eksikatoriuje bei pasveriami, tai kartojama tol, kol gaunama nekintanti biukso masė. Į paruoštus biuksus atsveriami 3-5 g sumaltų visų tiriamųjų šaltalankių frakcijų. Sėklų, odelių ir išspaudų bandiniai stikline lazdele gerai sumaišomi su smėliu. Biuksai su juose esančiomis tiriamomis medžiagomis džiovavimo krosnelėje yra džiovinami 1-3 val., tada per 30 min ataušinami eksikatoriuje ir pasveriami. Biuksai vėl yra dedami į džiovavimo krosnelę kaitinti 1 val. (procesas kartojamas tol, kol skirtumas tarp dviejų paskutinių svėrimų rezultatų būna ne didesnis nei 0,0004 g).

Drėgmės kiekis produkte skaičiuojamas procentais pagal formulę:

$$W = \frac{m1 - m2}{m1 - m0} \cdot 100 \%$$

m_0 – biukso (smėlio ir lazdelės) masė, g;

m_1 – masė biukso su mėginiu (smėliu ir lazdele) prieš džiovinimą, g;

m_2 – masė biukso su mėginiu (smėliu ir lazdele) po džiovinimo, g;

Sausų medžiagų kiekis nustatomas pagal formulę:

$$SM = 100 - W$$

SM – analizuojamo produkto pavyzdžio drėgmė, %.

W – analizuojamo produkto pavyzdžio drėgmė, %.

2.2.3. Baltymų kiekio nustatymas

Tyrimo metu pasveriami po 1 g sumaltų visų tiriamųjų šaltalankių frakcijų. Iš viso atliekami 3 bandymai. Pirmiausiai yra atliekama mėginių mineralizacija. Kolboje esanti analizuojama šaltalankių žaliava užpilama 20 ml H_2SO_4 (konc.), viskas gerai išmaišoma ir tada į bandinius dedamos katalizatoriaus tabletės. Kiekvienas mėginys yra kaitinamas 90 min. Analizei atlikti naudojamas Kjeldalio distiliavimo ir titravimo įrenginys. Iš pradžių jame yra paleidžiama programa Nr. 1 (kaitinama 90 min. 60 °C temperatūroje). Baigus kaitinti įrenginys išjungiamas ir bandiniai, išimti iš įrenginio, yra aušinami tol, kol tirpalai kolboje nuskaidrėja (procesas trunka apie 30 min. ir jis parodo, kad įvyko mineralizacija).

Toliau yra atliekamas mėginių distiliavimas. Atvėsintos kolbos su juose esančiais bandiniais yra dedamos į distiliavimo aparatą ir kiekvieno mėginio distiliavimo metu yra paleidžiama įrenginio programa Nr. 2. Kaskart šalia yra paruošiama kūginė 250 ml kolbutė distiliatui surinkti.

Po distiliavimo etapo yra vykdomas surinktų distiliatų titravimas (titravimui naudojama 0,1 M HCl). Prieš titruojant kaskart į kolbutėje esantį surinktą distiliatą yra įlašinami 2 lašai Taširo indikatorius, o tada jau yra pradedamas titravimas. Titruojama tol, kol žalia spalva pasikeičia į violetinę.

Visa procedūros (distiliavimo ir titravimo) tomis pačiomis sąlygomis yra atliekamos su paprastu distiliuotu vandeniu ta pačia eiga. Tokiu būdu yra paruošiamas nulinis bandinys, skirtas palyginti su analizuojamai mėginiais.

Formulė apskaičiuoti bendrą azoto kiekį:

$$N_{bendras} = \frac{(14 \times n \times K(V_1 - V_0))}{m} (\%)$$

1,4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,01 M arba 0,1 M HCl

V_1 – 0,1 M HCl kiekis sunaudotas tiriamajam bandymui nutitruoti, ml;

V_0 – 0,1 M HCl kiekis sunaudotas tuščiam bandymui nutitruoti, ml;

M – bandinio masė, g;

n – druskos rūgštis, naudotas titravimui, normalingumas (0,01 M arba 0,1 M HCl)

K – druskos rūgštis tirpalo pataisos koeficientas (1, jei nėra atliekamas atskiras įvertinimas).

Baltymų kiekis apskaičiuojamas:

$$B = N + K$$

B – bendras baltymų kiekis;

K – koeficientas, skirtas perskaičiuoti azoto kiekį į baltymų kiekį.

2.2.4. Bendro lipidų kiekio nustatymas

Išdžiovinti šaltalankių odelių, sėklų ir išspaudų mėginiai iš biuksų išimami ant filtro popierių. Viskas kruopščiai suvyniojama į filtrinį popierių (suformuojami paketėliai, kurie yra perišami siūlu), bandiniai pažymimi grafitiniu pieštuku (siekiama atskirti skirtingas frakcijas). Paruošti paketėliai pasveriami analitinėmis svarstyklėmis ir įdedami į Soksleto aparatą (įjungiamas elektros plytelė ir vandens šildytuvas). Bandiniai ekstrahuojami po 3 val., tada paketėliai išimami ir paliekami traukos spintoje, kad nugaruotų tirpiklis, o vėliau yra džiovinami džiovinimo spintoje 100-105 °C temperaturoje iki pastovios paketėlių masės.

Lipidų kiekis apskaičiuojamas pagal tai, kiek po ekstrakcijos sumažėjo masė paketėlio su tiriamuoju bandiniu.

Bandinio lipidų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{(m_1 - m_2)}{m} \cdot 100 \%$$

m_1 – suvynioto į filtrą bandinio svoris prieš ekstrakciją, g;

m_2 – suvynioto į filtrą bandinio svoris po ekstrakcijos, g;

m – bandinio svoris iki džiovinimo, g.

Standartinė paklaida apskaičiuojama pagal formulę:

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

S – imties standartinis nuokrypis,

n – imties vienetų skaičius.

2.2.5. Skaidulinių medžiagų nustatymas

Skaidulinės medžiagos nustatinėjamos naudojantis skaidulinių medžiagų aparatu „Berhr cf 2+2“, Vokietija, remiantis instrukcijos aprašymu.

Į biuksus atsveriami 1 g šaltalankių žaliavos. Pasverti biuksai su žaliava yra nuriebalinami su acetonu. Tuomet jie yra įtvirtinami į skaidulinių medžiagų aparatą „Berhr cf 2+2“. Pirmiausiai yra vykdomas pirminis biuksų su tiriamomis medžiagomis pakaitinimas. Toliau į kiekvieną biuksą įpilama po 150 ml karštos sieros rūgšties H₂SO₄ (0,13 M) ir jie yra kaitinami po 30 minučių. Po kaitinimo H₂SO₄ yra nufiltruojama. Toliau įrenginyje yra atliekamas praplovimas vandeniu, kurio metu į kiekvieną mėginį yra pilama po 50 ml karšto distiliuoto vandens ir vėl atliekamas nufiltravimas (jis kartojamas kelis kartus siekiant nuplauti žaliavą nuo įrenginio stiklo sienelių). Praplovus įrenginį vandeniu į kiekvieną biuksą yra pilama po 150 ml karšto kalio šarmo (KOH 0,23 M) ir bandiniai yra kaitinami 30 minučių. Po kaitinimo šarmas yra nufiltruojamas ir vėliau vėl vyksta praplovimas karštu vandeniu. Į biuksus įpilama po 50 ml karšto distiliuoto vandens ir atliekamas nufiltravimas, praplovimas vandeniu atliekamas 2 - 3 kartus.

Baigus plovimą visi bandiniai esantys įrenginyje yra papildomai yra nufiltruojami siekiant paruošti medžiagas džiovinimui, tada biuksai išimami iš aparato ir yra dedami į termostatą 5 val. esant 130 °C temperatūrai. Po termostato jie perkeliama į mufelinę krosnelę iškaitinimui. Iškaitinti mėginiai išimami iš mufelinės krosnies ir yra perkeliama į eksikatorių siekiant apsaugoti nuo drėgmės. Po to mėginiai yra pasveriami ant analitinių svarstyklių. Atlikus šiuos etapus yra gaunamos netirpios skaidulos, kurių kiekis apskaičiuojamas išdžiovinus ir įvertinus pelenų kiekį bandinyje.

Skaidulinės medžiagos apskaičiuojamos pagal formulę:

$$w_f = \frac{(w_2 - w_3)}{w_1}$$

w_f – skaidulinės medžiagos kiekis, (g/ 100 g);

w_1 – mėginio svoris, g;

w_2 – medžiagos svoriai su biuksu po išėmimo iš termostato, g;

w_3 – medžiagos svoriai su biuksu po mufeliavimo proceso, g;

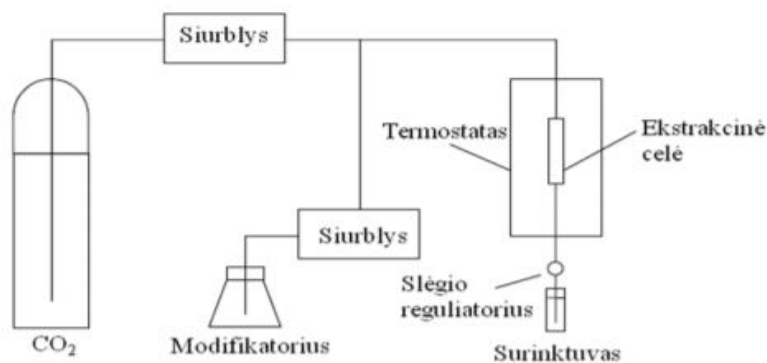
2.2.6. Uogų sėklų, išspaudų ir jų mišinio dalelių dydžio nustatymas

Sumaltų tiriamųjų šaltalankių frakcijų dalelių dydžiui nustatyti yra naudojama „Malvern Mastersizer 3000“ (MVLab) įranga. Prietaiso veikimo principas paremtas lazerio spindulio išsklaidyto kampo (difrakcijos) matavimais. Tiriamojo mėginio dalelėms praeinant pro matavimo kiuvetę nustatomas jų išsklaidyto spindulio kampas. Matuojant difrakciją lazerio spindulys praeina per išsklaidytą kietųjų dalelių mėginį ir kampinis išsibarsčiusio intensyvumo kitimas matuojamas šviesa. Didelės dalelės išsklaido šviesą mažais kampais, pluoštas ir mažos dalelės (lyginant su lazeriu) ją išsklaido dideliais kampais [70].

Fiksuojami parametrai: dalelių dydis, kiekis (koncentracija), dydžio pasiskirstymo kreivė (mėginio granulometrija), dalelių paviršiaus plotas, polidispersiškumas. Matavimo diapozonas - nuo 0.1 iki 2000 mikronų.

2.2.7. Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE - CO₂)

Šaltalankių frakcijų ekstrahavimas atliekamas naudojant „Helix 1“ ir „Helix 2“ ekstrakcijos sistemą („Applied Separation“, Allen–town, PA, USA). Superkritinių skysčių ekstrakcinės sistemos schema pateikiama paveiksle (žr. 4 pav.).

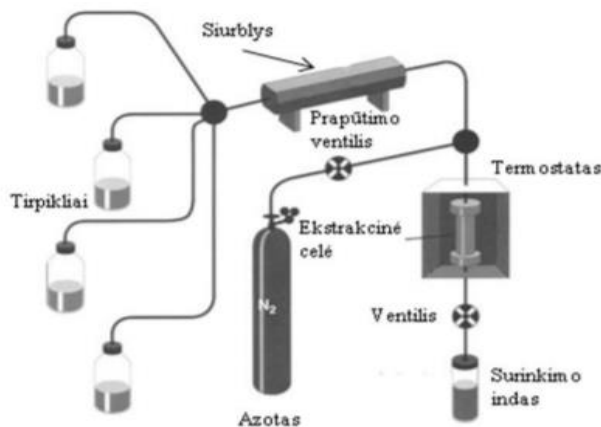


4 pav. Superkritinių skysčių ekstrakcinės sistemos schema [53]

Siekiant atlikti ekstrahavimą pasverta po 10 g sumaltų tiriamų šaltalankių odelių, sėklų ir išspaudų frakcijų, kurios yra dedamos į 50 cm³ tūrio celę. Su kiekviena žaliava iš pradžių yra atliekama statinė ekstrakcija, trunkanti 10 min., o jai pasibaigus pradeda dinaminė ekstrakcija. Toliau procesas vykdomas 500 cm³ tūrio celėje pasverūs po 100 g skirtingų žaliavos frakcijų, statinės ekstrakcijos trukmė – 30 min. Ekstrahavimo slėgis ir temperatūra nustatomi priklausomai nuo tiriamos žaliavos. Dinaminės ekstrakcijos metu palaikoma 60 °C temperatūra ir 35 MPa slėgis. Ekstraktui surinkti naudojami stikliniai buteliukai, kurie yra pasveriami prieš ekstrakciją. Pasibaigus ekstrakcijai surinkti ekstraktai laikomi tamsiuose stikliniuose buteliukuose, kurių kamščiai apvyniojami parafilmu (siekiama apsaugoti nuo drėgmės kaupimosi) ir yra saugomi šaldytuvuose 4 °C.

2.2.8. Ekstrakcija suslėgtais skysčiais

Ekstrakcijoms iš skirtingų šaltalankių frakcijų išgauti yra naudojamas ekstraktorius „ASE 350 TurboVap LV“ (žr. 5 pav.). Po SKE-CO₂ celėje likusios ekstrakcijos liekanos yra panaudojamos, su jomis atliekama daugiapakopė pagreitinta ekstrakcija naudojant vandenį ir etanolį. Mėginiai buvo ekstrahuojami atliekant po 3 ciklus, trunkančius 15 min. Etanolis pašalinamas rotaciniu garintuvu. Gauti ekstraktai tolimesniems tyrimams laikomi šaldytuve.



5 pav. Pagreitinotos skystųjų ekstrahcijos schema[53]

2.2.9. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas dujų chromatografijos metodu

SKE – CO₂ riebalų rūgščių ekstraktų, gautų iš skirtingų šaltalankių frakcijų po superkritinės ekstrahcijos anglies dvideginiu, sudėtis analizuojama taikant dujų chromatografijos (GC) metodą. Trigliceridų esterinimui ir laisvųjų riebalų rūgščių apmuilininimui paimama 0,1 g ekstrakto ir 0,8 ml metanolinio 0,5 M NaOH. Viskas supilama į apvaliadugnę kolbą ir kaitinama su grįžtamoju šaldytuvu, kol išnyksta riebalų fazė.

Po riebalų rūgščių esterifikacijos per grįžtamojo šaldytuvo viršų, naudojant pipetę, įpilama borotrifluorido/metanolio komplekso ir verdama dar 2 min., vėliau apvaliadugnė kolba išimama ir atšaldoma iki kambario temperatūros. Tada, siekiant praskiesti bandinį, į atvėsintą apvaliadugnę kolbą su mėginiu yra pilama 1 ml n-heksano ir viskas yra gerai supurtoma. Bandinys paliekamas nusistovėti, kol susidaro atskiri sluoksniai. Atsiskyrus sluoksniams viršutinė heksano fazė yra atsargiai surenkama ir laikoma šaldiklyje -20 °C temperatūroje, kad su ja būtų galima atlikti tolimesnius tyrimus. Analizei atlikti paimama 50 µl mėginio heksaninės fazės ir praskiesta 450 µl grynu heksanu, skirtu dujų chromatografijai.

Iš šaltalankių frakcijų išgautų riebalų rūgščių metilo esteriai analizuojami naudojant HRGC 5300 (Mega Series, Carlo Erba, Milan, Italija) liepsnos jonizacinį detektorių su poline SPTM – 2560 kolonėle (100 m ilgio, 0,25 mm vidinio skersmens, adsorbento sluoksnis 0,20 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, JAV).

Analizės parametrai:

- inžektoriaus temperatūra 220 °C;
- detektoriaus – 240 °C;
- krosnies temperatūra užprogramuota trimis pakopomis: nuo 80 °C didėjant iki 240 °C kas 4 °C/min.; nuo 135 °C iki 185 °C kas 4 °C/min. ir nuo 185 °C iki 240 °C kas 4 °C/min. su 5 min. išlaikymu.

Dujų chromatografe palaikomas 20 cm³/s helio dujų srautas. Bandinio įleidimui į chromatografinę kolonėlę yra paimama 1 µl praskiestos mėginio heksaninės fazės. Junginių identifikacijai naudojamas etaloninis riebalų rūgščių metilesterių mišinys. Gauti bandinių junginiai analizuojami palyginant jų

išlaikymo laikus su etalonu. Atliekami trys kiekvienos šaltalankių frakcijos bandinių analizės pakartojimai ir iš jų išvestas vidurkis pateikiamas rezultatuose.

2.2.10. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas Folin – Ciocalteu metodu

Bendras fenolinių junginių kiekis šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų ekstraktuose nustatomas po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE – CO₂) ir ekstrakcijos tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje. Naudojamos Singleton, Orthofer ir Lamuela Raventos (1999) metodikos su tam tikrais pakeitimais. Analizei paimama 150 µl mėginio ir sumaišoma su 750 µl Folin – Ciocalteu reagentu (2M), kuris prieš tai yra praskiedžiamas su distiliuotu vandeniu santykiu 1:9. Praėjus 3 min. po reakcijos į tą patį mėginį yra įpilama 600 µl Na₂CO₃ tirpalo. Vėliau mėginiai paliekami tamsioje vietoje 2 val., absorbcija matuojama spektrofotometru „Spectronic Genesys 8“ naudojant 760 nm bangos ilgį. Kalibracinei kreivei sudaryti naudojamas Galo rūgšties tirpalas. Bendras fenolinių junginių kiekis išreiškiamas galo rūgšties ekvivalentais (mg GRE/g) ir yra apskaičiuojamas naudojant formulę:

$$C = c_1 * v * m^{-1}$$

C – bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas ekvivalentais mg/g;

c₁ – galo rūgšties koncentracija (nustatyta pagal kalibracinę kreivę) mg/ml;

v – ekstrakto tūris, ml;

m – mėginio masė naudota ekstrakcijai, g.

2.2.11. 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties (ABTS⁺) laisvųjų radikalų katijonų surišimo metodas

Siekiant nustatyti tiriamųjų šaltalankių frakcijų antioksidacinį aktyvumą, taikomas laisvųjų radikalų surišimo metodas. Laisvųjų radikalų surišimas šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų ekstraktuose atliekamas po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE - CO₂) ir ekstrakcijos tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje. Tyrimas atliekamas pagal metodinį (Re ir kt., 1999) atlikus keletą pakeitimų. Pirmiausiai paruošiamas PBS - fosfato buferinis tirpalas, 1 litre distiliuoto vandens ištirpinama 8,18 g NaCl; 0,27 g KH₂PO₄; 1,42 g Na₂HPO₄ ir 0,15 g KCl. ABTS⁺ tirpalui paruošti naudojami du tirpalai. Pirmam tirpalui pagaminti pasveriamas 0,0549 g ABTS⁺ reagento ir ištirpinamas 50 ml PBS. Ruošiant antrąjį tirpalą pasveriamas 0,0038 g K₂S₂O₈ ir ištirpinama 200 µl distiliuoto vandens. Abu šie tirpalai yra sumaišomi, paliekama stovėti tamsoje 15-16 val. Tyrimui reikalingas darbinis tirpalas paruošiamas praskiedžiant ABTS⁺ tirpalą su PBS tirpalu. Kiuvetės su paruoštu darbinio tirpalu absorbcija matuojama spektrofotometru „Spectronic Genesys 8“. Matavimai kartojami tol, kol gauta absorbcija tampa lygi 0,700 ± 0,010 optinio tankio vienetų esant 734 nm bangos ilgiui. Tada paimama 25 µl tiriamojo bandinio ir sumaišoma su 1500 µl darbinio tirpalo. Sumaišytas bandinys paliekamas tamsioje vietoje 2 val. ir po to su spektrofotometru „Spectronic Genesys 8“ yra matuojama bandinio absorbcija esant 734 nm bangos ilgiui.

Bandinių antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas Trolokso ekvivalentais (mg TE/g ekstrakto). Laisvųjų radikalų surišimas apskaičiuojamas naudojantis formule:

$$A (\%) = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \cdot 100 \%$$

čia: A – laisvųjų radikalų surišimo aktyvumas, %;

A₁ – ABTS + reakcijos sistemos optinis tankis;

A₂ – sistemos su antioksidantu optinis tankis.

2.2.12. Deguonies radikalų absorbcijos gebos nustatymas (ORAC)

Siekiant nustatyti tiriamųjų šaltalankių frakcijų antioksidacinį aktyvumą, naudojamas deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymo būdas. ORAC tyrimas atliekamas remiantis Prior ir kt. (2003) metodikomis. Siekiant pasiruošti fluoresceino tirpalą, paruošiami keli tirpalai. Pirmasis tirpalas paruošiamas ištirpinant 0,0225 g fluoresceino 50 ml PBS tirpalo. Kitas tirpalas yra ruošiamas iš pirmo tirpalo paimant 0,25 ml ir sumaišant su 50 ml PBS tirpalo. Iš šio tirpalo paėmus 0,8 ml ir sumaišius su 50 ml PBS tirpalo galiausiai yra paruošiamas galutinis fluoresceino tirpalas.

Tada naudojant automatinę pipetę paimama 25 µl mėginio arba metanolio (tai yra kontrolinio mėginio) ir įpilama į juodą nepermatomą 96 šulinėlių mikrolėkštelę. Į bandinius yra įpilama po 150 µl galutinio fluoresceino tirpalo, tuomet lėkštelė yra dedama į FLUOstar Omega spektrofotometrą 15 min inkubacijai 37 °C temperatūroje. Po inkubavimo mikrolėkštelė yra išimama ir į kiekvieną šulinėlį su automatine pipete yra įpilama 25 µl paruošto AAPH (Azobio) tirpalo. Mikrolėkštelė vėl įdedama į spektrofotometrą. Prieš kiekvieną fluorescencinį matavimą mikroplokštelė spektrofotometre yra supurtoma ir matuojama atliekant 120 ciklų 37 °C temperatūroje esant 485 ir 520 nm bangų ilgiams. Kalibracinės kreivės sudaryti naudojamos įvairios Trolokso tirpalų koncentracijos. Antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas Trolokso ekvivalentais (mg TE/g). Po kalibracinės kreivės esantis plotas (AUC) kiekvienam bandiniui apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę. AUC apskaičiuojamas pagal (5) formulę:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_i}{f_0}$$

f₀ – pradinė fluoresceino vertė (0 min);

f_i – fluoresceino vertė tam tikrą laiką.

2.2.13. Tokoferolių ir fitosterolių nustatymas

Į 15 ml mėgintuvėlį pasveriamas 100 mg mėginio (ekstrakto), įpilama 3 ml etilo alkoholio (EtOH) ir 0,1 % tretinio – butilhidroksichinono (TBHQ) tirpalo. Naudojant „vortex“ įrenginį mėgintuvėlis yra maišomas 10 s, po to įdedamas 5 min į vandens vonią 85 °C. Išėmus iš vandens vonios mėgintuvėlį, į jį su automatine pipete yra įpilama 0,19 ml 10 mol/l KOH tirpalo, vėl maišoma 10 s su „vortex“, tada dedama 5 min į vandens vonią 85 °C. Mėgintuvėlis išimamas po 5 min ir maišomas 10 s su „vortex“, išmaišius dedama į ledo vonią ir laikoma 5 min. Po 5 min mėgintuvėlis išimamas ir naudojant automatinę pipetę į mėgintuvėlį įpilama 3 ml 1 mol/l NaCl tirpalo, tada mėgintuvėliai švelniai 5 kartus yra apverčiami. Į mėgintuvėlį su automatine pipete įlašinama 3 ml heksano, tada maišoma 10 s su „vortex“. Išmaišytas mėgintuvėlis nešamas centrifuguoti su nustatytomis tokiomis sąlygomis 1000 aps/ min, 5 min, 4 °C. Po centrifugavimo iš mėgintuvėlio su automatine pipete atskiriamas viršutinis sluoksnis ir perkeliamas į naują mėgintuvėlį, ši heksano ekstrakcija pakartojama dar du kartus. Mėgintuvėlyje esantis viršutinis sluoksnis praplaunamas 5 ml 5 % Na₂CO₃

tirpalu, tuomet mėgintuvėlis švelniai apverčiamas 5 kartus ir dedamas centrifuguoti tokiom sąlygom 1000 aps/ min, 5 min, 4 °C. Išėmus mėgintuvėlį iš centrifūgos, viršutinis sluoksnis su automatine pipete perkeliamas į naują mėgintuvėlį. Tada naujame mėgintuvėlyje esantis viršutinis sluoksnis yra perplaunamas su ultra švariu vandeniu, tuomet mėgintuvėlis apverčiamas 5 kartus ir viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują mėgintuvėlį. Tuomet viršutinis sluoksnis esantis mėgintuvėlyje nešamas nugarinti po azotu kambario temperatūroje. Po nugarinimo į mėgintuvėlį įpilama 0,25 ml izopropilo alkoholio, ištirpinus viršutinį sluoksnį izopropilo alkoholyje, gautas tirpalas yra filtruojamas. Tada atliekama aukštos kokybės skysčių chromatografija su diodų matricos detektoriumi.

2.2.14. Triacilglicerolių sudėties nustatymas ultra efektyviosios skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu

Siekiant nustatyti aptinkamų triacilglicerolių kiekius esant skirtingoms frakcijoms ir ekstrakcijos skirtingiems būdams, taikyta tyrimo metodika remiantis A. Zeb ir kt. (2010), analizė atliekama naudojant „Waters Acquity“ efektyviosios skysčių chromatografijos sistemą, sujungtą su hibridiniu kvadropoliniu – skriejimo laiko masių spektrometru. Ultra efektyviosios skysčių chromatografijos (UPLC) sistemą susideda iš binarinių tirpiklių valdymo ir bandinių valdymo bloką, kolonėlės šildytuvo, sujungtas su masių spektrometru, ir teigiamu režimu veikiančiu ESI šaltiniu. Įrenginių kontrolė ir duomenų apdorojimas atliekamas su programine įranga. Atliekamas analičių skirstymas su analitine kolonėle esant 20 °C automatinio bandinių ėmimo įrenginio temperatūrai, o kolonėlės krosnies temperatūrai esant 40 °C. Analitės išplovimas tirpikliu (eliuojamos) išlaikant pastovią koncentraciją judriojoje fazėje (naudojama izokratinė tirpiklių sistema), sudaryta iš 18 % izopropanolio metanolyje su 0,1 % acto rūgšties. Tirpiklių sistemoje naudotas 0,05 % amonio acetatas (NH₄CH₃CO₂), srauto greitis 0,4 mL/min., atskyrimo laikas – 10 min., fragmentavimo potencialas 150 V, dujos naudojamos džiovinimui, jų temperatūra siekia 350 °C, jonizacijos įtampa – 4000 V. ESI-MS spektrai gaunami 200–1000 m/z intervale [71].

2.2.15. Karotinoidų analizė

Remiantis Zymone ir kt. (2018) siūlomu spektrofotometriniu metodu atliekamas bendro karotinoidų kiekio nustatymas. Jų kiekis apskaičiuojamas pagal β-karotino kalibracinę kreivę ir išreikiamas mg β-karotino/g ekstrakto. Heksane ištirpinamas β-karotino standartas, spektrofotometru „Spectronic Genesys 8“ matuojama ekstraktų absorbcija esant 450 nm bangos ilgiui. Atliekami trys bandymų pakartojimai ir iš registruojamų reikšmių išvedamas vidurkis, kuris pateikiamas kaip galutinis karotinoidų kiekio nustatymo rezultatas [72].

2.2.16. Duonos su skirtingomis šaltalankių frakcijomis gamyba

Duonos kepimui naudojama elektrinė duonkepė „Classics 18036-56“ (Russell Hobbs, Jungtinė Karalystė). Duonos kepiniams gaminti naudojama prancūziška duonos receptūra (žr. 4 lentelė).

4 lentelė. Prancūziškos duonos receptūros ingredientai

Ingredientai	Kontrolinė duona	Duona su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 5 % šaltalankių frakcijomis	Duona su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 10 % šaltalankių frakcijomis
Vanduo	200 ml	25 ml	50 ml
Druska	3,79 g	3,79 g	3,79 g
Miltai	360 g	342 g	324 g
Šaltalankių frakcijos	0	18 g	36 g
Mielės	2,72 g	2,72 g	2,72 g

*vandens kiekis galėjo būti koreguojamas vertinant skirtumą tarp miltų ir šaltalankių frakcijų

Remiantis nurodyta receptūra visi naudojami ingredientai sudedami nurodyta tvarka. Pirmiausiai į kepimo indą įpilamas 32 °C temperatūros vanduo, dedama druska, miltai ir mielės, duonkepė uždaroma ir jos nustatymuose parenkami vidutinio apskrudimo ir mažiausio kepimo dydžio parametrai, paleidžiama programa. Kiekvieno proceso bendras maišymo, kildinimo ir kepimo laikas 3 val 41 min. Iškepusi duona yra išimama iš duonkepės ir paliekama atvėsti kambario temperatūroje. Duona yra naudojama tolimesniems tyrimams.

Praturtinant duonos receptūras skirtingomis šaltalankių frakcijomis visi duonkepės kepimo parametrai paliekami tie patys.

Duonos kepimo metu dalis miltų yra pakeičiama fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 5 % ir 10 % frakcijomis po CO₂ ekstrakcijos. Pirmiausiai šių frakcijų atsverti kiekiai (atitinkamai 18 g ir 36 g) yra užpilami 180 ml vandens ir yra veikiami rankinio ultragarsinio homogenizatoriaus „UP200Ht“ („Hielscher“, Vokietija) ultragarsu 20 min su 200 W galia. Vėliau ultragarsu paveiktos šaltalankių frakcijos yra parūgštinamos citrinos rūgštimi iki 4,5 pH ir tuomet naudojant automatinę pipetę įdedama 1,08 ml fermento, sumaišoma ir 4 val. laikoma 40 °C temperatūroje. Vėliau fermento paveiktos šaltalankių frakcijos kartu su kitais ingredientais yra sudedami į kepimo indą duonkepėje pagal prieš tai minėtą receptūrą ir eiliškumą. Atliekama po tris kiekvieno kepimo pakartojimus naudojantis tomis pačiomis duonkepėmis.

2.2.17. Drėgmės kiekio nustatymas duonoje

Drėgmės kiekiui duonoje nustatyti naudojamas drėgnomatis „KERN DLB 160-3A“. Iš duonos riekės paimama apie maždaug 1 g minkštimo ir įdedama į drėgnomačio mėginio lėkštelę. Tada, vadovaujantis prietaiso gamintojo instrukcijomis, drėgnomatyje esantis duonos mėginys pasveriamas ir džiovinamas iki 105 °C temperatūros tol, kol nekinta mėginio masė. Pagal nustatytą masių skirtumą apskaičiuojamas drėgmės kiekis.

2.2.18. Duonos tūrio nustatymas

Duonos tūris nustatomas pagal kepinio išstumtų kruopų kiekį, kuris išmatuojamas matavimo cilindru ir išreiškiamas cm³. Paimamas indas su tam tikru sorų kruopų kiekiu. Kad inde esančio kruopų kiekio

paviršius būtų lygus, jis yra nubraukiamas liniuote. Tada kruopos perpilamos į kitą indą. Duona dedama į tuščią indą, tada ji yra užpilama kruopomis, kurių perteklius yra nubraukiamas liniuote, kad užpiltas ant duonos kruopų paviršius būtų lygus. Duona išstumia savo tūrį atitinkantį sorų kruopų kiekį. Išstumtas sorų kruopų kiekis išmatuojamas matavimo cilindru.

2.2.19. Duonos minkštimo akytumo nustatymas

Duonos minkštimo akytumas nustatomas remiantis standartizuota LST 1442:1996 metodika. Naudojantis Žuravliovo prietaisu išpjaunamas cilindrinis duonos gabalėlis. Išpjaunami 2 – 4 mėginiai siekiant gauti tikslesnius rezultatus. Jie yra pasveriami analitinėmis svarstyklėmis 0,01 g tikslumu ir apskaičiuojamas jų masės vidurkis. Duonos minkštimo akytumas (%) apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{V - G}{\frac{d}{V}} \cdot 100 (\%)$$

čia: V – išpjovos tūris, cm³;

G – išpjovos masė, g;

d – beporio minkštimo santykinis tankis (kvietinių miltų 550 - 1050 kepiniui – 1,31).

2.2.20. Duonos spalvos įvertinimas

Duonos spalvos matavimams naudojamas spektrofotometras CM – 700d (Japonija). Pasirenkama, kokie parametrai bus matuojami CIE L*a*b*, Delta E (ΔE*ab)*. CIE Lab tridimensinėje skalėje L apibūdina šviesumą, o skaitinė vertė – spalvą (0 – juodą spalvą, o 100 – baltą spalvą). A * ašies neigiamos vertės reiškia polinkį į žalią, o teigiamos – į raudoną spalvą. B * ašies neigiamos vertės turi polinkį į mėlyną spalvą, o teigiamos į geltoną spalvą.

Delta E (ΔE*ab) – spalvų skirtumui apskaičiuoti naudojama ši formulė:

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

2.2.21. Juslinė duonos analizė

Atliekama šaltalankių išspaudų priedo poveikio analizė kvietinės duonos juslinėms savybėms. Jusliniame vertinime dalyvavo 6 vertintojų grupė. Vertintojai atrenkami ir apmokomi dirbti pagal ISO 8586. Vertinimas yra uždaras ir atliekamas pagal ISO 8589 reikalavimus įrengtose instituto juslinės analizės laboratorijos kabinose. Prieš vertinimą duonos vėsinamos kambario temperatūroje 24 val. Tada duona yra supjaustoma riekelėmis (4 mm storio), sudedama į trijų skaitmenų kodais pažymėtus indelius ir pateikiama vertintojams. Vertintojų skonio receptorių atstatymui naudojamas beskonis, bekvapis kambario temperatūros vanduo bei šilta silpna nesaldinta arbata.

Tiriamųjų duonų kiekvienos savybės intensyvumas vertinamas skaitmeninėje sugraduotoje 15 žingsnių skalėje: 1 – savybė nejaučiama, 2 – labai silpnai išreikšta, 7 – vidutiniškai išreikšta, 8 – pakankamai išreikšta, ... 15 – labai stipriai išreikšta.

2.2.22. Virškinimo *in vitro* proceso įvertinimas

Tyrimo metu naudota per 0,2 mm sietelį sumalta duona su šaltalankių 10 % odelėmis ir duona su šaltalankių 10 % sėklomis po CO₂ ekstrakcijos (abiems mėginiams tirti naudotos žaliavos, t. y. odelės ir sėklos, buvo paveiktos ultragarsu ir fermentuotos). Analizuotos 3 virškinimo fazės, kurioms paruošta po 2 mėginius (vienas su šaltalankių 10 % odelėmis, kitas su 10 % sėklomis), daroma po 2 tyrimo pakartojimus.

Pirmai fazei (burnoje) paruošta 1 g sumalto mėginio yra paveikiamas 7 ml amilazės tirpalo (32,5 mg α - amilazės ištirpinama su 25 ml kalcio chlorido (CaCl₂)), mėginius 30 min. inkubuojama 37 °C temperatūroje. Antrai fazei (skrandyje) paruošiami 4 mėginiai iš pirmosios fazės mėginių (po virškinimo burnoje), parūgštinant juos iki 2 pH 1 M ir 0,1 M druskos rūgštimi (HCl) ir paveikiama 1,2 ml pepsino (0,4 g pepsino ištirpinama su 2,5 ml 0,1 M HCl), mėginius 2 val. inkubuojama 37 °C temperatūroje. Trečiai fazei (žarnyne) paruošiami 2 mėginiai, iš antrosios fazės mėginių (po virškinimo skrandyje). Jie yra šarminami iki 6 pH su 1 M ir 0,1 M natrio hidrokarbonatu (NaHCO₃) ir pilama 3 ml pankreatino tulžies ekstrakto (jis gaunamas 0,1 g pankreatino ir 0,625 g tulžies ekstrakto ištirpdant su 25 ml 0,1 M NaHCO₃), tada toliau pH keliamas iki 7,5 ir mėginiai inkubuojami 2 val. 37 °C temperatūroje.

Atlikus kiekvienos virškinimo fazės mėginių inkubacijas, paruošti bandiniai, reikalingi tyrimui atlikti, yra išimami iš purtyklės. Du paskutiniai mėginiai (ir tyrimo pakartojimo bandiniai) po paskutinės fazės 4 min. yra dedami į verdantį vandenį, toliau atvėsunami leduotame vandenyje ir 30 min. centrifuguojami esant 4800 rpm.

Toliau yra nustatinėjamas šaltalankių antioksidacinis aktyvumas. Kiekvieno bandinio (po visų fazių) 1 ml yra perfiltruojamas siekiant atskirti apvirškintą dalį. Siekiant įvertinti šaltalankių odelių ir sėklų skirtingose virškinimo fazėse antioksidacinį aktyvumą, naudojamas „e-BQC lab“ įrenginys. Įrenginys turi specialias tyrimui atlikti naudojamas matavimo juosteles, ant kurių yra užlašinama 40 μ L distiliuoto vandens, siekiant atsargiai nuplauti, nuvalyti dulkes nuo matavimo zonos. Tai atlikus ant juostelės lašinama 40 μ L bandinio, atliekamas medžiagų antioksidacinio aktyvumo matavimas (rezultatai registruojami įrenginio ekrane).

2.2.23. Statistinė analizė

Tyrimo metu gauti duomenys apdorojami naudojant statistinės duomenų analizės programas Microsoft Office Excel ir ANOVA. Eksperimentai yra kartojami po du arba tris kartus, o duomenys išreiškiami vidurkiais \pm STDEV %.

3.TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame skyriuje pateikiami skirtingų šaltalankių frakcijų cheminės sudėties įvertinimo, ekstrahavimo metodais išgautų ekstraktų ir pritaikymo funkcionaliajai duonai rezultatai.

3.1. Šaltalankių sėklų, išspaudų ir jų mišinio cheminės sudėties įvertinimas

Skirtingų šaltalankių frakcijų cheminė sudėtis priklauso nuo daugybės sąlygų: veislės, klimato, nokinimo lygio ir auginimo metodų [3].

Šaltalankių sėklose, odelėse ir išspaudose nustatyti bendriniai baltymų, mineralinių medžiagų, drėgmės ir lipidų kiekiai. Gauti rezultatai (žr. 5 lentelė) lyginami su mokslinės literatūros duomenimis.

Džiovinose šaltalankių išspaudose nustatyta 9,42 % baltymų, šis kiekis yra mažesnis nei kitų mokslininkų pateikiamuose džiovintų šaltalankių išspaudų rezultatuose (L. Dienaitės [3] 16,74 %, Nuernberg [73] (14,6 %) arba Pavlović [74] 14,78 %). Nustatytas mineralinių medžiagų kiekis odelėse – 1,53 %, jis yra mažesnis, nei pateikiamas L. Dienaitės [3] 1,88 %. Lipidų kiekis, nustatytas sausose odelėse - 7,32 %. Įvairių mokslinių straipsnių autoriai nurodė, kad lipidų kiekiai gali labai skirtis priklausomai nuo frakcijų [30, 75]. Odelėse nustatytas drėgmės kiekis yra 1,68 % mažesnis nei pateikia Pavlović [74], kuris gavo 5,68 %. Taigi, palyginus rezultatus su kitų mokslininkų gautais duomenimis, galima sakyti, kad skirtingų šaltalankių frakcijų cheminės sudėties pasiskirstymas labai priklauso nuo uogų veislių ir jų paruošimo metodų [3].

Tiriamųjų medžiagų kiekiai pakito po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu SKE – CO₂. Kadangi CO₂ yra nepolinis tirpiklis, todėl jis gali ištirpinti nepolines medžiagas ir šiek tiek polinius junginius. Dėl šios priežasties po SKE – CO₂ nuriebalintose sėklų, odelių ir išspaudų liekanose atitinkamai padidėjo kitų medžiagų kiekiai: baltymų, azoto ir mineralinių medžiagų (žr. 5 lentelė)[76].

Daugiausiai drėgmės nustatyta džiovintose šaltalankių sėklose, o mažiausiai šaltalankių išspaudose. Džiovinose šaltalankiuose sėklose prieš ir po SKE – CO₂ nustatyta daugiausiai, azoto, baltymų ir mineralinių medžiagų, o mažiausiai – odelėse (žr. 5 lentelė).

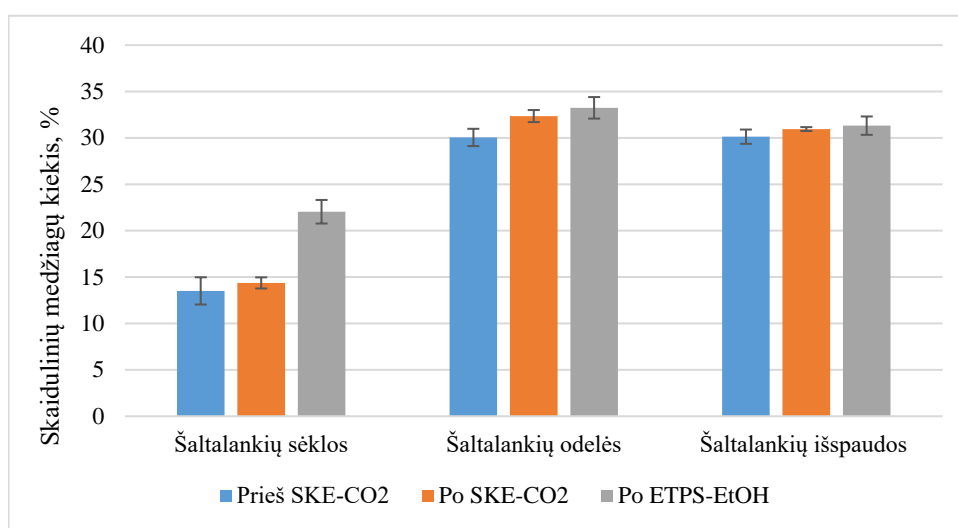
5 lentelė. Šaltalankių prieš ir po SKE-CO₂ cheminė sudėtis

Produkto pavadinimas	B- bendras baltymų kiekis		Mineralinių medžiagų kiekis, %		Drėgmės kiekis, %	Sausųjų medžiagų kiekis, %	Lipidų kiekis produkte, %
	Prieš SKE – CO ₂	Po SKE – CO ₂	Prieš SKE – CO ₂	Po SKE – CO ₂			
Šaltalankių sėklos	33,25 ± 0,87	40,55 ± 2,71	2,03 ± 0,02	3,46 ± 1,00	8,56 ± 0,95	91,44 ± 0,95	8,18 ± 0,93
Šaltalankių odelės	9,42 ± 0,12	9,95 ± 0,34	1,53 ± 0,01	2,71 ± 0,16	4,00 ± 0,17	96,00 ± 0,17	7,32 ± 0,42
Šaltalankių išspaudos	23,68 ± 0,25	26,47 ± 0,43	1,76 ± 0,05	2,94 ± 0,02	3,89 ± 0,22	96,11 ± 0,22	6,75 ± 0,99

3.2. Skaidulinių medžiagų įvertinimas skirtinguose šaltalankių frakcijose

Skaidulinių medžiagų kiekis įvertintas trijose tiriamosiose šaltalankių frakcijose: sėklose, odelėse ir išspaudose. Įvairiuose literatūros šaltiniuose yra minima, kad sausoje šaltalankių žaliavoje yra gausu angliavandenių, kuriuos sudaro monosacharidai, krakmolai ir kitos polisacharidų formos, išreikštos skaidulomis. Šių skaidulų pagrindą sudaro neutralaus detergento tirpale netirpi ląsteliena (NDF) ir rūgštaus detergento tirpale netirpi ląsteliena (ADF) [77].

Tyrimo metu buvo stebima, kaip pakito skaidulinių medžiagų kiekis prieš superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE-CO₂) ir po jos, bei kokį poveikį tam turėjo ekstrahavimas padidinto slėgio aplinkoje (ETPS). Iš gautų rezultatų (žr. 6 pav.) galima matyti, kad po SKE – CO₂ skaidulinių medžiagų kiekis nežymiai pakito šaltalankių sėklose – (14,37 ± 0,93 %), odelėse – (32,35 ± 0,65 %) ir išspaudose – (30,95 ± 1,16 %).



6 pav. Skaidulinių medžiagų įvertinimas skirtingose šaltalankių frakcijose prieš ir po superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE – CO₂) ir ekstrakciją padidinto slėgio aplinkoje su etanoliu (ETPS – EtOH)

Didžiausias skirtumas yra matomas po ETPS šaltalankių sėklose. Taigi, nepriklausomai nuo ekstrakcijos būdo, skaidulinių medžiagų kiekis sėklose, odelėse ir išspaudose padidėjo. Viena iš priežasčių galėtų būti tai, kad iš žaliavos pašalinus lipofilinius junginius padidėja kitų medžiagų kiekis. Tačiau visiškai kitokius rezultatus apie šaltalankių išspaudose aptinkamus skaidulinių medžiagų kiekius prieš ir po SKE – CO₂ pateikia K.M. Linderborg (prieš – 24,10 %, o po SKE-CO₂ – 21,20 % ir ETPS – 23,40 % [78]). Tokius tyrimo rezultatus galėjo nulemti tai, kad tyrimam buvo naudojami kitokios veislės šaltalankiai, kurie auginti ne Europoje. Tai nurodo, kad galėjo skirtis jų bendrinė cheminė sudėtis, nes skiriasi jų augimo klimatinės sąlygos. Autorės straipsnyje nėra tiksliai nurodomi ekstrakcijų metu naudoti slėgiai ir temperatūros. Taigi, palyginus rezultatus su pateikiamais literatūroje, galima daryti išvadą, kad šiuos skirtumus galėjo lemti kitokia šaltalankių veislė, klimato sąlygos ir skirtingi ekstrakcijos parametrai.

3.3. Šaltalankių frakcijų dalelių pasiskirstymas

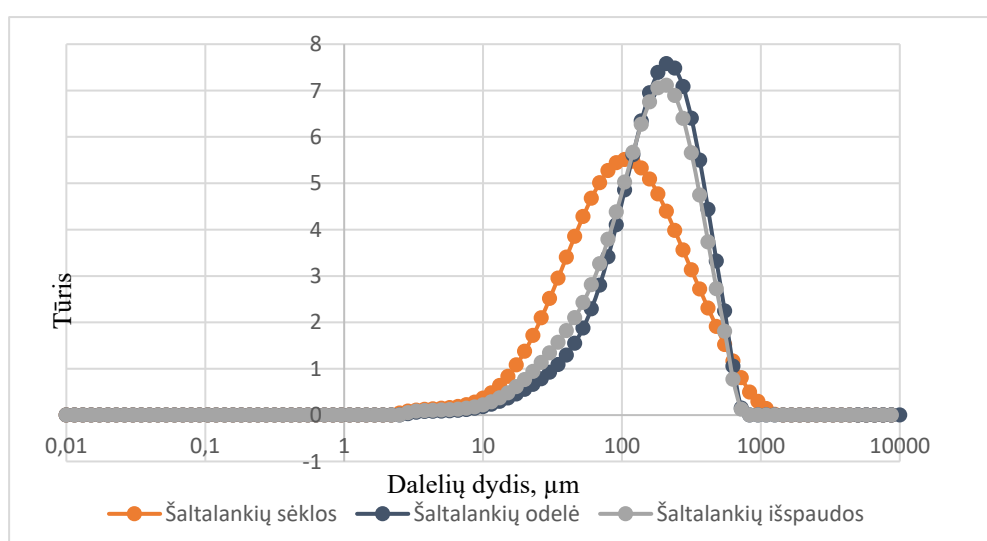
Moksliniuose straipsniuose teigiama, kad dalelių dydis turi poveikį įvairioms fiziniams ir sensoriniams susmulkintos žaliavos savybėms. Dalelių dydis reikšmingai gali turėti įtakos jusliniam vertinimui t.y.

spalvai, išvaizdai, skoniui ir bendram priimtinumui. Jų forma ir dydis daro poveikį sumaltos žaliavos užimamam tūriui [79]. Sumaltų dalelių struktūra veikia vandens rišamumą. Taigi, žaliavos struktūra gali lemti jos fizines savybes ir daryti poveikį hidratacijoms savybėms (dėl padidėjusio paviršiaus ploto ir tūrio padidėja vandens surišimo savybės) [80].

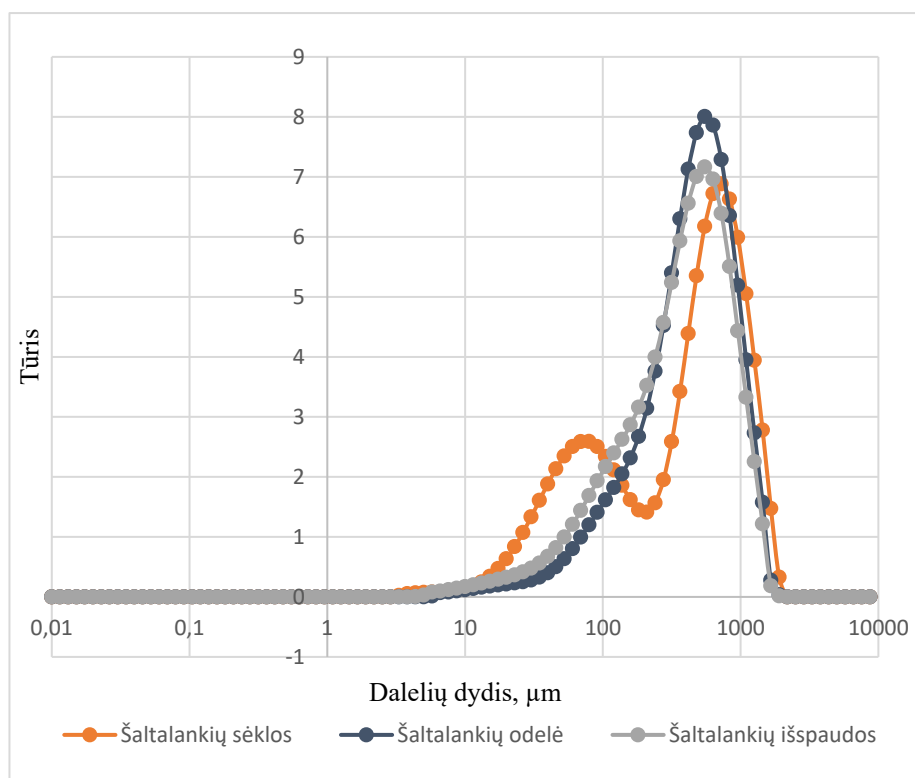
Iš gautų rezultatų pastebima, kad didžiausias dalelių dydžio pasiskirstymo vidurkis pagal paviršiaus plotą yra šaltalankių susmulkintose odelėse, praeinančiose per 0,5 mm dydžio sietą, o mažiausias – sėklose susmulkintose ir praeinančiose per 0,2 mm dydžio sietą. Didžiausi dalelių dydžio pasiskirstymai pagal tūrį yra sėklose ir odelėse susmulkintose ir praeinančiose per 0,5 mm dydžio sietą, o mažiausi – susmulkintose sėklos, praeinančiose per 0,2 mm dydžio sietą. Didžiausias dalelių dažnis (Span) nustatytas sėklose susmulkintose ir praeinančiose per 0,2 mm dydžio sietą (žr. 6 lentelė). Tai gali būti dėl to, kad sėklų dalelės kai kur galėjo sukibti dėl šaltalankių sėklose aptinkamų nesocijų riebalų rūgščių [15]. Žaliava buvo susmulkinama ir iki mažesnio dalelių dydžio, kurios praeina per mažesnio dydžio sietą (žr. 7 pav.). Nepaisant vienodų malimo sąlygų, odelių, sėklų ir išspaudų dalelių dydžiai skiriasi. Tam galėjo turėti poveikį žaliavos kiekis, jos trapumas, cheminė sudėtis, riebalai [81].

6 lentelė. Šaltalankių frakcijų dalelių dydžio pasiskirstymas

Mėginys	Dalelių pasiskirstymas pagal paviršiaus plotą, μm		Dalelių pasiskirstymas pagal tūrį, μm		Span	
	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5
Sėklos	62,37 \pm 4,31	124,40 \pm 8,81	169,24 \pm 7,37	552,71 \pm 39,91	3,21 \pm 0,31	2,33 \pm 0,13
Odelės	102,36 \pm 1,72	223,75 \pm 9,24	221,10 \pm 2,19	545,54 \pm 29,74	1,96 \pm 0,04	1,90 \pm 0,03
Išspaudos	87,38 \pm 3,81	171,17 \pm 9,79	202,02 \pm 10,22	490,57 \pm 24,72	2,10 \pm 0,03	2,13 \pm 0,05



7 pav. Šaltalankių skirtingų frakcijų susmulkintų per 0,2 mm dydžio sietą pasiskirstymas pagal dažnį

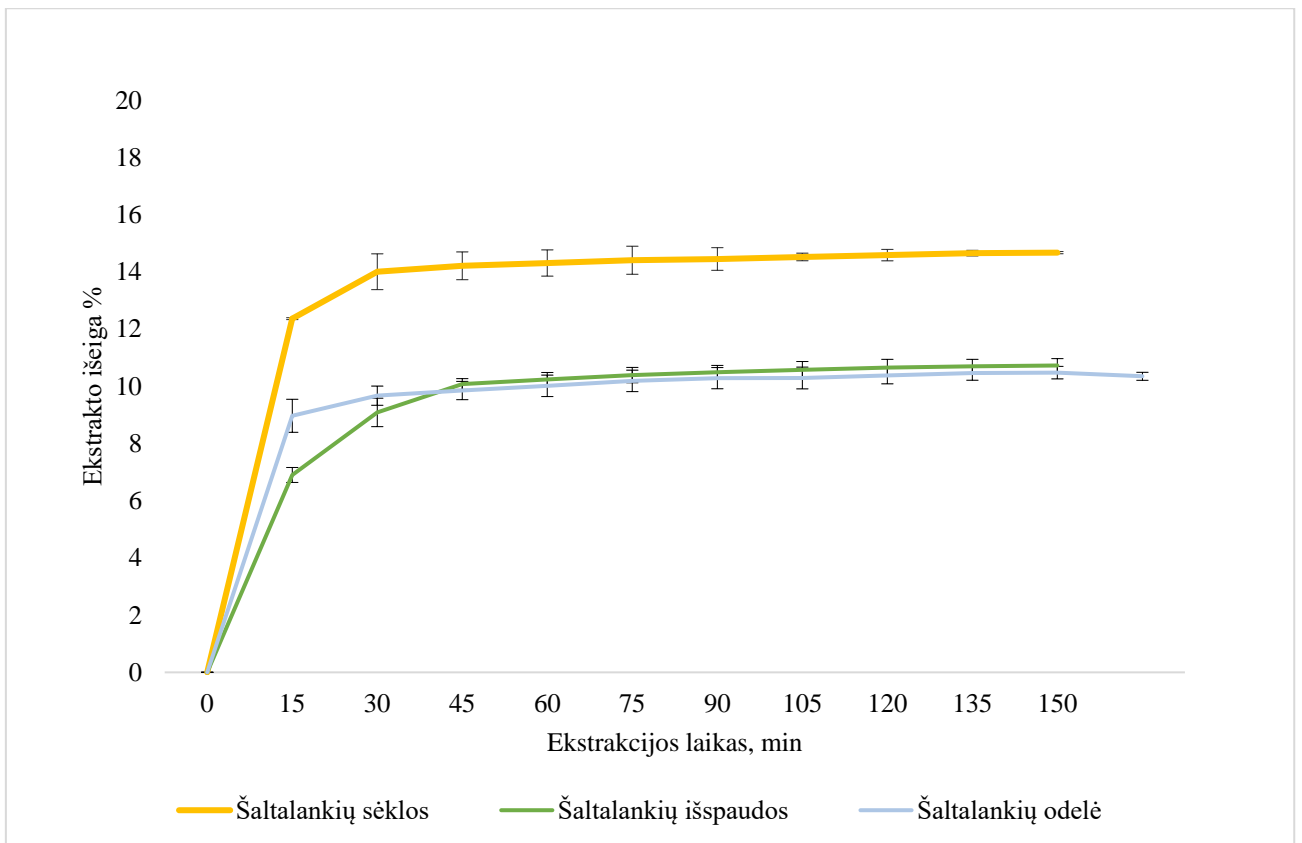


8 pav. Šaltalankių skirtingų frakcijų susmulkintų per 0,5 mm dydžio sietą pasiskirstymas pagal dažnį

3.4. Ekstrakcijų nepoliniais tirpikliais įvertinimas

Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE – CO₂) – puikus būdas išskirti natūralias medžiagas ir vertingus komponentus iš augalinių medžiagų, nes šilumai jautrūs junginiai gali būti išgaunami jiems nesuskylant. Tai yra efektyvus būdas išekstrahuoti lipofilinius uogų junginius [3, 58, 82]. Naudojant superkritinius skysčius, kaip anglies dvideginis, būna geresnis masės transportavimas dėl mažesnio klampumo, nesusidaro toksinių likučių ir atsiranda galimybė perdirbti superkritinį tirpiklį. Naudojant CO₂ kaip nepolinį tirpiklį, pagerėja ekstrakcijos efektyvumas, tačiau SKE – CO₂ modeliavimas gali būti netikslus, jis reikalauja didelių energetinių resursų norint pasiekti kritinį tašką ir yra naudojama santykinai brangiai kainuojanti įranga [58]. Ekstrakcijos išėigą gali veikti pagrindiniai trys veiksniai: laikas, slėgis ir temperatūra. Modifikuojant šiuos kintamuosius galima keisti ekstraktų išėigą (ekstrakcijos parametrai dar gali būti keičiami norit išgauti tikslius junginius).

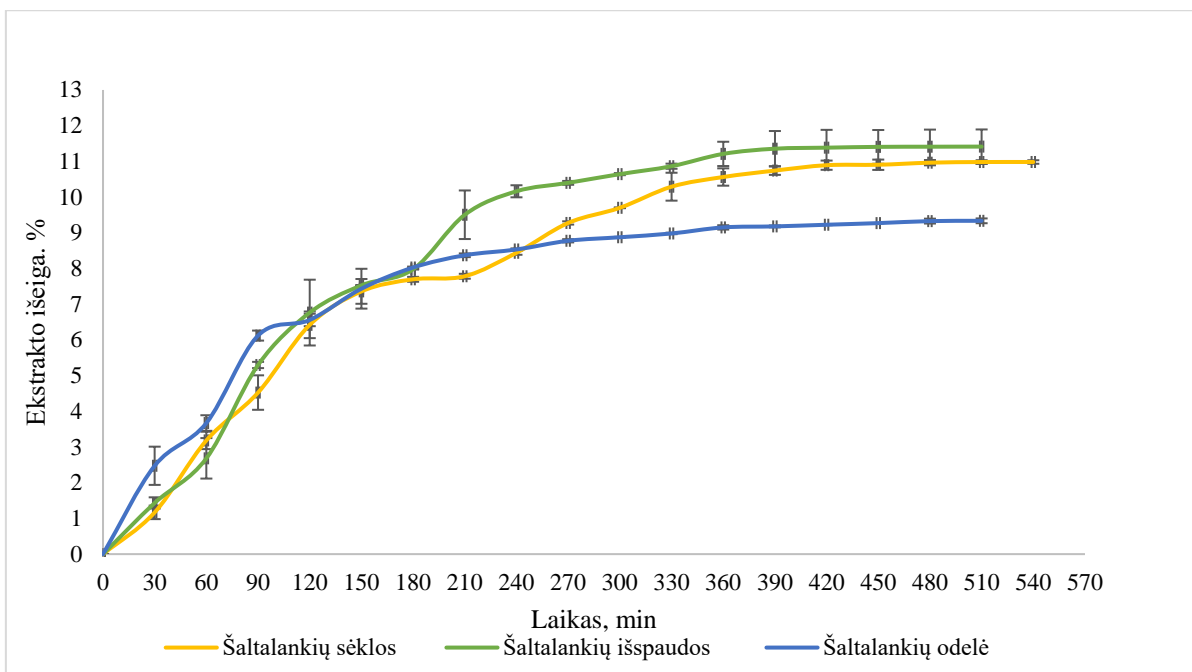
Atliekama SKE – CO₂ ekstrakcijos kinetinių kreivių, gautų naudojant skirtingo tūrio celes, analizė. Superkritinės ekstrakcijai anglies dvideginiu (SKE – CO₂) naudojant 50 cm³ tūrio celę nustatyta, kad daugiausiai šaltalankių sėklų ekstrakto išgauta per 15 min. – 12,36 % išėigos, vėliau nuo 15 min iki 150 min išėiga kito nežymiai (nuo 12,36 % iki 14,67 %). Mažiausia apskaičiuota išėiga gauta iš šaltalankių odelių ekstrakto, kuri per pirmas 15 min. siekė – 8,97 % , o po 15 min iki 165 min odelių ekstrakto išėiga kito nežymiai (nuo 8,97 % iki 10,35 %). Visais ekstrahavimo atvejais buvo naudotas tas pats medžiagos svoris, ekstrakto svorio pokytis buvo matuojamas kas 15 min. (žr. 9 pav.).



9 pav. Šaltalankių žaliavos (0,2 mm) ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės. SKE-CO₂ ekstraktai gauti esant 60 °C temperatūrai ir 35 MPa slėgiui, naudojant ekstraktoriaus 50 cm³ tūrio celę.

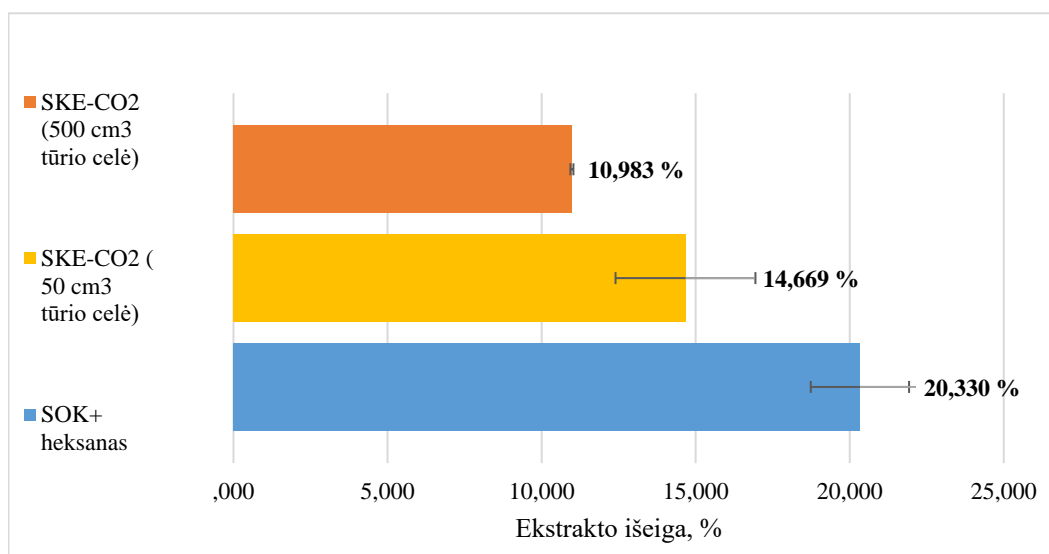
SKE – CO₂ naudojant 500 cm³ tūrio celę, nustatyta, kad didžiausia ekstrakto išeiga gauta iš išspaudų, daugiausiai ekstrakto išgauta per pirmas 240 min – 10,16 % išeigos, o nuo 240 min iki 510 min išeiga pakito nuo 10,16 % iki 11,41 %. Mažiausia išeiga gauta iš odelių iki 180 min, kurių išeiga – 8,03 %, o nuo 180 min iki 510 min jų išeiga pakito nežymiai nuo 8,03 % iki 9,34 %. Naudojant 500 cm³ tūrio celę visiems ekstraktams tirti paimta 100 g medžiagos. Ekstrakto svorio pokytis buvo matuojamas kas 30 min (žr. 10 pav.). Taigi, nustatyta, kad pakeitus ekstrakcijai celę bei prailginus ekstrakcijos laiką, bet nepakeitus slėgio ir temperatūros, ekstraktų išeigos nepadidėjo, o priešingai – sumažėjo. Didesnės celės pasirinkimas sukėlė didesnius nuostolius, nes daugiau medžiagos galėjo pasilikti pačiame ekstraktoriuje.

Kaip ir teigiama mokslinėje literatūroje, esant 35 MPa arba didesniam slėgiui ir apie 60 °C temperatūrai galima gauti dideles ekstraktų išeigas. Taigi, galima teigti, esant būtent tokioms įrenginio eksploataavimo sąlygoms galima pasiekti didelio dydžio išgavas [82].

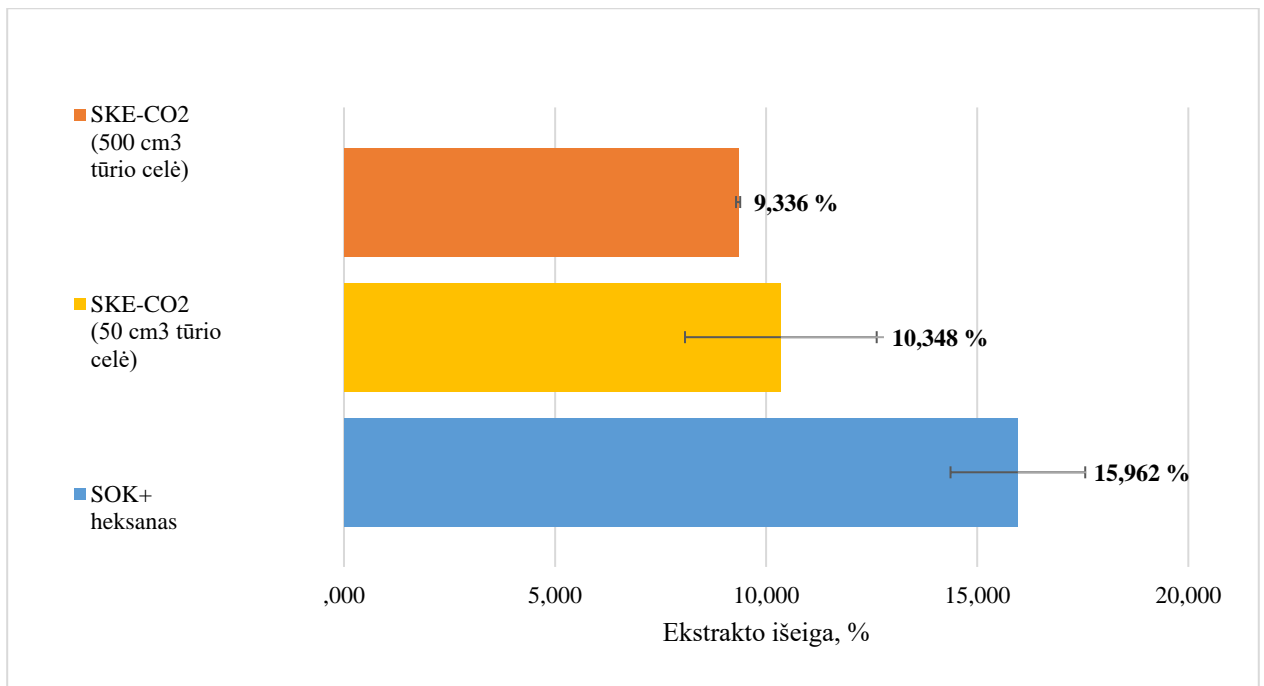


10 pav. Šaltalankių žaliavos (0,2 mm) ekstrakcijos išėigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės. SKE – CO₂ ekstraktai gauti 60 °C temperatūroje ir 35 MPa slėgyje, naudojant ekstraktoriaus 500 cm³ tūrio celę.

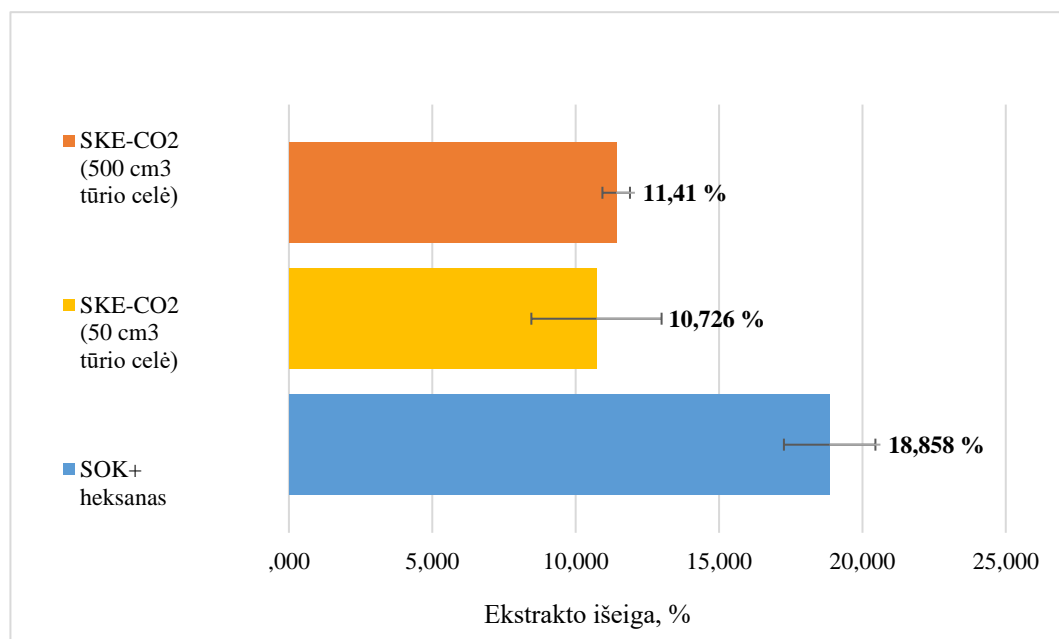
Siekiant palyginti superkritinės ekstrakcijos su anglies dvideginiu efektyvumą buvo atlikta tradicinė Soksleto ekstrakcija heksanu. Iš gautų rezultatų matyti, kad Soksleto ekstrakcija buvo kur kas efektyvesnė, nes gautos didesnės išėigos. Iš gautų ekstraktų (žr. 11 pav., 12 pav. ir 13 pav.) galima pastebėti, kad visų skirtingų šaltalankių frakcijų išėigų atveju efektyviausias ekstrakcijos būdas yra Soksleto. Didžiausios išėigos, t. y. nuo 15 – 20 %, buvo gautos naudojant šį metodą. Šaltalankių sėklų ir odelių išėigos buvo mažiausios, kai naudojama SKE – CO₂ su 500 cm³ tūrio cele, jos gavosi nuo 9 – 10 %. Tačiau ekstraktų išėigos iš išspaudų buvo mažiausios, kai naudojama SKE-CO₂, nors ir su 50 cm³ tūrio cele jos gavosi 10 % didesnės.



11 pav. Šaltalankių sėklų ekstraktų išėigų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo. (SKE – CO₂, superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu esant 60 °C temperatūrai; SOK + heksanas soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas, gautas esant 75 °C temperatūrai)



12 pav. Šaltalankių odelių ekstraktų išeigų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo (SKE – CO₂, superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu esant 60 °C temperatūrai; SOK+heksanas soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas esant 75 °C temperatūrai)

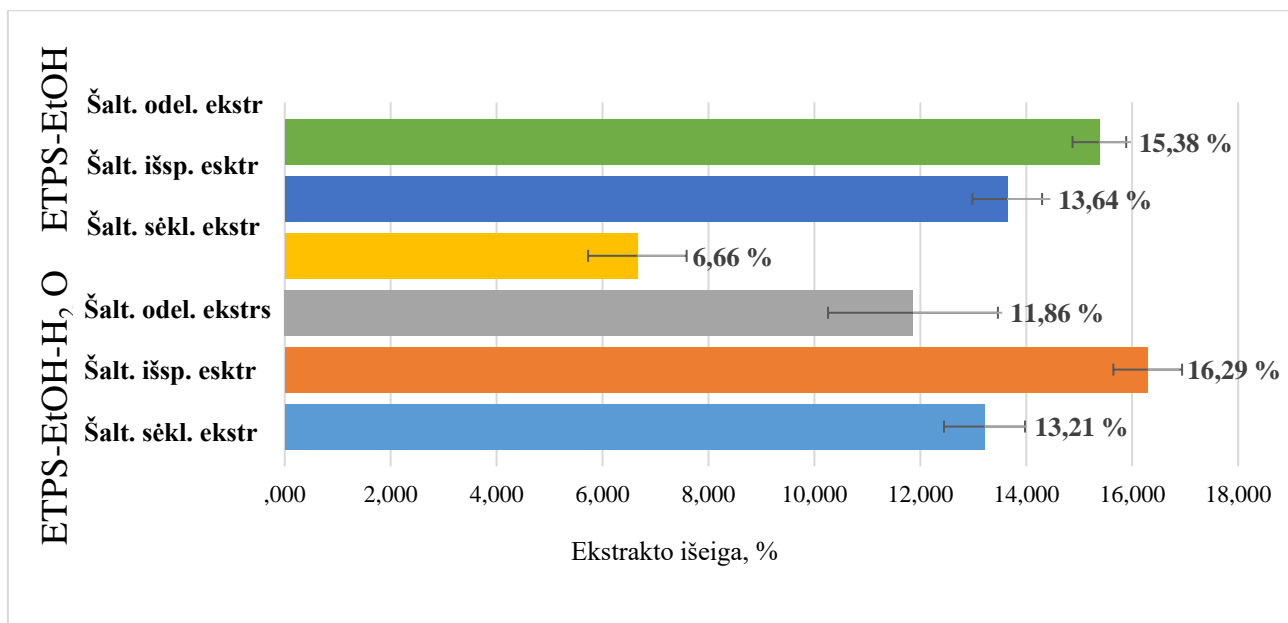


13 pav. Šaltalankių išspaudų ekstraktų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo. (SKE – CO₂, superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu esant 60 °C temperatūrai; SOK+heksanas soksleto ekstrakcijos heksaninis ekstraktas gautas esant 75 °C temperatūrai)

3.5. Ekstrakcijų poliniais tirpikliais įvertinimas

Pašalinus lipofilinius junginius iš šaltalankių sėklų, išspaudų ir odelių frakcijų, likusios medžiagų liekanos po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE – CO₂) buvo toliau ekstrahuojamos pagreintintos ekstrakcijos būdu su etanoliumi ir vandeniu. Moksliniuose straipsniuose yra minima, kad naudojant pagreintą ekstrakciją su etanoliumi ir vandeniu galima gauti ekstraktus, turinčius didesnio

poliškumo komponentus, pvz., fenolius ir cukrus [3]. Atlikus ekstrakciją, nustatyta, kad didžiausia ekstrakto išeiga buvo gauta iš šaltalankių išspaudų naudojant vandenį kaip polinį tirpiklį – 16,29 %, o mažiausia iš šaltalankių sėklų, šio ekstrakto išeiga naudojant tik etanolį buvo 6,66 % (žr. 14 pav.). Tokius rezultatus galėjo nulėmti tai, kad vandens (kaip polinio organinio tirpiklio) kritinė temperatūra yra didesnė nei etanolio (tai siejama su tuo, kad etanolis yra mažiau polinis tirpiklis nei vanduo). Ekstrakcijos su vandeniu metu naudota žymiai aukštesnė temperatūra taip pat galėjo padidinti gauto ekstrakto išeigą.



14 pav. Šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų mišinio ekstraktų priklausomybė nuo ekstrakcijos būdo. (ASE – H₂O, pagreintintos ekstrakcijos vandeninis ekstraktas gautas esant 130 °C temperatūrai; ASE – EtOH, pagreintintos ekstrakcijos etanolinis ekstraktas esant 70 °C temperatūrai)

3.6. Riebalų rūgščių įvertinimas

Dujų chromatografijos būdu buvo atlikta riebalų rūgščių analizė. Eksperimento metu tirti superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE – CO₂) ir Soksleto ekstrakcijos (SOK) būdais gauti ekstraktai. Iš įvairių literatūros šaltinių yra žinoma, kad šaltalankių aliejuje galima rasti polinesočiųjų riebalų rūgščių ir mononesočiųjų riebalų rūgščių. Remiantis gautais rezultatais (žr. 7 lentelė), pastebėta, kad po SKE – CO₂ šaltalankių odelės ekstrakto aptikta daugiausiai oleino (22,47 ± 0,46 %) ir palmitino riebalų rūgšties (14,42 ± 5,05%). Šaltalankių sėklų ekstrakto didžiausias kiekis yra linolo riebalų rūgšties (33,05 ± 5,39 %), o šaltalankių išspaudose – palmitino riebalų rūgšties (14,42 ± 5,05 %). Soksleto ekstrakcijos būdu iš šaltalankių odelės išgautuose ekstraktuose daugiausiai aptikta oleino rūgšties – 22,13 ± 0,30 %, sėklose – linolo rūgšties (35,8 ± 0,10%), o išspaudose – linoleno (24,29 ± 0,69%). Atlikus ekstrakcijas dviem skirtingais metodais nustatyta, kad didelių skirtumų tarp riebalų rūgščių sudėties neaptikta. Literatūroje galima matyti, kad Pranciškaus [83] atlikti tyrimų rezultatai buvo panašūs: žievelėje dominavo palmitino rūgštis (23 – 40%), ir oleino (20 – 53%), sėklose daugiausia – oleino (13 – 21%), ir linoleno (33 – 43 %) rūgštys, o uogose – palmitino rūgštis (35 – 38 %).

Taigi, palyginus rezultatus galima daryti išvadą, kad odelėje ir išspaudose daugiausiai yra mononesočiųjų riebalų rūgščių, o sėklose daugiau polinesočiųjų riebalų rūgščių ir mažiau mononesočiųjų riebalų rūgščių.

7 lentelė. Riebalų rūgščių esančių skirtinguose šaltalankių frakcijose priklausomybė nuo ekstrakcijos metodų

Riebalų rūgštys	Šaltalankių odelė	Šaltalankių sėklos	Šaltalankių išspaudos	Šaltalankių odelė	Šaltalankių sėklos	Šaltalankių išspaudų
	Superkritinė ekstrakcija angies dvideginiu (SKE-CO ₂)			Soksleto ekstrakcija (SOK)		
Pentadekano (C15:0)	1,59 ± 0,00		2,64 ± 2,20	1,19 ± 0,08		3,56 ± 0,16
cis- Pentadeceno (C15:1)	1,3 ± 0,03		0,86 ± 0,25	1,15 ± 0,05		2,87 ± 0,04
Palmitino (C16:0)	22,26 ± 0,28	7,2 ± 1,51	14,42 ± 5,05	21,17 ± 0,94	7,63 ± 0,15	7,33 ± 0,39
Palmitolio (C16:1)	14,02 ± 0,22	1,46 ± 0,33	9,42 ± 1,58	14 ± 0,45	0,64 ± 0,01	3,79 ± 0,12
Heptadekano (C17:0)	1,59 ± 0,04		3,99 ± 4,04	1,19 ± 0,06		3,55 ± 0,42
cis- Heptadeceno (C17:1)	1,26 ± 0,05		2,68 ± 2,59	0,94 ± 0,05		2,65 ± 0,14
Stearino (C18:0)	1,10 ± 0,01	1,11 ± 0,12	1,09 ± 0,68	1,05 ± 0,01	2,64 ± 0,01	1,18 ± 0,11
Oleino (C18:1n9c)	22,47 ± 0,46	17,6 ± 4,53	17,52 ± 6,43	22,13 ± 0,30	22,6 ± 0,09	13,36 ± 0,07
Linolelaido (C18:2n6t)	1,75 ± 0,06		4,91 ± 4,94	1,35 ± 0,09		4,96 ± 0,15
Linolo (C18:2n6c)	12,36 ± 0,61	33,05 ± 5,39	10,39 ± 12,90	15,7 ± 0,08	35,8 ± 0,10	
Linoleno (C18:3n3)	8,16 ± 0,36	27,82 ± 4,76	13,6 ± 0,58	10,97 ± 0,10	26,71 ± 0,07	24,29 ± 0,69
Heneikozano (C21:0)	0,96 ± 0,00		2,88 ± 2,85	0,8 ± 0,09		2,72 ± 0,17
cis-11- Eikozeno (C20:1)						22,41 ± 0,16

3.7. Skirtingų šaltalankių frakcijų ekstraktų, gautų skirtingais ekstrakcijos metodais antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.

Ekstraktų gautų skirtingais būdais antioksidacinis įvertinimas atliktas naudojant ABTS^{•+} katijono radikalo blukinimo metodą. Deguonies radikalų absorbcijos pajėgumas nustatytas naudojantis ORAC metodu, o bendras fenolinių junginių kiekis įvertintas remiantis TPC *Folin- Ciocalteu* metodu, rezultatai išreiškiant galo rūgšties ekvivalentais. Gauti rezultatai pateikti lentelėje (žr. 8 lentelė).

8 lentelė. Šaltalankių ekstraktų bendrasis fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas

Mėginys	TPC mg GRE/ g ekstrakto	ABTS, mg TE/ g ekstrakto	ORAC, mg TE/ g ekstrakto
Šaltalankių sėklos			
Po SKE – CO ₂	6,24 ± 0,02	28,59 ± 0,17	42,57 ± 1,31
Po ETPS – EtOH	58,32 ± 3,51	211,41 ± 0,89	443,27 ± 49,95
Po ETPS – EtOH-H ₂ O	131,54 ± 4,42	426,69 ± 0,57	535,37 ± 24,80
Po SOK – E	6,53 ± 0,04	19,47 ± 0,17	27,65 ± 2,98
Šaltalankių odelė			
Po SKE – CO ₂	7,15 ± 0,04	52,22 ± 0,67	59,13 ± 0,98
Po ETPS – EtOH	48,13 ± 0,7	143,42 ± 1,08	229,95 ± 6,75
Po ETPS – EtOH-H ₂ O	73,75 ± 0,87	298,66 ± 1,00	313,70 ± 10,95
Po SOK – E	8,6 ± 0,01	32,49 ± 1,28	41,19 ± 1,82
Šaltalankių išspaudos			
Po SKE – CO ₂	7,13 ± 0,6	46,56 ± 1,49	29,88 ± 1,11
Po ETPS – EtOH	72,93 ± 1,73	253,22 ± 1,08	331,63 ± 21,31
Po ETPS – EtOH-H ₂ O	74,38 ± 0,43	309,65 ± 1,00	343,03 ± 15,37
Po SOK – E	7,67 ± 0,04	30,96 ± 0,17	28,49 ± 3,12

mg GRE/g – antioksidacinis aktyvumas išreikštas Galo rūgšties ekvivalentais; mg TE/g – antioksidacinis aktyvumas išreikštas Trolokso ekvivalentais; SKE – CO₂ – superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu esant 60 °C temperatūrai ir 35 MPa slėgiui; ETPS – EtOH – ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje naudojant etanolį esant 70 °C temperatūrai; ETPS – EtOH-H₂O – ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje naudojant etanolį esant 70 °C temperatūrai ir vandenį esant 130 °C temperatūrai; SOK – E – soksleto ekstrakcija naudojant heksaną esant 75 °C temperatūrai.

Didžiausios fenolinių junginių vertės buvo gautos naudojant ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje su etanolium ir vandeniu (ETPS – EtOH – H₂O), o mažiausios naudojant superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE-CO₂). Didžiausias BFJK gautas po ETPS-EtOH-H₂O šaltalankių sėklose – 131,54 ± 4,42 mg GRE/g, o perskaičius į sausas medžiagas (SM) gauta net 7,6 karto mažesnis kiekis – 17,38 ± 0,58 mg GRE/g. Mažiausias BFJK gautas sėklose po SKE-CO₂ (6,24 ± 0,02 GRE/g) ir perskaičius į SM (mažesnis net 6,8 karto). Nedideli skirtumai pastebėti ir tarp SKE-CO₂ ir SOK - E metodų.

Vertinant skirtingų ekstrakcijos būdų antioksidacinį aktyvumą ABTS metodu didžiausios vertės buvo gautos sėklose po ETPS-EtOH-H₂O (426,69 ± 0,57 mg TE/g), 7,6 karto mažesnės perskaičius į SM. Išspaudoms irgi yra būdingos didelės antioksidacinio aktyvumo vertės (309,65 ± 1,00 mg TE/g), o mažiausios vertės gautos taikant Soksleto ekstrakciją (SOK – E) (19,47 ± 0,17 mg TE/g). Visų skirtingų šaltalankių frakcijų atveju mažiausios ABTS vertės gautos naudojant SOK-E metodą. Iš šaltalankių odelių ir išspaudų ekstraktų (po SOK – E) gautos antioksidacinio aktyvumo vertės buvo labai panašios.

Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas naudojant ORAC metodą, sėklų ekstrakto po ETPS – EtOH – H₂O – (535,37 ± 24,80 mg TE/ g), o perskaičius į SM jis buvo 7,6 karto mažesnis. Mažiausias aktyvumas nustatytas sėklų ekstrakto po SOK – E (27,65 ± 2,98 mg TE/ g), SM – 4,9 karto mažesnis. Vertinant rezultatus bendrai, nustatyta, kad mažiausias antioksidacinis aktyvumas iš

visų šaltalankių frakcijų buvo po SOK – E. Visos antioksidacinio aktyvumo vertės po SOK – E buvo labai panašios: odelėje ($6,57 \pm 0,29$ mg TE/ g), išspaudose ($5,37 \pm 0,59$ mg TE/ g).

Taigi, iš visų naudotų ekstrahavimo metodų didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo išgautos ekstrakcijos taikant tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje ekstrahavimą, naudojant didesnio poliškumo tirpiklius etanolį ir vandenį, o mažiausiai efektyvus – Soksleto metodas, kurios metu buvo naudojamas nepolinis tirpiklis heksanas. Pateikti rezultatai rodo daugiapakopės ekstrakcijos efektyvumą, kadangi net ir toliau vykdant ekstrakciją ETPS naudojant po SKE – CO₂ liekanų ekstraktus, jų antioksidacinis aktyvumas nesumažėjo. Taigi, naudojant didesnio poliškumo tirpiklius yra išekstrahuojami didesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymintys junginiai.

Ištyrus visus ekstraktus, išgautų TPC, ABTS, ORAC metodais, nustatyta, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas yra iš šaltalankių sėklų gautuose ekstraktuose taikant ekstrahavimą tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje su etanoliumi ir vandeniu. Šiuose ekstraktuose aptinkama daugiau junginių su didesniu antioksidaciniu aktyvumu. Vadinasi, sėklų ekstraktas yra puikus antioksidantų šaltinis.

3.8. Tokoferolių ir fitosterolių sudėties įvertinimas skirtinguose šaltalankių frakcijose

Tokoferoliai ir fitosteroliai yra labai svarbūs ir vertingi bioaktyvūs junginiai. Į juos įeina steroliai, kurie turi atitinkamus sočius darinius - augalinius stanolius [84]. Įrodyta, kad fitosteroliai pasižymi bioaktyviomis savybėmis, kurios gali teikti naudą žmogaus sveikatai. Fitosteroliai sumažina „blogojo“ cholesterolio (mažo tankio lipoproteinų) kiekį kraujyje. Tačiau būna ir gyvūninės kilmės cholesterolių (fiosterolių), kuriems būdingos priešvėžinės savybės ir jie gali sumažinti susirgimo širdies ligomis riziką [84, 85, 86, 87, 88].

Remiantis efektyvia skysčių chromatografija, atlikta preliminari šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų ekstraktų (gautų po SKE – CO₂), tokoferolių ir fitosterolių analizė. Iš pateiktų rezultatų (žr. 9 lentelė) matoma, kad kad didžiausia α – tokoferolio koncentracija yra odelių ekstrakto ($648,63 \pm 41,91$ mg/kg), o atlikus prieš tai gautų rezultatų perskaičiavimą sausajai medžiagai gauta, kad po SKE – CO₂ likusioje nuoriebalintoje odelių liekanoje α – tokoferolio konc. net 9,7 karto mažesnė ($67,13 \pm 4,34$ mg/kg). $\beta + \gamma$ ir δ – tokoferolių didžiausios koncentracijos aptiktos odelių ekstraktuose. Cholestanolio aptikta tik sėklų ir išspaudų ekstraktuose (jų koncentracijos labai panašios). Gyvūninės kilmės cholesterolio ir stigmasterolio daugiausiai rasta odelių ekstrakto. Sėklų ekstrakto nustatyta didžiausios β – sitosterolio ($3276,13 \pm 694,48$ mg/kg) ir kampasterolio ($300,49 \pm 25,50$ mg/kg) koncentracijos. Ergosterolio rasta tik odelių ir išspaudų ekstraktuose. Taigi, galima sakyti, kad odelių ekstraktui po SKE-CO₂ būdingos didžiausios $\beta + \gamma$, δ ir α – tokoferolio, cholesterolio, stigmasterolio, ergosterolio koncentracijos.

9 lentelė. Tokoferolių ir fitosterolių sudėties palyginimas šaltalankių sėklose, odelėse ir išspaudose po SKE – CO₂

Tokoferoliai	Šaltalankių sėklos		Šaltalankių odelės		Šaltalankių išspaudos	
Superkritinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE-CO ₂)						
	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM
α - tokoferolis	239,82 ± 23,41	35,18 ± 3,43	648,63 ± 41,91	67,13 ± 4,34	487,01 ± 21,92	52,26 ± 2,35
β + γ tokoferolis	74,25 ± 17,90	10,89 ± 2,63	170,76 ± 8,40	17,67 ± 0,87	127,07 ± 4,43	13,63 ± 0,48
δ - tokoferolis	53,88 ± 20,71	7,90 ± 3,04	87,04 ± 25,78	9,01 ± 2,67	76,62 ± 23,23	8,22 ± 2,49
Cholestanolis	25,60 ± 2,98	3,75 ± 0,44	*	*	27,49 ± 1,71	2,95 ± 0,18
Cholesterolis	28,25 ± 3,03	4,14 ± 0,44	344,15 ± 57,74	35,62 ± 5,98	201,15 ± 4,07	21,58 ± 0,44
β - Sitosterolis	3276,13 ± 694,48	480,61 ± 101,88	2956,14 ± 92,33	305,96 ± 9,56	2513,74 ± 98,47	269,72 ± 10,57
Stigmasterolis	78,90 ± 6,38	11,57 ± 0,94	365,09 ± 15,18	37,79 ± 1,57	234,27 ± 12,92	25,14 ± 1,39
Ergosterolis	*	*	102,42 ± 4,29	10,60 ± 0,44	37,94 ± 0,72	4,07 ± 0,08
Kampasterolis	300,49 ± 25,50	44,08 ± 3,74	157,89 ± 5,43	16,34 ± 0,56	158,43 ± 5,02	17,00 ± 0,54

Atlikta ir tokoferolių ir fitosterolių analizė po Soksleto ekstrahavimo gautuose šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų ekstraktuose. Žemiau esančioje lentelėje yra pateikiami gauti rezultatai (žr. 10 lentelė). Didžiausia α – tokoferolio koncentracija aptikta sėklų ekstrakto (367,28 ± 30,61 mg/kg), o atlikus prieš tai gautų rezultatų perskaičiavimą sausajai medžiagai gauta, kad po SOK likusioje nuoriebalintoje sėklų liekanoje koncentracija 4,9 karto mažesnė.

β + γ tokoferolių, kampasterolio ir cholestanolio daugiausiai aptikta sėklų ekstrakto. Cholestanolio rasta tik išspaudų ir sėklų ekstrakto. β – Sitosterolio daugiausiai rasta išspaudų ekstrakto (2462,31 ± 365,81 mg/kg), o atlikus prieš tai gautų rezultatų perskaičiavimą sausajai medžiagai gauta, kad po SOK likusioje nuoriebalintoje išspaudų liekanoje koncentracija net 5,3 karto mažesnė. Stigmasterolio ir ergosterolio daugiausiai rasta odelių ekstrakto. Palyginus SKE – CO₂ SOK metodus, nustatyta, kad daugiau tokoferolių, fitosterolių aptikta SKE – CO₂ būdu išgautuose ekstraktuose.

10 lentelė. Tokoferolių ir fitosterolių sudėties palyginimas šaltalankių sėklose, odelėse ir išspaudose po Soksleto ekstrakcijos (SOK)

Tokoferoliai	Šaltalankių sėklos		Šaltalankių odelės		Šaltalankių išspaudos	
Soksleto ekstrakcija (SOK)						
	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM
α - tokoferolis	367,28 ± 30,61	74,67 ± 6,22	203,43 ± 1,83	74,67 ± 6,22	273,95 ± 58,01	51,67 ± 10,94
β + γ tokoferolis	59,72 ± 4,85	12,14 ± 0,99	52,69 ± 11,75	12,61 ± 1,87	58,28 ± 3,33	10,99 ± 0,63

10 lentelės tęsinys

Tokoferoliai	Šaltalankių sėklos		Šaltalankių odelės		Šaltalankių išspaudos	
Soksleto ekstrakcija (SOK)						
	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM	koncentracija mg/kg ekstrakto	koncentracija mg/kg SM
Cholestanolis	35,39 ± 0,43	7,20 ± 0,09	*	*	21,70 ± 12,09	4,09 ± 2,28
β - Sitosterolis	2335,22 ± 525,80	474,75 ± 106,89	2120,68 ± 99,01	338,46 ± 15,80	2462,31 ± 365,81	464,39 ± 68,99
Stigmasterolis	41,35 ± 1,04	8,41 ± 0,21	243,37 ± 1,14	38,84 ± 0,18	125,67 ± 3,49	23,70 ± 0,66
Ergosterolis	*	*	55,05 ± 0,18	8,79 ± 0,03	30,37 ± 0,26	5,73 ± 0,05
Kampasterolis	215,75 ± 45,17	43,86 ± 9,18	85,15 ± 1,88	13,59 ± 0,30	148,39 ± 9,22	27,99 ± 1,74

SM-sausa medžiaga; * - nebuvo rasta arba skaitinė vertė lygi 0. Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN.

3.9. Triacilglicerolių sudėtis skirtinguose šaltalankių frakcijose gautose skirtingais ekstrakcijos metodais

Šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų aliejinė frakcija yra sudaryta iš triacilglicerolių (TAG). Išspaudas sudarantys triacilgliceroliai susideda iš mononesočiųjų ir sočiųjų riebalų rūgščių, o sėklų aliejuje yra daug polinesočiųjų riebalų rūgščių [3, 37]. Ištyrus visus šaltalankių ekstraktų po SKE – CO₂, nustatyta, kad didžiausią dalį visų triacilglicerolių (TAG) aptinkama odelių ekstrakto: palmitoil – linoil – stearoilglicerolis (PLS) – 25,40 % ir sėklose stearoil – dilinoilglicerolis (SLL) – 23,87 %, oleinoil – dilinoilglicerolis (OLL) – 23,04 %, palmitoil- dilinolenoilglicerolis (PLnLn) – 20,61 %, oleinoil – linolenoil – linoilglicerolis (OLnL) – 20,32 %. Tiriant po SOK gautus ekstraktus, nustatyta, daugiausiai TAG aptinkama sėklose: SLL – 38,61 %, OLL – 38,12 %, PLnLn – 35,97 %, OLnL – 35,13 %, dilinoil – linolenoilglicerolio (LLnLn) – 33,46, palmitoil – dilinoilglicerolis (PLL) – 32,07 %, linoil – dilinolenoilglicerolio (LLnLn) – 31,46 %, 1 – stearoil – 2 – linoleoil – 3 – oleilglicerolio (SLO) – 30,46 %, trilinolenoilglicerolio (LnLnLn) – 29,15 %. Odelių ir išspaudų ekstraktuose po SKE – CO₂ ir SOK aptikta kelis kartus mažiau triacilglicerolių. Palyginus abu ekstrakcijos būdus, pastebėta, kad sėklų ekstraktai po SOK pasižymėjo didžiausiu triacilglicerolių kiekiu.

3.10. Bendras karotenoidų ir β – karoteno kiekis šaltalankių frakcijų ekstraktuose po SKE – CO₂

Karotenoidai, tai molekulės, nuo kurių priklauso šaltalankio uogų spalva (varijuojanti nuo geltonos iki raudonos). Jų kiekis priklauso nuo vaisių veislės, klimato ir nokimo sąlygų [66, 89]. Karotenoidai, kurie yra aptinkami šaltalankių sėklų, minkštimo ir išspaudų likučiuose dažniausiai būna karotenu pavidalu [25, 90]. Nustatyta, kad šaltalankių sėklų praeinančiose per 0,5 mm dydžio sietą ekstrakto po SKE – CO₂ gauta 10,76 mg/100 g β – karoteno ir 41,26 % bendro karotenoidų kiekio (BKK), o naudojant 0,2 mm dydžio sietą sėklų ekstrakto tokiomis pačiomis sąlygomis, aptikta 11,51 mg/100 g β – karoteno ir 44,11% BKK. Išspaudų praeinančiose per 0,5 mm dydžio sietą ekstrakto rasta 176,41 mg/100g β – karoteno ir 56,47 % BKK, o esant 0,2 mm dydžio sietui gauta 298,06 mg/100g β – karoteno ir 99,17 % BKK. Odelių ekstrakto galima matyti, tą pačią tendenciją, t. y., naudojant didesnę sietą gauta 374,50 mg/100g β – karoteno ir 68,48 % BKK, o mažesnę – 402,42 mg/100g β – karoteno ir 73,59 % BKK.

Taigi, galima sakyti, kad po SKE – CO₂ gauta šaltalankio žaliava, kuri buvo praėjusi per 0,2 mm dydžio sietą, turėjo didesnę bendrą karotenoidų ir β – karoteno kiekį nei ekstrakcijai naudota žaliava praėjusi per 0,5 mm dydžio sietą. Tiriant visus ekstraktus didžiausias β – karoteno ir BKK kiekis aptiktas šaltalankių odelėse. Gauti rezultatai yra panašūs į Violetos Nour pateikiamus duomenis. Autorė taip pat rado didesnius bendruosius karotenoidų ir β – karoteno kiekius odelėse. Nour šspaudų ekstrakte aptiko 245.6 mg/100 g bendrųjų karotenoidų, o sėklų ekstrakte nuo 20 iki 85mg / 100 g [66]. Jos pateikiamas β – karoteno kiekis odelėse ir sėklose svyruoja nuo 100 – 500 ir 20 – 100mg / 100g [66, 91].

3.11. Duona su šaltalankių skirtingomis frakcijomis

Tiriant šaltalankių sėklų, odelių ir jų išspaudų poveikį duonai, jos kepimo metu miltų kiekis buvo pakeistas 5 % ir 10 % šaltalankių liekanomis po SKE – CO₂. Prekyboje aptinkama duona gali būti įvairių rūšių, tačiau bet kokioje duonoje vyrauja keturi pagrindiniai ingredientai: miltai, druska, mielės ir vanduo. Kepimo mielės, naudojamos duonos fermentacijai, yra labai svarbios, nes nuo jų priklauso duonos kokybė. Kepimo mielių fermentinis aktyvumas reikšmingas todėl, kad anaerobinės fermentacijos metu gamindamos CO₂ jos kildina tešlą [92].

Kepimo metu, siekiant pagerinti duonos kokybę, skirtingos šaltalankių frakcijos veiktos ultragarsu ir vėliau į jas dar papildomai įdėta fermento. Atlikti trys kepimo pakartojimai su kontrolinėmis duonomis naudojant skirtingas šaltalankių frakcijas, iš jų išvestas vidurkis. Tyrimo metu buvo vertinamas minkštimo aktyvumas, tūris ir drėgmės kiekis. Visos duonos keptos naudojant tas pačias mieles ir ruoštos remiantis ta pačia receptūra, tačiau dalis miltų vis buvo pakeičiama šaltalankių sėklomis, odelėmis ir išspaudomis. Pateikiamoje nuotraukoje (žr. 15 pav.) vizualiai galima palyginti kontrolinės duonos (be jokių priedų) ir duonos su šaltalankių ultragarsu veiktomis ir fermentuotos 5 % išspaudomis skerspjūvius. Pastebima, kad kontrolinei duonai būdinga žymiai šviesesnė spalva ir labiau grublėtas paviršius, negu duonoje su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 5 % išspaudomis. Iš nuotraukos sunku nustatyti, kuri duona yra iškilesnė. Pateikiami duomenys (žr. 11 lentelė) atskleidžia, kad duonoje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 5 % išspaudomis yra didesnis jos aktyvumas (78,72 %), tūris (1,66 l) ir drėgmės kiekis (40,21 %) lyginant su kontroline duona. Taigi, remiantis šiais rodikliais, palyginus visas duonos rūšis, didžiausios skaitinės vertės gautos iš duonos su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 10 % sėklomis (žr. 16 pav.).



15 pav. A – Duona be priedų (kontrolė) ir B – duona su šaltalankių ultragarsu veiktomis ir fermentuotos 5% išspaudomis



16 pav. A – Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 10 % ir B – su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 5 %.

Palyginus tarpusavyje skirtingas duonas (su skirtingomis šaltalankių frakcijomis), pastebėta, kad didžiausias drėgmės kiekis yra duonoje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 10 % odelėmis, o didžiausias minkštimo aktyumas ir tūris aptiktas duonoje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 10 % sėklomis. Taigi, iš pateiktų rezultatų ir nuotraukų pastebėta, kad įdėtas fermentas daro poveikį kepalų tūriui, minkštimo aktyumui ir struktūros tolygumui. Manoma, kad dėl ultragarso poveikio, kuriuo metu buvo suardoma šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų dalelių struktūra, galėjo padidėti dalelių paviršiaus plotas, o tai galėjo nulemti didelį duonos aktyumą bei vandens sulaikymą, todėl galėjo padidėti ir drėgmės kiekis joje.

11 lentelė. Duonos minkštimo aktyumo, tūrio ir drėgmės kiekio priklausomybė nuo skirtingų duonos rūšių

Duonos rūšis	Minkštimo aktyumas, %	Tūris, l	Drėgmės kiekis, %
Kontrolinė duona be išspaudų	73,18 ^{ab}	1,54 ^{bc}	37,38 ± 0,88 ^a
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 5 %	79,21 ^e	1,58 ^{bcde}	40,64 ± 1,82 ^{bcd}
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis odelėmis 5 %	80,43 ^{ef}	1,66 ^{bcde}	40,07 ± 1,33 ^{bcd}
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis išspaudomis 5 %	78,72 ^{de}	1,66 ^{bcde}	40,21 ± 0,70 ^{bcd}
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 10 %	83,55 ^g	1,78 ^f	42,38 ± 1,86 ^d
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis odelėmis 10 %	78,02 ^e	1,73 ^{ef}	42,85 ± 1,59 ^{de}
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis išspaudomis 10 %	79,69 ^{ef}	1,76 ^f	40,22 ± 1,08 ^{bcd}

^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp gautų skaičių (ANOVA), pateiktos trijų vidutinių matavimų vertės ± STDEV.

3.12. Duonos su skirtingomis šaltalankių frakcijomis po ekstrakcijos spalvos įvertinimas

Tyrimo metu analizuoti duonų su šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų ekstraktų liekanomis po SKE – CO₂ spalvų matavimai. Spalvą šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų ekstraktams suteikia bioaktyvieji junginiai, karatenoidai [66, 89].

Iš viso identifikuotos 3 spalvų koordinatės: L*, a* ir b*. Gauti rezultatai pateikiami žemiau esančioje lentelėje (žr. 12 lentelė). Didžiausia tirtų duonos riekių L* vertė (reiškianti šviesumą) buvo kontrolinės duonos (ji yra vizualiai šviesiausia) (žr. 15 pav.). Iš sumaltų duonos riekių taip pat galima matyti, kad šviesiausia kontrolinė duona L* – 82,77. Atlikus tolimesnius matavimus didžiausia b* vertė (teigiama reikšmė reiškia polinkį į gelsvumą) gauta duonos riekėje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 5 % odelėmis, o didžiausia a* vertė (teigiama reikšmė reiškia polinkį į rausvumą) duonos riekėje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 10 % odelėmis. Pastebėta, kad sumaltos duonos spalvų kordinačių: L* ir b* reikšmės yra didesnės. Taip galėjo atsitikti dėl to, kad sumaltų duonų spalvos matavimas buvo atliktas kepalams papildomai pastovėjus keletą dienų po atliktos jų riekių analizės. Papildomas stovėjimo laikas ir aplinka, kurioje buvo palikti kepalai galėjo paveikti spalvų intensyvumo pasikeitimą. Tyrimo metu įvertintas duonos riekių spalvų skirtumas – ΔE. Palyginus kontrolinę duoną su duona, kuri buvo praturtinta fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių išspaudomis 10 %, gautas skirtumas – ΔE = 9,93. Kontrolinės duonos ir duonos su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 10 % išspaudomis ΔE = 14,15. Duonos su 5 % ir 10 % fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių išspaudomis ΔE = 4,23. Taigi, palyginus rezultatus, nustatyta, kad duonoje didėjant šaltalankių išspaudų, odelių ar sėklų procentiniam kiekiui didėja ir jų spalvų skirtumas – ΔE.

12 lentelė. Šaltalankių ekstraktų liekanų po SKE – CO₂ poveikis duonos spalvai.

Duonos rūšis	Riekės			Sumalta		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Kontrolinė duona be išspaudų	68,25 ± 1,20	0,35 ± 0,24	21,21 ± 1,24	82,77 ± 0,25	0,88 ± 0,04	18,41 ± 0,10
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 5 %	48,68 ± 0,83	3,76 ± 0,08	13,33 ± 0,14	68,41 ± 1,32	2,75 ± 0,05	15,30 ± 0,17
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis odelėmis 5 %	46,95 ± 1,30	4,45 ± 0,18	19,49 ± 0,35	67,86 ± 0,67	2,86 ± 0,13	22,68 ± 0,09
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis išspaudomis 5 %	49,52 ± 1,97	3,95 ± 0,15	17,16 ± 0,47	65,83 ± 0,90	3,44 ± 0,07	21,65 ± 0,33
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 10 %	43,25 ± 0,63	4,46 ± 0,10	12,74 ± 0,28	67,61 ± 0,76	3,09 ± 0,05	15,42 ± 0,14
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis odelėmis 10 %	41,43 ± 0,28	5,52 ± 0,09	18,15 ± 0,61	68,21 ± 0,33	3,12 ± 0,07	23,31 ± 0,11
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis išspaudomis 10 %	43,13 ± 0,22	5,10 ± 0,14	17,18 ± 0,53	55,61 ± 0,88	4,75 ± 0,13	19,34 ± 0,27

Pateiktos trijų vidutinių matavimų vertės ± STDEV.

3.13. Baltymų kiekio priklausomybė nuo skirtingų šaltalankių ekstraktų liekanų duonoje

Duonose su šaltalankių liekanomis po SKE – CO₂ tirtas baltymų kiekis. Gauti rezultatai rodo (žr. 13 lentelė), kad mažiausias baltymų kiekis aptiktas duonoje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 5 % šaltalankių odelėmis – 13,63 %, o didžiausias rastas duonoje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 10 % šaltalankių sėklomis – 16,84 %. Nustatinėjant bendrinius baltymų kiekius odelėse ir sėklose prieš ir po SKE – CO₂, didesnis baltymų kiekis taip pat aptiktas šaltalankių sėklose. Visi kintamieji buvo vertinami taikant dispersinę analizę (ANOVA). Remiantis standartiniu nuokrypiu (STDEV) nustatyta, kad reikšmingų nuokrypių nebuvo.

13 lentelė. Duonos su skirtingomis šaltalankių frakcijomis įtaka baltymų kiekiui

Produkto pavadinimas	B- bendras baltymų kiekis, %
Kontrolinė duona be išspaudų	14,47 ± 0,40 ^a
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 5 %	16,47 ± 0,69 ^{bc}
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis odelėmis 5 %	13,63 ± 0,23 ^a
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis išspaudomis 5 %	14,44 ± 0,55 ^{ab}
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 10 %	16,84 ± 0,36 ^c
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis odelėmis 10 %	13,88 ± 0,37 ^a
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis išspaudomis 10 %	14,85 ± 0,83 ^{abc}

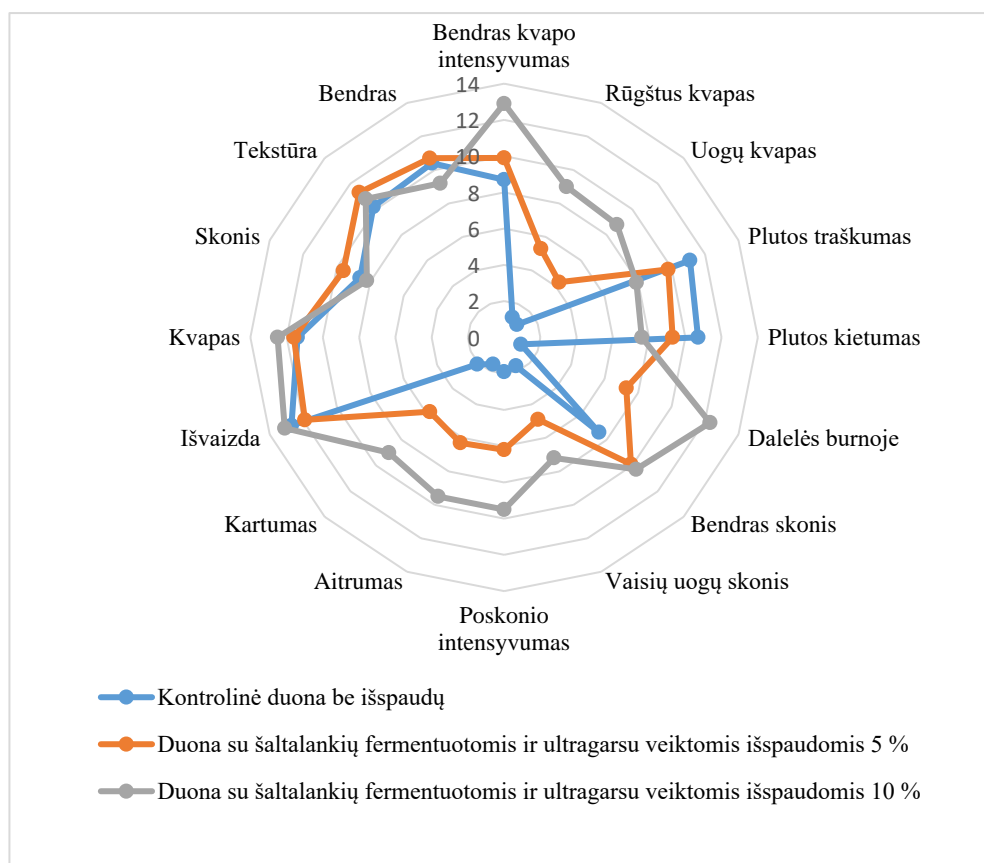
^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp gautų skaičių (ANOVA), pateiktos trijų vidutinių matavimų vertės ± STDEV.

3.14. Skirtingų duonos rūšių juslinė analizė

Juslinės analizės metu siekta ištirti šaltalankių uogų išspaudų priedo įtaka kvietinės duonos juslinėms savybėms. Tyrimo metu nustatyta, kad šaltalankių išspaudų įdėjimas į duonos sudėtį reikšmingai pakeitė duonos kvapą, skonį ir išvaizdą, o ypač spalvą.

Pastebėta bendra tendencija, jos pridėjus į tešlą šaltalankių išspaudų galutinio produkto spalva tamsėjo didėjant išspaudų koncentracijai (tamsėjo keptos duonos spalva). Panašūs duonos spalvos kitimo rezultatai nustatyti naudojant vynuogių išspaudas [93] ir riešutus [94] duonos gamyboje.

Remiantis gautais rezultatais (žr. 17 pav.) nustatyta, kad ragaujant duoną su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis šaltalankių 10 % išspaudomis, uogų išspaudų dalelės burnoje buvo juntamos labiau negu paveikus 5 % išspaudų rūšies duona. Pridėjus uogų išspaudų padidėjo bendro kvapo ir skonio intensyvumas, taip pat atsiranda su uogų skoniu siejamas rūgštumas. Tačiau į duoną pridėjus šaltalankio išspaudų, mėginių plutos kietumas ir traškumas sumažėjo. Vertinant minkštimo masę, nustatyta, kad duona su išspaudomis buvo drėgnesnė nei kontrolinio mėginio. Dėl uogų išspaudų pridėjimo į duoną, nustatytas padidėjęs jos aitrumas, kuris priklauso nuo flavanol glikozidų (vadinasi, uogose gali būti fenolinių junginių) [95]. Didesnis duonos kartumas gali būti siejamas su proantocianidino kiekio padidėjimu [96].



17 pav. Juslinės analizės rezultatų priklausomybė nuo skirtingų rūšių duonos

Taigi, galima teigti, kad šaltalankių išspaudų pridėjimas į duoną jai suteikė papildomą kvapą, skonį, išvaizdą ir spalvą. Šio priedo įdėjimas reikšmingai nepablogino priimtumo lyginant su kontroliniu mėginiu. Duonos tekstūra yra vienintelė savybė, kurios pokytis turėjo reikšmingą poveikį jos priimtinumui, t. y., kontrolinė duona pasižymėjo kieta pluta ir jos minkštimo masė buvo sausa., Pridėjus šaltalankių išspaudų į duoną, vertintojų nuomone ji priimtinesnė. Pagal visus priimtumo kriterijus kontrolinę duoną vertintojai įvertino prasčiausiai, o duonas su 5 ir 10 % šaltalankių išspaudomis įvertino, kaip labiau patrauklias dėl suminkštėjusios duonos tekstūros.

3.15. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas virškinimo metu

Virškinimas susideda iš trijų fazių: burnoje, skrandyje ir žarnyne. Pirmiausiai yra atliekamas antioksidacinio aktyvumo įvertinimas burnos fazėje. Iš viso matuojami trijų rūšių antioksidantai: greitieji, lėtieji ir bendrieji.

Greitaisiais antioksidantai gali būti šlapimo rūgštis, askorbo rūgštis (vitaminas C), glutationas, vitaminas E, Kofermentas Q10, karotinoidai. Lėtieji antioksidantai yra polifenoliai, α – lipoinė rūgštis, resveratrolis, astaksantinas. Bendriesiems antioksidantams priklauso greitieji ir lėtieji antioksidantai. Šios trys antioksidantų rūšys skiriasi antioksidaciniu pajėgumu. Greitiesiems antioksidantams būdingas didžiausias laisvųjų radikalų pašalinimo greitis ir didesnis antioksidacinis pajėgumas. Todėl jie galėtų būti laikomi galingesniais nei lėtai veikiantys antioksidantai, net jeigu aptinkami mėginyje mažesnėmis koncentracijomis. Lėtieji antioksidantai yra junginiai, turintys mažesnę laisvųjų radikalų pašalinimo greitį ir antioksidacinį pajėgumą [97].

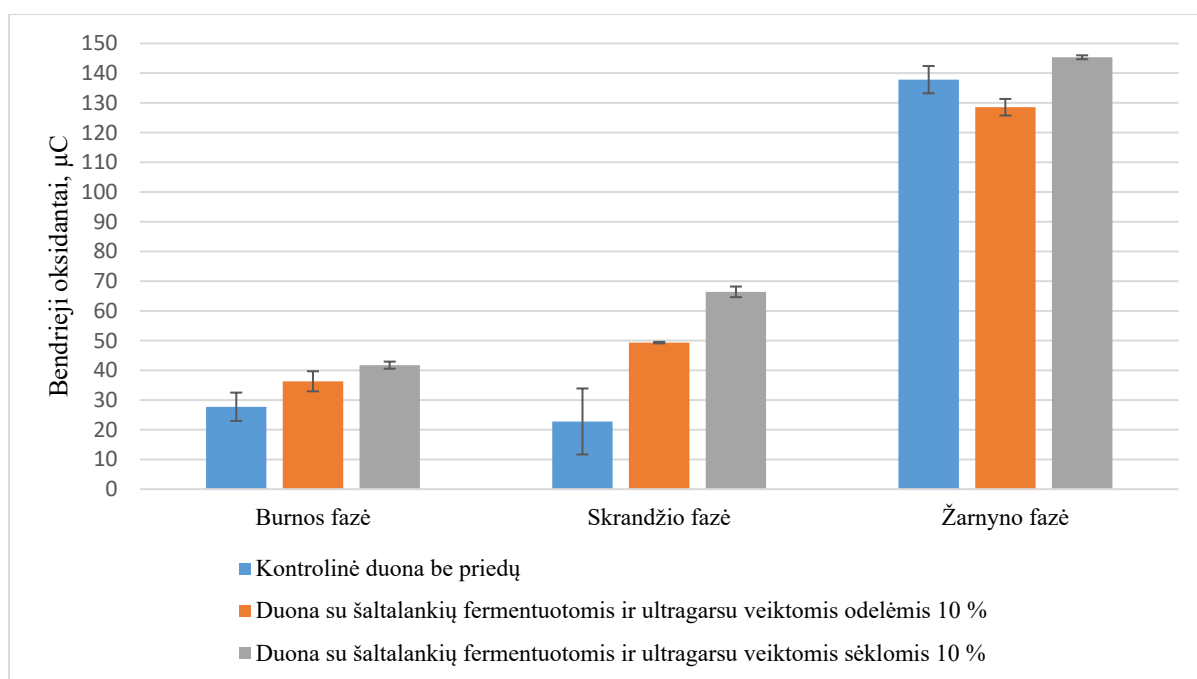
Remiantis gautais rezultatais (žr. 14 lentelė) pastebėta, kad didžiausias greitųjų antioksidantų pajėgumas burnos ir skrandžio fazėse nustatytas virškinant duoną su šaltalankių sėklomis 10 % – 15,00 μC ir 18,62 μC , o žarnyno fazėje, virškinant kontrolinę duoną – 50,36 μC . Didžiausias lėtųjų antioksidantų kiekis nustatytas burnos, skrandžio ir žarnyno fazėse virškinant duoną su šaltalankių sėklomis 10 % – 26,73; 47,78; 96,85 μC .

14 lentelė. Antioksidantų aktyvumas skirtingose virškinimo fazėse.

Mėginys	Greitieji antioksidantai, μC			Lėtieji antioksidantai, μC		
	Burnos fazė	Skrandžio fazė	Žarnyno fazė	Burnos fazė	Skrandžio fazė	Žarnyno fazė
Kontrolinė duona be priedų	11,53 \pm 1,79	5,47 \pm 2,93	50,36 \pm 1,36	16,20 \pm 2,99	17,63 \pm 8,78	87,43 \pm 3,88
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis odelėmis 10 %	11,43 \pm 0,9	12,93 \pm 1,29	45,9 \pm 1,87	25,23 \pm 3,26	36,88 \pm 0,97	82,45 \pm 0,21
Duona su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis sėklomis 10 %	15,00 \pm 0,62	18,62 \pm 0,45	48,03 \pm 1,88	26,73 \pm 1,72	47,78 \pm 1,34	96,85 \pm 2,76

Pateiktos trijų vidutinių matavimų vertės \pm STDEV.

Vertinant bendrąjį antioksidantų kiekį (žr. 18 pav.), kuris susideda tiek iš greitųjų ir lėtųjų antioksidantų, pastebima, kad burnos, skrandžio ir žarnyno fazėse jų aptikta daugiausiai virškinant duoną su šaltalankių sėklomis 10 % – 41,73 μC ; 66,4 μC ; 145,33 μC . Taigi, apibendrinus visus rezultatus, pastebėta, kad pridėjus šaltalankių sėklų į duoną yra gaunamas didesnis antioksidantų kiekis. Galima daryti išvadą, kad šaltalankių sėklų liekanose po SKE-CO₂ lieka tam tikras kiekis fenolinių junginių, karotinoidų ir vitaminų.



18 pav. Duonos bendrųjų oksidantų priklausomybė nuo skirtingų virškinimo fazių

IŠVADOS

1. Šaltalankių uogose gausu vitaminų, organinių ir riebalų rūgščių, aminorūgščių, antioksidantų (dažniausiai aptinkami karotenoidai ir flavonoidai). Uogose, sultyse ir sėklose gausu mineralinių medžiagų, angliavandenių, cukraus, baltymų, nesočiosųjų riebalų rūgščių, taninų ir pektinų, triterpenoidų, fosfolipidų, kumarino, katechinų, leukoentocianų, flavonolių, alkaloidų, serotoninino. Uogose ir jų išspaudų liekanose yra daug bioaktyvių junginių, kuriuos išgauti yra naudojami įprasti ekstrahavimo būdai: Soksletas ir maceracija, tačiau jiems yra sunaudojami dideli kiekiai kenksmingų tirpiklių. Šie metodai gali būti pakeisti tokiais ekstrahavimo būdais: suslėgto skysčio ekstrahavimas, superkritinio skysčio ekstrahavimas, ultragarsinis ekstrahavimas, ekstrahavimas mikrobangomis bei subkritinė vandens ekstrakcija. Ekstrahavimas mikrobangomis vis dažniau naudojamas natūralių produktų ekstrakcijai, o ekstrahavimas superkritiniais tirpikliais plačiausiai naudojamas ekstrahuoti iš įvairių augalinių medžiagų eterinius, sėklinius aliejus ir karotinoidus. Šaltalankių liekanų (po ekstrakcijos) įdėjimas į duoną galėtų ją praturtinti ir pakeisti įprastus šio produkto parametrus (spalvą, skonį, naudingumą sveikatai). Išnagrinėjus mokslinę literatūrą nustatyta, kad šaltalankių liekanų frakcijos gali būti panaudojamos funkcionaliosios duonos su sustiprintu antioksidaciniu aktyvumu gamybai.
2. Atlikus cheminės sudėties įvertinimą nustatyta, kad didžiausias baltymų kiekis šaltalankių sėklose prieš ekstrakciją yra 33,25 %, o po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu – 40,55 %. Didžiausias mineralinių medžiagų kiekis sėklose prieš ekstrakciją yra 2,03 %, o po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu – 3,46 %. Didžiausias drėgmės ir lipidų kiekis (vertinant sėklas, odeles ir išspaudas) yra sėklose atitinkamai 8,56 % ir 8,18 %. Atlikus dalelių dydžio pasiskirstymo tyrimą įvertinta, kad didžiausias dalelių dydžio pasiskirstymo vidurkis pagal paviršiaus plotą yra šaltalankių odelėse – 223,75 % susmulkintose per 0,5 mm dydžio sietą, didžiausi dalelių dydžio pasiskirstymai pagal tūrį yra sėklose – 552,71 % ir odelėse – 545,54 % susmulkintose per 0,5 mm dydžio sietą. Tačiau didžiausią dalelių dažnį matome sėklose susmulkintose per 0,2 mm dydžio sietą.
3. Pasitelkus superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu su 50 cm³ tūrio cele, didžiausia ekstrakto išeiga gauta naudojant sėklas 14,67 %, o mažiausia odeles – 10,35 %. Naudojant 500 cm³ tūrio celę, didžiausia ekstrakto išeiga gauta iš išspaudų – 11,41 %, o mažiausia iš odelių ekstrakto – 9,34 %. Palyginus tarpusavyje ekstrahavimo metodus naudojant nepolinius tirpiklius, nustatyta, kad efektyviausias ekstrahavimo metodas yra Soksleto, nes jo metu gautos didžiausios ekstrakcijų išeigos. Įvertinus ekstrakcijos būdus, naudojant polinius tirpiklius, efektyviausia – pagreitinta ekstrakcija su vandeniu.
4. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas iš šaltalankių sėklų išgautuose ekstraktuose. Daugiausiai fenolinių junginių aptikta šaltalankių sėklų ekstrakcijose (131,54 ± 4,42 mg GRE/), išgautose naudojant ekstrahavimo būdą su etanoliu ir vandeniu. Lyginant gautus bendrus visų frakcijų sudėties rezultatus, taikant Soksleto ir superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu, nustatyta, kad daugiausiai tokoferolių ir fitosferolių aptikta iš odelių išgautuose ekstraktuose taikant superkritinę ekstrakciją anglies dvideginiu.
5. Šaltalankių sėklų, odelių ir išspaudų liekanos (susidarę po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu) pridėtos į duoną padidino bendrą baltymų kiekį joje. Daugiausiai baltymų aptikta duonoje su fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 10 % šaltalankių sėklomis.
6. Vertinant duonų antioksidacinį aktyvumą, su šaltalankių fermentuotomis ir ultragarsu veiktomis 10 % odelėmis ir 10 % sėklomis, nustatyta, kad į duoną pridėjus šaltalankių sėklų yra gaunami didesni antioksidantų kiekiai.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju magistro baigiamojo darbo vadovui Prof. dr. Petrui Rimantui Venskutoniui už darbo temos idėją bei mokslines konsultacijas tyrimų vykdymo ir darbo rengimo metu.

Norėčiau padėkoti KTU Cheminės technologijos fakulteto darbuotojams: mokslų daktarei Laurai Tamkutei, mokslo darbuotojoms Ritai Kazernavičiūtei, Ramutei Maždzierienei už pagalbą atliekant tyrimus.

Pranešimai magistro tema, pristatyti lietuvių konferencijų pranešimų medžiagoje:

1. **Baužaitė, Laura;** Venskutonis, Petras Rimantas. Šaltalankio uogų išspaudų frakcionavimas aukšto slėgio ekstrakcijos metodais ir nuriebalintos frakcijos pritaikymas duonos mitybinei vertei pagerinti // studentų mokslinėje konferencijoje „CHEMIJA IR CHEMINĖ TECHNOLOGIJA 2021“. Nuotoliniu būdu 2021 gegužės 14 d. <https://cct-students.ktu.edu/>
2. Tamkutė, Laura; Daugalaitė, Ieva; **Baužaitė, Laura;** Venskutonis, Petras Rimantas. Superbread, which caees for your health // parodoje – konkurse „Technorama“. Nuotoliniu būdu 2021 gegužės 28 d. <https://technorama.ktu.edu/>

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. XUE, L., et al. Missing Food, Missing Data? A Critical Review of Global Food Losses and Food Waste Data. *Environmental Science & Technology*, Jun 20, 2017, vol. 51, no. 12. pp. 6618-6633. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b00401> MEDLINE. ISSN 0013-936X. DOI 10.1021/acs.est.7b00401.
2. GUSTAVSSON, J., et al. *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention*. Rome (Italy): FAO.
3. DIENAITĖ, L., et al. Phytochemical Composition, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Defatted Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Berry Pomace Fractions Consecutively Recovered by Pressurized Ethanol and Water. *Antioxidants*, 2020, vol. 9, no. 4. pp. 1-20 ISSN 2076-3921. DOI 10.3390/antiox9040274.
4. DIENAITĖ, L., BARANAUSKIENĖ, R. and RIMANTAS VENSKUTONIS, P. Lipophilic Extracts Isolated from European Cranberry Bush (*Viburnum Opulus*) and Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) Berry Pomace by Supercritical CO₂ – Promising Bioactive Ingredients for Foods and Nutraceuticals. *Food Chemistry*, Jun 30, 2021, vol. 348. pp. 129047. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129047> CrossRef. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2021.129047.
5. Robert Mureau. *Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (Hippophaë Rhamnoides L.) Berries*. Urbana: AOCS Press, Jul 1, 2015 Docstoc. ISBN 1528-9303.
6. Richa Arora. Antimicrobial Activity of Seed, Pomace and Leaf Extracts of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Against Foodborne and Food Spoilage Pathogens. *African Journal of Biotechnology*, Jun 5, 2012, vol. 11, no. 45. Available from: <https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=78975075580c::75b36f6ae092c964fa4a794090ccf6c3> CrossRef. ISSN 1684-5315. DOI 10.5897/AJB11.4150.
7. MISRA, S., PANDEY, P. and MISHRA, H.N. Novel Approaches for Co-Encapsulation of Probiotic Bacteria with Bioactive Compounds, their Health Benefits and Functional Food Product Development: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, Mar, 2021, vol. 109. pp. 340-351. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039> CrossRef. ISSN 0924-2244. DOI 10.1016/j.tifs.2021.01.039.
8. DOYON, M. and LABRECQUE, J. Functional Foods: A Conceptual Definition. *British Food Journal (1966)*, Oct 24, 2008, vol. 110, no. 11. pp. 1133-1149. Available from: <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/00070700810918036/full/html> CrossRef. ISSN 0007-070X. DOI 10.1108/00070700810918036.
9. VILAS-FRANQUESA, A., SALDO, J. and JUAN, B. Potential of Sea Buckthorn-Based Ingredients for the Food and Feed Industry – a Review. *Food Production, Processing and Nutrition*, Aug 17, 2020, vol. 2, no. 1. pp. 1-17. Available from: <https://doaj.org/article/48fbc8e5c13f4755b5bcb3021aa1259d> CrossRef. ISSN 2661-8974. DOI 10.1186/s43014-020-00032-y.
10. BEKKER, N. and GLUSHENKOVA, A. Components of Certain Species of the Elaeagnaceae Family. *Chemistry of Natural Compounds*, 2001, vol. 37, no. 2. pp. 97-116 ISSN 0009-3130. DOI 10.1023/A:1012395332284.
11. SURYAKUMAR, G. and GUPTA, A. *Medicinal and Therapeutic Potential of Sea Buckthorn (Hippophae Rhamnoides L.)*, 2011 Available from:

- <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.ktu.edu/science/article/pii/S0378874111006945> ISBN 0378-8741. DOI <https://doi-org.ezproxy.ktu.edu/10.1016/j.jep.2011.09.024>.
12. KALIA, R., et al. Biotechnological Interventions in Sea Buckthorn (*Hippophae L.*): Current Status and Future Prospects. *Trees*, Aug, 2011, vol. 25, no. 4. pp. 559-575. Available from: <https://search.proquest.com/docview/876863085> CrossRef. ISSN 0931-1890. DOI 10.1007/s00468-011-0543-0.
 13. LI, T.S.C. *Sea Buckthorn (Hippophae Rhamnoides L.): Production and Utilization*. Ottawa: NRC Research Press, 2003 ISBN 9780660192659.
 14. LIU, Y., et al. Identification of *Hippophae* Species (Shaji) through DNA Barcodes. *Chinese Medicine*, 2015, vol. 10, no. 1. pp. 28 ISSN 1749-8546. DOI 10.1186/s13020-015-0062-9.
 15. FATIMA, T., et al. Fatty Acid Composition of Developing Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides L.*) Berry and the Transcriptome of the Mature Seed. *PloS One*, 2012, vol. 7, no. 4. pp. e34099. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558083> MEDLINE. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0034099.
 16. KORTESNIEMI, M., SINKKONEN, J., YANG, B. and KALLIO, H. 1H NMR Spectroscopy Reveals the Effect of Genotype and Growth Conditions on Composition of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides L.*) Berries. *Food Chemistry*, 2014, vol. 147. pp. 138-146 ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.09.133.
 17. OTGONBAYAR, C., MATTHAUS, B. and ODONMAJIG, P. Fatty Acid, Tocopherol and Sterol Composition in Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides L.*) of Mongolia. *Mongolian Journal of Chemistry*, 2014, vol. 12. pp. 126-130 ISSN 2226-6739. DOI 10.5564/mjc.v12i0.187.
 18. GULIYEV, V.B., GUL, M. and YILDIRIM, A. *Hippophae Rhamnoides L.*: Chromatographic Methods to Determine Chemical Composition, use in Traditional Medicine and Pharmacological Effects. *Journal of Chromatography B*, 2004, vol. 812, no. 1. pp. 291-307. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.047> CrossRef. ISSN 1570-0232. DOI 10.1016/j.jchromb.2004.08.047.
 19. LIU, Y., et al. Metabolic Discrimination of Sea Buckthorn from Different *Hippophae* Species by 1H NMR Based Metabolomics. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 2017, vol. 7, no. 1. pp. 1-11 DOI 10.1038/s41598-017-01722-3.
 20. KUMAR, M.S.Y., DUTTA, R., PRASAD, D. and MISRA, K. *Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Seabuckthorn (Hippophae Rhamnoides) Leaves for the Comparative Evaluation of Antioxidant Activity*. , 2011 Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.ktu.edu/science/article/pii/S0308814611001920> ISBN 0308-8146. DOI <https://doi-org.ezproxy.ktu.edu/10.1016/j.foodchem.2011.01.088>.
 21. OLAS, B. Sea Buckthorn as a Source of Important Bioactive Compounds in Cardiovascular Diseases. *Food and Chemical Toxicology*, Nov, 2016, vol. 97. pp. 199-204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.008> MEDLINE. ISSN 0278-6915. DOI 10.1016/j.fct.2016.09.008.
 22. OLAS, B. Sea Buckthorn as a Source of Important Bioactive Compounds in Cardiovascular Diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, vol. 97. pp. 199-204 ISSN 0278-6915. DOI 10.1016/j.fct.2016.09.008.
 23. ANDERSSON, S.C., RUMPUNEN, K., JOHANSSON, E. and OLSSON, M.E. Tocopherols and Tocotrienols in Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides L.*) Berries during Ripening. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, Aug 13, 2008, vol. 56, no. 15. pp. 6701-6706. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf800734v> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf800734v.
24. LESKINEN, H.M., SUOMELA, J., YANG, B. and KALLIO, H.P. Regioisomer Compositions of Vaccenic and Oleic Acid Containing Triacylglycerols in Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides*) Pulp Oils: Influence of Origin and Weather Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Jan 13, 2010, vol. 58, no. 1. pp. 537-545. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf902679v> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf902679v.
 25. RAFFO, A., PAOLETTI, F. and ANTONELLI, M. Changes in Sugar, Organic Acid, Flavonol and Carotenoid Composition during Ripening of Berries of Three Seabuckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Cultivars. *European Food Research and Technology*, Sep, 2004, vol. 219, no. 4. pp. 360-368. Available from: <https://search.proquest.com/docview/632020090> CrossRef. ISSN 1438-2377. DOI 10.1007/s00217-004-0984-4.
 26. YANG, B., et al. Flavonol Glycosides in Wild and Cultivated Berries of Three Major Subspecies of *Hippophaë Rhamnoides* and Changes during Harvesting Period. *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no. 2. pp. 657-664. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.073> CrossRef. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.12.073.
 27. YANG, B., ZHENG, J. and KALLIO, H. Influence of Origin, Harvesting Time and Weather Conditions on Content of Inositols and Methylinositols in Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides*) Berries. *Food Chemistry*, 2011, vol. 125, no. 2. pp. 388-396. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.013> CrossRef. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.09.013.
 28. ZHENG, J., KALLIO, H., LINDERBORG, K. and YANG, B. Sugars, Sugar Alcohols, Fruit Acids, and Ascorbic Acid in Wild Chinese Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* Ssp. *Sinensis*) with Special Reference to Influence of Latitude and Altitude. *Food Research International*, Aug, 2011, vol. 44, no. 7. pp. 2018-2026. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.007> CrossRef. ISSN 0963-9969. DOI 10.1016/j.foodres.2010.10.007.
 29. [29.]ZHENG, J., YANG, B., TRÉPANIÉ, M. and KALLIO, H. Effects of Genotype, Latitude, and Weather Conditions on the Composition of Sugars, Sugar Alcohols, Fruit Acids, and Ascorbic Acid in Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* Ssp. *Mongolica*) Berry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Mar 28, 2012, vol. 60, no. 12. pp. 3180-3189. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf204577g> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf204577g.
 30. [30.]BAL, L.M., MEDA, V., NAIK, S.N. and SATYA, S. *Sea Buckthorn Berries: A Potential Source of Valuable Nutrients for Nutraceuticals and Cosmeceuticals.* , 2011 Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.ktu.edu/science/article/pii/S0963996911001591> ISBN 0963-9969. DOI <https://doi-org.ezproxy.ktu.edu/10.1016/j.foodres.2011.03.002>.
 31. [31.]SNE, E., GALO BURDA, R. and SEGLINA, D. Sea Buckthorn Vegetative Parts - A Good Source of Bioactive Compounds. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2013, vol. 67, no. 2. pp. 101-108 ISSN 1407-009X. DOI 10.2478/prolas-2013-0016.
 32. [32.]PINTEA, A., et al. Polar Lipid and Fatty Acid Distribution in Carotenolipoprotein Complexes Extracted from Sea Buckthorn Fruits. *Phytochemical Analysis*, Sep, 2001, vol. 12, no. 5. pp. 293-298. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pca.600> MEDLINE. ISSN 0958-0344. DOI 10.1002/pca.600.

33. KAGLIWAL, L.D., et al. *Separation of Bioactives from Seabuckthorn Seeds by Supercritical Carbon Dioxide Extraction Methodology through Solubility Parameter Approach.* , 2011 Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.ktu.edu/science/article/pii/S1383586611003467> ISBN 1383-5866. DOI <https://doi-org.ezproxy.ktu.edu/10.1016/j.seppur.2011.06.008>.
34. GUPTA, A., UPADHYAY, N.K., SAWHNEY, R.C. and KUMAR, R. A Poly-herbal Formulation Accelerates Normal and Impaired Diabetic Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration*, Nov, 2008, vol. 16, no. 6. pp. 784-790. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-475X.2008.00431.x> MEDLINE. ISSN 1067-1927. DOI 10.1111/j.1524-475X.2008.00431.x.
35. ZIELIŃSKA, A. and NOWAK, I. Abundance of Active Ingredients in Sea-Buckthorn Oil. *Lipids in Health and Disease*, May 19, 2017, vol. 16, no. 1. pp. 95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526097> MEDLINE. ISSN 1476-511X. DOI 10.1186/s12944-017-0469-7.
36. SARMA, D., et al. Nutritional Quality in Terms of Amino Acid and Fatty Acid of Five Coldwater Fish Species: Implications to Human Health. *National Academy Science Letters*, Aug, 2013, vol. 36, no. 4. pp. 385-391 CrossRef. ISSN 0250-541X. DOI 10.1007/s40009-013-0151-1.
37. YANG, B. and KALLIO, H.P. Fatty Acid Composition of Lipids in Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides L.*) Berries of Different Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Apr 16, 2001, vol. 49, no. 4. pp. 1939-1947. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf001059s> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf001059s.
38. SUOMELA, J., et al. Absorption of Flavonols Derived from Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides L.*) and their Effect on Emerging Risk Factors for Cardiovascular Disease in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Sep 20, 2006, vol. 54, no. 19. pp. 7364-7369. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf061889r> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf061889r.
39. SHUKLA, S.K., et al. Protection from Radiation-induced Mitochondrial and Genomic DNA Damage by an Extract of *Hippophae Rhamnoides*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Dec, 2006, vol. 47, no. 9. pp. 647-656. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/em.20251> MEDLINE. ISSN 0893-6692. DOI 10.1002/em.20251.
40. BAO, M. and LOU, Y. Isorhamnetin Prevent Endothelial Cell Injuries from Oxidized LDL Via Activation of p38MAPK. *European Journal of Pharmacology*, 2006, vol. 547, no. 1. pp. 22-30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.07.021> MEDLINE. ISSN 0014-2999. DOI 10.1016/j.ejphar.2006.07.021.
41. CHENG, J., et al. Inhibitory Effects of Total Flavones of *Hippophae Rhamnoides L* on Thrombosis in Mouse Femoral Artery and in Vitro Platelet Aggregation. *Life Sciences*, 2003, vol. 72, no. 20. pp. 2263-2271. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00114-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00114-0) MEDLINE. ISSN 0024-3205. DOI 10.1016/S0024-3205(03)00114-0.
42. BURČOVÁ, Z., et al. Composition of Fatty Acids and Tocopherols in Peels, Seeds and Leaves of Sea Buckthorn. *Acta Chimica Slovaca*, Apr 25, 2017, vol. 10, no. 1. pp. 29-34. Available from: <http://www.degruyter.com/doi/10.1515/acs-2017-0005> CrossRef. ISSN 1337-978X. DOI 10.1515/acs-2017-0005.

43. BIRBEN, E., et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, Jan, 2012, vol. 5, no. 1. pp. 9-19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268465> PubMed. ISSN 1939-4551. DOI 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
44. NARAYANAN, S., et al. Antioxidant Activities of Seabuckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) during Hypoxia Induced Oxidative Stress in Glial Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Oct, 2005, vol. 278, no. 1. pp. 9-14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16180083> MEDLINE. ISSN 0300-8177. DOI 10.1007/s11010-005-7636-2.
45. BURTON, G.J. and JAUNIAUX, E. *Oxidative Stress*. , 2011 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693410001392> ISBN 1521-6934. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>.
46. TING, H., et al. *The in Vitro and in Vivo Antioxidant Properties of Seabuckthorn (Hippophae Rhamnoides L.) Seed Oil*. , 2011 Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.ktu.edu/science/article/pii/S0308814610011544> ISBN 0308-8146. DOI <https://doi-org.ezproxy.ktu.edu/10.1016/j.foodchem.2010.09.057>.
47. GRADT, I., KÜHN, S., MÖRSEL, J.-. and ZVAIGZNE, G. Chemical Composition of Sea Buckthorn Leaves, Branches and Bark. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, Jun 27, 2017, vol. 71, no. 3. pp. 211-216. Available from: <http://www.degruyter.com/doi/10.1515/prolas-2017-0035> CrossRef. ISSN 1407-009X. DOI 10.1515/prolas-2017-0035.
48. KOSKOVAC, M., et al. Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals. *Cosmetics*, Oct 16, 2017, vol. 4, no. 4. pp. 40. Available from: <https://search.proquest.com/docview/2124637370> CrossRef. ISSN 2079-9284. DOI 10.3390/cosmetics4040040.
49. MICHEL, T., DESTANDAU, E. and ELFAKIR, C. *Evaluation of a Simple and Promising Method for Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (Hippophaë Rhamnoides L.) Berries: Pressurised Solvent-Free Microwave Assisted Extraction*. , 2011 Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.ktu.edu/science/article/pii/S0308814610015359> ISBN 0308-8146. DOI <https://doi-org.ezproxy.ktu.edu/10.1016/j.foodchem.2010.09.112>.
50. TOBISZEWSKI, M., MECHLIŃSKA, A., ZYGMUNT, B. and NAMIEŚNIK, J. *Green Analytical Chemistry in Sample Preparation for Determination of Trace Organic Pollutants*. , 2009 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993609001265> ISBN 0165-9936. DOI <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>.
51. ARMENTA, S., GARRIGUES, S. and DE LA GUARDIA, M. *Green Analytical Chemistry*. , 2008 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599360800109X> ISBN 0165-9936. DOI <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>.
52. XU, X., et al. Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides L.*) Oil using Response Surface Methodology. *Food Science & Technology*, 2008, vol. 41, no. 7. pp. 1223-1231. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.002> CrossRef. ISSN 0023-6438. DOI 10.1016/j.lwt.2007.08.002.
53. VIČKAČKAITĖ, V. *Vilniaus Universitetas Ekstrakciniai Mėginio Paruošimo Dujų Chromatografinėi Analizei Metodai*. , 2008.

54. HERRERO, M., CIFUENTES, A. and IBANEZ, E. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources : Plants, Food-by-Products, Algae and Microalgae A Review. *Food Chemistry*, 2006, vol. 98, no. 1. pp. 136-148. Available from: <https://search.proquest.com/docview/20207534> Aquatic Science & Fisheries Abstracts (ASFA) Professional. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.05.058.
55. AKANDA, M.J.H., et al. Applications of Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Palm Oil and Oil from Natural Sources. *Molecules*, Feb 1, 2012, vol. 17, no. 2. pp. 1764-1794. Available from: https://www.openaire.eu/search/publication?articleId=od_267::db6cf673c739a40caf8340c5fade23fd DOI 10.3390/molecules17021764.
56. LANG, Q. and WAI, C.M. Supercritical Fluid Extraction in Herbal and Natural Product Studies — a Practical Review. *Talanta (Oxford)*, 2001, vol. 53, no. 4. pp. 771-782. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00557-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00557-9) PubMed. ISSN 0039-9140. DOI 10.1016/S0039-9140(00)00557-9.
57. SAJFERTO VÁ, M., et al. B-Sitosterol: Supercritical Carbon Dioxide Extraction from Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides L.*) Seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, Apr 22, 2010, vol. 11, no. 4. pp. 1842-1850. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480045> MEDLINE. ISSN 1422-0067. DOI 10.3390/ijms11041842.
58. PŁOTKA-WASYLKA, J., et al. Extraction with Environmentally Friendly Solvents. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry (Regular Ed.)*, Jun, 2017, vol. 91. pp. 12-25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.006> CrossRef. ISSN 0165-9936. DOI 10.1016/j.trac.2017.03.006.
59. RAJHA, H.N., et al. Effect of the Drying Process on the Intensification of Phenolic Compounds Recovery from Grape Pomace using Accelerated Solvent Extraction. *International Journal of Molecular Sciences*, Oct 15, 2014, vol. 15, no. 10. pp. 18640-18658. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25322155> MEDLINE. ISSN 1422-0067. DOI 10.3390/ijms151018640.
60. BANDH, C., et al. Comparison of Accelerated Solvent Extraction and Soxhlet Extraction for the Determination of PCBs in Baltic Sea Sediments. *Environmental Science & Technology*, Dec 1, 2000, vol. 34, no. 23. pp. 4995-5000. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/es991064g> CrossRef. ISSN 0013-936X. DOI 10.1021/es991064g.
61. MUSTAFA, A. and TURNER, C. Pressurized Liquid Extraction as a Green Approach in Food and Herbal Plants Extraction: A Review. *Analytica Chimica Acta*, 2011, vol. 703, no. 1. pp. 8-18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018> PubMed. ISSN 0003-2670. DOI 10.1016/j.aca.2011.07.018.
62. DELGADO-TORRE, M.P., et al. Comparison of Accelerated Methods for the Extraction of Phenolic Compounds from Different Vine-Shoot Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Mar 28, 2012, vol. 60, no. 12. pp. 3051-3060. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf205078k> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf205078k.
63. ZHU, M., et al. Determination of 21 Antibiotics in Sea Cucumber using Accelerated Solvent Extraction with in-Cell Clean-Up Coupled to Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry*, 2018, vol. 258. pp. 87-94 ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.03.051.

64. RICHTER, B.E., et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry (Washington)*, Mar 15, 1996, vol. 68, no. 6. pp. 1033-1039. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ac9508199> CrossRef. ISSN 0003-2700. DOI 10.1021/ac9508199.
65. SIRÓ, I., KÁPOLNA, E., KÁPOLNA, B. and LUGASI, A. Functional Food. Product Development, Marketing and Consumer acceptance—A Review. *Appetite*, 2008, vol. 51, no. 3. pp. 456-467. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060> MEDLINE. ISSN 0195-6663. DOI 10.1016/j.appet.2008.05.060.
66. NOUR, V., et al. Nutritional and Bioactive Compounds in Dried Sea-Buckthorn Pomace. *Erwerbsobstbau*, Mar, 2021, vol. 63, no. 1. pp. 91-98. Available from: <https://search.proquest.com/docview/2488031545> CrossRef. ISSN 0014-0309. DOI 10.1007/s10341-020-00539-1.
67. GHENDOV-MOSANU, A., et al. Potential Application of Hippophae Rhamnoides in Wheat Bread Production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, Mar 11, 2020, vol. 25, no. 6. pp. 1272. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32168868> MEDLINE. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules25061272.
68. GUO, X., et al. Effect of Sea-Buckthorn Pulp and Flaxseed Residues on Quality and Shelf Life of Bread. *Food & Function*, Jul 17, 2019, vol. 10, no. 7. pp. 4220-4230. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31257368> MEDLINE. ISSN 2042-6496. DOI 10.1039/C8FO02511H.
69. BORCZAK, B., et al. Nutritional Properties of Wholemeal Wheat-Flour Bread with an Addition of Selected Wild Grown Fruits. *Die Stärke*, Jul, 2016, vol. 68, no. 7-8. pp. 675-682 CrossRef. ISSN 0038-9056. DOI 10.1002/star.201500298.
70. *Smaller System, Sleeker Styling, Smarter Sizing - Meet the New Mastersizer 3000 Particle Size Analyzer from Malvern Instruments*. New York: PR Newswire Association LLC, Sep 13, 2011 Available from: <https://search.proquest.com/docview/889126333> ProQuest Business Collection (Alumni Edition).
71. ASSUMPÇÃO, C.F. *Compostos Bioativos Em Óleos E Resíduos De Sementes De Uvas Orgânicas E Convencionais*. , Jan 1, 2014.
72. ZYMONÉ, K., et al. Phytochemical Profiling of Fruit Powders of Twenty Sorbus L. Cultivars. *Molecules (Basel, Switzerland)*, Oct 10, 2018, vol. 23, no. 10. pp. 2593. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30309011> MEDLINE. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules23102593.
73. NUERNBERG, K., NUERNBERG, G., PRIEPKE, A. and DANNENBERGER, D. *Sea Buckthorn Pomace Supplementation in the Finishing Diets of Pigs – are there Effects on Meat Quality and Muscle Fatty Acids?* , Jan 1, 2015 DOI 10.5194/aab-58-107-2015.
74. PAVLOVIĆ, N., et al. Supercritical Co2 Extraction of Sea Buckthorn. *Hrana U Zdravlju i Bolesti : Znanstveno-Stručni Časopis Za Nutricionizam i Dijetetiku*, Jan 1, 2016, vol. 5, no. 2. Available from: https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=od_951::7e8c1d7c4f18dca3f7330cdee31afde0 ISSN 2233-1220.
75. BEVERIDGE, T., LI, T.S.C., OOMAH, B.D. and SMITH, A. Sea Buckthorn Products: Manufacture and Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Sep 20, 1999, vol. 47, no. 9. pp. 3480-3488. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf981331m> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf981331m.

76. SAHENA, F., et al. Application of Supercritical CO₂ in Lipid Extraction – A Review. *Journal of Food Engineering*, 2009, vol. 95, no. 2. pp. 240-253. Available from: <https://search.datacite.org/works/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026> CrossRef. ISSN 0260-8774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026.
77. PIŁAT, B., BIENIEK, A. and ZADERNOWSKI, R. *Chemical Composition of Individual Morphological Parts of the Sea Buckthorn Fruit (Hippophaë Rhamnoides L.) View Project.*, 20-10, 1405.
78. LINDERBORG, K.M., et al. The Fibres and Polyphenols in Sea Buckthorn (Hippophaë Rhamnoides) Extraction Residues Delay Postprandial Lipemia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Jun, 2012, vol. 63, no. 4. pp. 483-490. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09637486.2011.636346> MEDLINE. ISSN 0963-7486. DOI 10.3109/09637486.2011.636346.
79. SHARMA, M., et al. Influence of Particle Size on Physical and Sensory Attributes of Mango Pulp Powder. *International Agrophysics*, Sep 1, 2013, vol. 27, no. 3. pp. 323-328. Available from: <http://www.degruyter.com/doi/10.2478/intag-2013-0001> CrossRef. ISSN 0236-8722. DOI 10.2478/intag-2013-0001.
80. AUFFRET, A., et al. Effect of Grinding and Experimental Conditions on the Measurement of Hydration Properties of Dietary Fibres. *Food Science & Technology*, 1994, vol. 27, no. 2. pp. 166-172. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1994.1033> CrossRef. ISSN 0023-6438. DOI 10.1006/fstl.1994.1033.
81. REISSNER, A., et al. Composition and Physicochemical Properties of Dried Berry Pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Feb, 2019, vol. 99, no. 3. pp. 1284-1293 CrossRef. ISSN 0022-5142. DOI 10.1002/jsfa.9302.
82. COSSUTA, D., et al. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Sea Buckthorn (Hippophae Rhamnoides L.) Pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oct, 2007, vol. 87, no. 13. pp. 2472-2481. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2996> CrossRef. ISSN 0022-5142. DOI 10.1002/jsfa.2996.
83. DULF, F. Fatty Acids in Berry Lipids of Six Sea Buckthorn (Hippophae Rhamnoides L., Subspecies Carpatica) Cultivars Grown in Romania. *Chemistry Central Journal*, Dec, 2012, vol. 6, no. 1. pp. 1-12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995716> PubMed. ISSN 1752-153X. DOI 10.1186/1752-153X-6-106.
84. ABUMWEIS, S.S., PhD, Marinangeli, Christopher P.F., RD, PhD, FROHLICH, J., MD and JONES, P.J.H., PhD. Implementing Phytosterols into Medical Practice as a Cholesterol-Lowering Strategy: Overview of Efficacy, Effectiveness, and Safety. *Canadian Journal of Cardiology*, 2014, vol. 30, no. 10. pp. 1225-1232. Available from: <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0828282X14002888> MEDLINE. ISSN 0828-282X. DOI 10.1016/j.cjca.2014.04.022.
85. XU, B., et al. Simultaneous Determination of Free Phytosterols and Tocopherols in Vegetable Oils by an Improved SPE–GC–FID Method. *Food Analytical Methods*, Feb, 2020, vol. 13, no. 2. pp. 358-369. Available from: <https://search.proquest.com/docview/2344259229> CrossRef. ISSN 1936-9751. DOI 10.1007/s12161-019-01649-7.
86. ABIDI, S.L. *Chromatographic Analysis of Plant Sterols in Foods and Vegetable Oils*. Netherlands: Elsevier B.V, 2001 MEDLINE. ISBN 0021-9673. DOI 10.1016/S0021-9673(01)00946-3.

87. HU, Y., et al. Anti-Inflammatory Effect and Prostate Gene Expression Profiling of Steryl Ferulate on Experimental Rats with Non-Bacterial Prostatitis. *Food & Function*, May 28, 2014, vol. 5, no. 6. pp. 115-1159. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24686498> MEDLINE. ISSN 2042-6496. DOI 10.1039/c4fo00052h.
88. MOREAU, R.A., WHITAKER, B.D. and HICKS, K.B. *Phytosterols, Phytostanols, and their Conjugates in Foods: Structural Diversity, Quantitative Analysis, and Health-Promoting Uses*. England: Elsevier Ltd, 2002 MEDLINE. ISBN 0163-7827. DOI 10.1016/S0163-7827(02)00006-1.
89. ANDERSSON, S.C., OLSSON, M.E., JOHANSSON, E. and RUMPUNEN, K. Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Berries during Ripening and use of Pheophytin as a Maturity Marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Jan 14, 2009, vol. 57, no. 1. pp. 250-258. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf802599f> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf802599f.
90. PINTEA, A., et al. Chromatographic Analysis of Carotenol Fatty Acid Esters in *Physalis Alkekengi* and *Hippophae Rhamnoides*. *Phytochemical Analysis*, May, 2005, vol. 16, no. 3. pp. 188-195. Available from: <https://api.istex.fr/ark:/67375/WNG-SHLQMMDQ-Z/fulltext.pdf> MEDLINE. ISSN 0958-0344. DOI 10.1002/pca.844.
91. YANG, B. and KALLIO, H. *Composition and Physiological Effects of Sea Buckthorn (Hippophaë) Lipids*. Elsevier Ltd, May, 2002 CrossRef. ISBN 0924-2244. DOI 10.1016/S0924-2244(02)00136-X.
92. BIRCH, A.N., PETERSEN, M.A., ARNEBORG, N. and HANSEN, ÅS. Corrigendum to "Influence of Commercial Baker's Yeasts on Bread Aroma Profiles"[*Food Research Int.*, 52 160-166 (2013)]. *Food Research International*, Nov, 2013, vol. 54, no. 1. pp. 922. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.009> CrossRef. ISSN 0963-9969. DOI 10.1016/j.foodres.2013.10.009.
93. NAKOV, G., et al. Effect of Grape Pomace Powder Addition on Chemical, Nutritional and Technological Properties of Cakes. *Food Science & Technology*, Dec, 2020, vol. 134. pp. 109950. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109950> CrossRef. ISSN 0023-6438. DOI 10.1016/j.lwt.2020.109950.
94. MARCHETTI, L., CALIFANO, A.N. and ANDRÉS, S.C. Partial Replacement of Wheat Flour by Pecan Nut Expeller Meal on Bakery Products. Effect on Muffins Quality. *Food Science & Technology*, Sep, 2018, vol. 95. pp. 85-91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.050> CrossRef. ISSN 0023-6438. DOI 10.1016/j.lwt.2018.04.050.
95. TOLVE, R., et al. Wheat Bread Fortification by Grape Pomace Powder: Nutritional, Technological, Antioxidant, and Sensory Properties. *Foods*, Jan 2, 2021, vol. 10, no. 1. pp. 75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33401782> PubMed. ISSN 2304-8158. DOI 10.3390/foods10010075.
96. LAAKSONEN, O., et al. Sensory Quality and Compositional Characteristics of Blackcurrant Juices Produced by Different Processes. *Food Chemistry*, Jun 15, 2013, vol. 138, no. 4. pp. 2421-2429. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.035> MEDLINE. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.12.035.
97. KOUFMAN, J.A. and JOHNSTON, N. Potential Benefits of pH 8.8 Alkaline Drinking Water as an Adjunct in the Treatment of Reflux Disease. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*,

Jul, 2012, vol. 121, no. 7. pp. 431-434. Available from:
<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/000348941212100702> MEDLINE. ISSN 0003-4894. DOI 10.1177/000348941212100702.