



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Spanguolių išspaudų ekstraktas – funkcionalusis priedas
jogurto gamyboje: įtaka technologinėms savybėms ir
virškinamumui**

Baigiamasis magistro projektas

Gabrielė Zygmantaitė

Projekto autorė

Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

Vadovė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Spanguolių išspaudų ekstraktas – funkcionalusis priedas
jogurto gamyboje: įtaka technologinėms savybėms ir
virškinamumui**

Baigiamasis magistro projektas

Maisto mokslas ir sauga (6211FX011)

Gabrielė Zygmantaitė

Projekto autorė

Prof. dr. Daiva Leskauskaitė

Vadovė

Doc. dr. Rimantė Vinauskienė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Gabrielė Zygmantaitė

Spanguolių išspaudų ekstraktas – funkcionalusis priedas jogurto gamyboje: įtaka technologinėms savybėms ir virškinamumui

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.

Gabrielė Zygmantaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Zygmantaitė, Gabrielė. Spanguolių išspaudų ekstraktas – funkcionalusis priedas jogurto gamyboje: įtaka technologinėms savybėms ir virškinamumui. Magistro baigiamasis projektas / vadovė prof. dr. Daiva Leskauskaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: pieno baltymai; spanguolių ekstraktas; virškinamumas; fenoliniai junginiai.

Kaunas, 2021. 74 p.

Santrauka

Šio tyrimo tikslas įvertinti spanguolių išspaudų ekstraktų įtaką jogurto fizikinėms cheminėms savybėms ir virškinamumui.

Tyrimo metu spanguolių išspaudų ekstraktas išfrakcionuotas į didelės (DMM) ir mažos molekulinės masės (MMM) junginių frakcijas, kurios skyrėsi proantocianidinų ir tam tikrų monomerinių antocianidinų kiekiu. DMM frakcijų ekstrakto proantocianidinų aptikta $1813,95 \pm 11,04$ mg/100g, o MMM frakcijų ekstrakto – $60,31 \pm 0,60$ mg/100g. Ekstraktai skyrėsi antioksidaciniu ir antimikrobiniu aktyvumu. MMM frakcijos DPPH radikalų surišimo geba buvo $102 \pm 0,02$ mg TE/g, o DMM frakcijos – $305 \pm 0,01$ mg TE/g. DMM frakcija pasižymėjo pieno rūgšties bakterijų slopinimu, matuotu pagal agarą terpėje susidariusia skaidria zona ir pagal jų augimo kreivę laikymo metu. Dėl tokių savybių, rauginant pieną su DMM ekstraktu jogurto pagaminti nepavyko. Tiriant pieno mišinių su ekstraktais savybes nustatyta, kad naujų kovalentinių ir nekovalentinių ryšių susidarymas tarp pieno baltymų ir DMM bei nefrakcionuoto spanguolių ekstrakto fenolinių junginių, lėmė pieno baltymų dalelių stambėjimą, klampos didėjimą pieno mišiniuose bei iš jų pagamintame jogurte bei baltymų rūgštinės koaguliacijos trukmės trumpėjimą. Didėjant ekstrakto kiekiui, jogurto klampa didėjo. Tačiau MMM ekstraktas neturėjo įtakos pieno mišinių ir iš jų pagaminto jogurto baltymų dalelių dydžiui ir klampai. Atlikus spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų, jų mišinių su pienu ir iš mišinių pagaminto jogurto *in vitro* virškinamumo tyrimus pagal laisvą α -amino grupių atsipalaidavimą buvo įvertintas pieno baltymų virškinimo greitis, o pagal fenolinių junginių ir proantocianidinų atpalaidavimą, biologinio prieinamumo indeksą ir antioksidacinį aktyvumą skirtinguose skrandžio ir plonojo žarnyno virškinimo etapuose buvo įvertintas ekstrakto fenolinių junginių biologinis prieinamumas. Nustatyta, kad visų spanguolių išspaudų ekstraktų frakcijų virškinimo metu žymiai sumažėjo bendras fenolinių junginių ir proantocianidinų kiekis, o tai turėjo neigiamos įtakos jų biologiniam prieinamumui ir antioksidacinėms savybėms. Taip pat nustatyta, kad pieno baltymai turi neigiamos įtakos spanguolių ekstraktų fenolinių junginių ir ypač proantocianidinų atpalaidavimui ir biologiniam prieinamumui virškinimo metu. Pieno mišiniuose su DMM spanguolių ekstrakto frakcija nustatytas mažiausias fenolinių junginių (17,74 %) ir proantocianidinų biologinis prieinamumas (4,10 %) ir mažiausias pieno baltymų hidrolizės laipsnis ($15,41 \pm 0,21$ %). Apibendrinant atlikto tyrimo rezultatus, rekomenduojama gaminant spanguolių ekstraktu praturtintą jogurtą naudoti ekstraktą, kuriame yra mažesnės molekulinės masės fenoliniai junginiai.

Zygmantaite, Gabriele. Extract Isolated from Cranberry Pomace as Functional Ingredient in Yoghurt Production: Effect on Technological Properties and Digestibility. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. Daiva Leskauskaitė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: Milk protein; Cranberry extract; Digestion; Phenolic compounds.

Kaunas, 2021. 74 p.

Summary

The aim of this research was to evaluate the influence of cranberry pomace extracts on the physicochemical properties and digestibility of yogurt.

In the research, cranberry pomace extract was fractionated into high (HMW) and low molecular weight (LMW) fractions of compounds, which differed in the quantity of proanthocyanidins and certain monomeric anthocyanidins. 1813.95 ± 11.04 mg/100 g of proanthocyanidins was detected in the extract of HMW fractions and 60.31 ± 0.60 mg/100 g in the extract of LMW fractions. The extracts differed in antioxidant and antimicrobial activity. The DPPH radical scavenging capacity of the LMW fraction was 102 ± 0.02 mg TE/g and that of the HMW fraction was 305 ± 0.01 mg TE/g. The HMW fraction was characterized by inhibition of lactic acid bacteria as measured by the transparent zone formed in the agar medium and by their growth curve during the storage. Due to these properties, fermenting milk with HMW extract failed to produce yogurt. When researching the properties of milk mixtures with the extracts, it was found that the formation of new covalent and non-covalent bonds between milk proteins, HMW, and phenolic compounds of unfractionated cranberry extract caused the enlargement of milk protein particles, an increase in viscosity in the milk mixtures and yoghurt made from them, and shortening the duration of acid coagulation of proteins. As the amount of the extract increased, the viscosity of the yogurt increased. However, the LMW extract had no effect on the particle size and viscosity of the proteins of the milk mixtures and yogurt produced from them. After in vitro digestibility studies of aqueous solutions of cranberry extracts, their mixtures with milk and yogurt made from the mixtures, according to the release of free α -amino groups, the digestion rate of milk proteins was evaluated, while the bioavailability of phenolic compounds of the extract was assessed according to the release of phenolic compounds and proanthocyanidins, the bioavailability index, and the antioxidant activity at different stages of gastrointestinal and small intestinal digestion. During the digestion of all fractions of the cranberry pomace extracts, it was found that the total phenolic compounds and proanthocyanidins significantly reduce. This had a negative effect on their bioavailability and antioxidant properties. It was also found that during the digestion, the milk proteins adversely affect the release and bioavailability of the phenolic compounds of the cranberry extracts and in particular the release and bioavailability of the proanthocyanidins. The lowest bioavailability of phenolic compounds (17.74%) and proanthocyanidins (4.10%) and the lowest degree of milk protein hydrolysis ($15.41 \pm 0.21\%$) were found in the milk mixtures with the LMW cranberry extract fraction. Summarizing the results of the research, it is recommended using an extract containing lower molecular weight phenolic compounds in the production of yogurt enriched with the cranberry extract.

TURINYS

LENTELIŲ SĄRAŠAS	7
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	8
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	9
ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Jogurto maistinė vertė ir nauda vartotojams.....	11
1.2. Vaisių uogų ekstraktų technologinės-funkcinės savybės pieno sistemose.....	12
1.3. Vaisių uogų fenolinių junginių sąveika su pieno baltymais.....	13
1.3.1. Pieno baltymų struktūros įtaka	13
1.3.2. Fenolinių junginių struktūros įtaka.....	14
1.3.3. Baltymų-fenolių junginių komplekso susidarymo mechanizmas ir jungtys	16
1.3.4. Technologinių veiksnių įtaka	16
1.4. Vaisių uogų fenolinių junginių sąveikos su pieno baltymais įtaka jogurto charakteristikoms	18
1.4.1. Fenolinių junginių sąveikos su pieno baltymais įtaka fizikinėms cheminėms savybėms	18
1.4.2. Fenolinių junginių sąveikos su pieno baltymais įtaka biologiniam prieinamumui ir virškinamumui	18
1.5. Spanguolių ekstraktų technologinės-funkcinės savybės, biologinis aktyvumas ir panaudojimas pieno produktuose	21
2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI	23
2.1. Medžiagos ir reagentai	23
2.2. Tyrimo objektai, jų paruošimas	24
2.3. Tyrimo metodai	25
2.3.1. Spanguolių ekstraktų vertinimo metodai.....	25
2.3.2. Pieno mišinių su ekstraktais ir iš jų pagaminto jogurto fizikinių cheminių savybių vertinimo metodai	26
2.3.3. Pieno mišinių su ekstraktais ir iš jų pagaminto jogurto virškinamumo tyrimas <i>in vitro</i>	28
2.3.4. Pieno mišinių su ekstraktais ir iš jų pagaminto jogurto virškinamumo vertinimo metodai ..	30
2.3.5. Statistinė analizė.....	31
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	32
3.1. Spanguolių ekstraktų charakterizavimas	32
3.2. Pieno mišinių su spanguolių ekstraktais fizikinės cheminės savybės	33
3.3. Pieno mišinių su ekstraktais virškinamumas	38
3.4. Skirtingais ekstraktais praturtinto jogurto fizikinės cheminės savybės.....	45
3.5. Jogurto su ekstraktais virškinamumas	50
IŠVADOS	57
PUBLIKACIJŲ MAGISTRO TEZIŲ TEMA SĄRAŠAS	58
LITERATŪROS SĄRAŠAS	59

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Vandeninių tirpalų, pieno mišinių su ekstraktais ir jogurto mėginių sudėtis bei kodavimas	24
2 lentelė. Elektrolitų tirpalų tūriai ir koncentracijos darbinių virškinimo sulčių gamybai	28
3 lentelė. Fermentų vandeninių tirpalų ruošimas	29
4 lentelė. Skirtingų spanguolių ekstraktų ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto charakteristika ..	33
5 lentelė. Pieno mišinių su ekstraktais vidutinio dalelių dydžio pagal tūrį $d_{[4,3]}$ (μm) priklausomybė nuo ekstrakto kiekio	35
6 lentelė. Pieno mišinių su ekstraktais reologinių charakteristikų priklausomybė nuo ekstraktų ir jų koncentracijos pieno mišinyje	36
7 lentelė. Pieno mišinių su skirtingais spanguolių ekstraktais baltymų hidrolizės laipsnio kitimas virškinimo metu	40
8 lentelė. Skirtingų spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų ir jų mišinių su pienu fenolinių junginių bei proantocianidinų bioprieinamumo indeksas	42
9 lentelė. Skirtingais ekstraktais praturtinto jogurto vidutinio dalelių dydžio pagal tūrį priklausomybė nuo ekstrakto kiekio	47
10 lentelė. Reologinių charakteristikų priklausomybė nuo skirtingų ekstraktų ir jų koncentracijos jogurte	48
11 lentelė. Skirtingais ekstraktais praturtinto jogurto baltymų hidrolizės laipsnio kitimas <i>in vitro</i> virškinimo metu	52
12 lentelė. Jogurto su skirtingais ekstraktais fenolinių junginių ir proantocianidinų bioprieinamumo indeksas	54

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Proantocianidinų cheminė struktūra: (A) A tipo dimeras sujungtas C ₄ →C ₈ ir C ₂ –O–C ₇ ryšiu ryšiu; (B) B tipo dimeras sujungtas C ₄ →C ₈ ryšiu; (C) B tipo dimeras sujungtas C ₄ →C ₆ ryšiu; (D) trimeras C1	15
2 pav. Fenolinių junginių asimiliacija ir metabolizmas žmogaus virškinamajame trakte.....	19
3 pav. Fenolinių junginių ir baltymų komplekso stabilumas skrandyje ir atsipalaidavimas žarnyne	20
4 pav. <i>In vitro</i> virškinimo schema vienam mėginiui	30
5 pav. Spanguolių ekstraktų ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto įtaka pieno rūgšties bakterijų, naudojamų jogurto gamyboje: <i>Streptococcus thermophilus</i> ir <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , augimo kreivėms	33
6 pav. Pieno baltymų dalelių pasiskirstymas pieno mišiniuose su spanguolių išspaudų ekstraktais (A, B, C) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (D)	35
7 pav. Pieno mišinių su ekstraktais klamos kreivės, esant skirtingomis spanguolių ekstraktų (A, B, C) ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto (D) koncentracijomis	36
8 pav. Pieno baltymų rūgštinės koaguliacijos trukmė pieno mišiniuose su skirtingomis spanguolių ekstraktų (A, B, C) ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto (D) koncentracijomis.....	38
9 pav. Laisvų α-amino grupių koncentracijos kitimas pieno mišinių su skirtingais spanguolių ekstraktais virškinimo metu.....	40
10 pav. Virškinimo <i>in vitro</i> įtaka spanguolių ekstraktų fenolinių junginių atpalaidavimo dinamikai iš ekstrakto vandeninio tirpalo ir ekstrakto mišinio su pienu.....	42
11 pav. Virškinimo <i>in vitro</i> įtaka spanguolių ekstraktų proantocianidinų atpalaidavimo dinamikai iš ekstrakto vandeninio tirpalo ir ekstrakto mišinio su pienu.....	44
12 pav. Virškinimo <i>in vitro</i> įtaka spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų ir ekstraktų mišinių su pienu antioksidaciniam aktyvumui.....	45
13 pav. Baltymų dalelių pasiskirstymas jogurto mėginiuose su frakcionuotu mažos (A) molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstraktu, nefrakcionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu (B) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (C).....	46
14 pav. Jogurto klamos kreivės esant skirtingiems ekstraktams ir jų koncentracijomis: su frakcionuotu mažos (A) molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstraktu, nefrakcionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu (B) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (C).....	48
15 pav. Pieno rūgšties bakterijų skaičiaus pokyčiai laikymo metu jogurte, praturtintame skirtingais ekstraktais ir jų koncentracijomis: su frakcionuotu mažos (A) molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstraktu, nefrakcionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu (B) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (C).....	50
16 pav. Laisvų α-amino grupių skaičiaus kitimas skirtingais ekstraktais ir jų kiekiais praturtinto jogurto baltymų virškinimo metu	52
17 pav. Virškinimo <i>in vitro</i> įtaka fenolinių junginių atpalaidavimo dinamikai iš jogurto su skirtingais spanguolių ekstraktais	54
18 pav. Virškinimo <i>in vitro</i> įtaka proantocianidinų atpalaidavimo dinamikai iš jogurto su skirtingais spanguolių ekstraktais	55

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

BI – biologinio prieinamumo indeksas;

BSA – galvijų serumo albuminas;

DMM – didelės molekulinės masės junginių spanguolių išspaudų ekstraktas;

GDL – gliukono- γ -laktonas;

GRE – galo rūgšties ekvivalentai;

KSV – kolonijas sudarantys vienetai;

MCT – monokarboksirūgšties pernešėjas;

MMM – mažos molekulinės masės junginių spanguolių išspaudų ekstraktas;

PAC – proantocianidinai;

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

SEN – spanguolių išspaudų ekstraktas;

SGF – dirbtinės skrandžio sultys;

SGLT1 – natrio-gliukozės kotransporteris 1;

SIF – dirbtinės žarnyno sultys;

SSF – dirbtinės seilių sultys;

TE – trolokso ekvivalentai;

VSE – komercinis vynuogių sėklų ekstraktas.

ĮVADAS

Šiuolaikinė visuomenė vis labiau domisi maisto produktų sudėtimi ir kokybe. Dažniausiai skaitydami etiketes žmonės vengia produktų, kuriuose yra sintetinių junginių, naudojamų kaip dažikliai, antioksidantai, stabilizatoriai, konservantai ir kt., ir pirmenybę teikia produktams, kuriuose yra gerokai mažiau sintetinių priedų ir daugiau juos pakeisiančių natūralių junginių. Todėl pieno produktų gamyboje siekiant pagerinti tradicinio jogurto maistinę vertę naudojami natūralūs augalų ekstraktai. Šių priedų panaudojimas pieno sistemose ir rauginimo metu vykstantys biotechnologiniai procesai, kai susidaro nauji junginiai, gali turėti įtakos ne tik produkto juslinėms, fizikinėms-cheminėms, reologinėms savybėms, bet ir jų virškinamumui bei biologiniam prieinamumui. Yra daug mokslinių tiriamųjų darbų teigiančių, kad augalų ekstrakto naudojimas jogurto gamyboje lemia elastingesnę ir tvirtesnę galutinio produkto tekstūrą, sumažina sinerezės greitį laikymo metu ir padidina biologiškai aktyvių junginių stabilumą, prieinamumą virškinimo metu. Spanguolių išspaudų ekstraktas galėtų būti viena iš alternatyvų siekiant praturtinti jogurtą natūraliais antioksidantais, pakeisti juslines savybes ir tekstūros charakteristikas bei sumažinti spanguolių sulčių gamybos šalutinio produkto taršą dėl ypač žemo pH. Šias gerinančias savybes produktui suteikia spanguolių ekstrakto aptinkama didelė fenolinių junginių grupė – antocianinai ir proantocianidinai, kurie lengvai sudaro kompleksus su pieno baltymais ir taip gali ne tik pakeisti baltymų funkcines savybes produktuose, tačiau ir sumažinti jų maistinę vertę lėtindami baltymų virškinimą. Nors mokslinėje literatūroje galima rasti daug duomenų apie spanguolių ir iš jų pagamintų ekstraktų antimikrobinį ir antioksidacinį aktyvumą, panaudojimą įvairių pieno produktų gamyboje, tačiau trūksta tyrimų apie spanguolių ekstrakto įtaką jogurto baltymų virškinamumui bei spanguolių fenolinių junginių biologinį prieinamumą produkto virškinimo metu.

Darbo tikslas – įvertinti spanguolių išspaudų ekstraktų įtaką jogurto fizikinėms-cheminėms savybėms ir virškinamumui.

Darbo uždaviniai:

1. išfrakcionuoti spanguolių išspaudų ekstraktą į mažos ir didelės molekulinės masės junginių frakcijas ir nustatyti jų sudėties charakteristikas, antimikrobinį ir antioksidacinį aktyvumą;
2. nustatyti skirtingų spanguolių išspaudų ekstraktų įtaką pieno ir iš jo pagaminto jogurto fizikinėms-cheminėms ir reologinėms savybėms;
3. įvertinti skirtingų spanguolių ekstraktų įtaką pieno ir iš jo pagaminto jogurto baltymų *in vitro* virškinamumui;
4. nustatyti pieno baltymų įtaką fenolinių junginių, proantocianidinių atpalaidavimui, biologiniam prieinamumui ir antioksidaciniam aktyvumui *in vitro* virškinimo metu;
5. nustatyti skirtingų koncentracijų spanguolių ekstraktų įtaką jogurto fenolinių junginių, proantocianidinių atpalaidavimui ir biologiniam prieinamumui *in vitro* virškinimo metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Jogurto maistinė vertė ir nauda vartotojams

Jogurtas yra populiarus pieno produktas visame pasaulyje. Šis produktas paklausus visuomenėje ne tik dėl jo unikalios tekstūros ir skonio, bet ir dėl naudos sveikatai ir maistingumo. Maistinė jogurto sudėtis gali būti keičiama atsižvelgiant į fermentacijos metu naudojamas pradinį kultūrų padermes, pieno riebumą ir rūšį, saldiklius ir vaisius pridėtus prieš fermentaciją, taip pat rauginimo proceso trukmę. Tačiau bendra jogurto be papildomų priedų sudėtis, kurią sudaro baltymai, riebalai, angliavandeniai, mineralai ir vitaminai, daugiau ar mažiau panaši [1, 2].

Teigiama, kad jogurte daugelis maistinių medžiagų, įskaitant baltymus, riboflaviną, vitaminą B₆, B₁₂, kalcį, kalį, cinką ir magnį yra labiau koncentruotos nei piene [3]. Taip pat nustatytas didesnis kalcio biologinis prieinamumas jogurte, vadinasi jogurtą valgančio žmogaus organizmas gali lengvai absorbuoti ir naudoti kalcį, kuris gyvybiškai svarbus kaulams vystyti ir sveikatai palaikyti. Mitybos požiūriu jogurtas plačiai suvokiamas kaip sveikas maistas dėl jame esančių baltymų. Jie yra vieni vertingiausių gyvūninės kilmės baltymų, nes, skirtingai nei mėsos baltymai, juose nėra purino bazių, kurių perteklius neigiamai veikia inkstų funkciją. Žmogaus virškinamajame trakte esančios proteinazės lengviau skaido pieno baltymus nei mėsos, žuvies ar grūdų. Pieno baltymai yra visaverčiai, savo sudėtyje turintys visų organizmui reikiamų nepakeičiamų amino rūgščių, pavyzdžiui, lizino, triptofano, metionino ir kt. Žinoma, kad piene esantys baltymai yra naudingi žmogaus kraujagyslių ir širdies, nervų ir endokrininei, virškinimo bei imuninei sistemai [4, 5].

Žaliame karvių piene yra 3–6 % laktozės [6]. Tai yra svarbus angliavandenis naujagimių neurologiniam vystymuisi, kuris padeda absorbuoti kalcį žarnyne. Nepaisant laktozės kaip maistinės medžiagos svarbos, ji taip pat gali būti atsakinga už sutrikimus, atsirandančius dėl laktozės netoleravimo. Tai susiję su nepakankamu β-galaktozidazės fermento, atsakingo už laktozės hidrolizę, kiekiu ir (arba) neefektyviu aktyvumu žmogaus plonajame žarnyne. Žmonės, kurie netoleruoja laktozės, susiduria su virškinamojo trakto simptomais: pilvo skausmas, vidurių pūtimas ir viduriavimas [7]. Pieno fermentavimas į jogurtą yra vienas iš technologinių būdų sumažinti pieno laktozės kiekį. Pienarūgštės bakterijos *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* jogurto rauginimo metu suskaido didelę dalį laktozės į pieno rūgštį, o patekusios į šeimininko organizmą sugeba išskirti β-galaktozidazės fermentą, kuris pagerina maistinių medžiagų virškinimą žarnyne. Tokio pieno produkto maistinės savybės pagerina žmogaus, netoleruojančio laktozės, angliavandenių absorbciją virškinimo trakte [8, 2, 9].

Mokslinėje literatūroje galima rasti nemažai duomenų, susijusių su jogurto funkcinių savybių tobulinimu į jį pridendant probiotinių *Bifidobacterium* ir *Lactobacillus* bakterijų. Teigiama, kad jogurtai, kurių sudėtyje yra probiotikų, teikia naudos sveikatai. Pavyzdžiui, patekę į virškinimo traktą pagerina laktozės toleravimą ir virškinimą, žarnyno mikrobu pusiausvyrą, veikia kaip prevencija patogeninių bakterijų sukeltam viduriavimui, stimuliuoja gleivinės imuninę sistemą ir t. t. [10]. Probiotikai taip pat turi slopinamąjį poveikį maisto patogenams ir gebėjimą kontroliuoti žarnyno infekcijas gaminant slopinančias antimikrobines medžiagas, tokias kaip organinės rūgštys, vandenilio peroksidas, dekonjuguotos tulžies rūgštys ar bakteriocinai [11]. Tačiau reglamente ES Nr. 432/2012 leidžiama vartoti vienintelį teiginį apie jogurto sveikatingumą: „gyvos kultūros jogurte ar raugintame piene gerina produkte esančios laktozės virškinimą asmenims, kurie sunkiau virškina laktozę“. Norint vartoti tokį teiginį, 1 g jogurto turėtų būti bent 10⁸ kolonijas sudarančių vienetų gyvų raugo

mikroorganizmų (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ir *Streptococcus thermophilus*) [12]. Dažniausiai dėl šios plačiai iširtos jogurto funkcinės savybės, fermentuotas pieno produktas tampa paklausesnis ir patrauklesnis vartotojui nei kiti pieno produktai [1].

Pasaulio pieno produktų rinkoje pastebimas domėjimasis funkciniais maisto produktais, kuriuose yra technologiškai sukurtų naujų ingredientų, didinančių produkto maistinę vertę ir teigiamai veikiančių sveikatą. Natūralių augalinių priedų, turinčių teigiamą poveikį vartotojų sveikatai, panaudojimas jogurto technologijoje daro produktą funkcionalių. Pavyzdžiui, tradicinio jogurto gamyboje yra tendencija įdėti vaisių uogų priedus – džemus, sultis, ekstraktus ar džiovintus vaisių uogų gabaliukus. Juose yra angliavandenių, maistinių skaidulų, vitaminų, mineralų ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų: antocianinų, karotinoidų, procianidinų ir flavonoidų, junginių, gerinančių žmogaus virškinimą, širdies ir kraujagyslių veiklą bei emocinę būseną [4, 13, 14].

Iš jogurto gamyboje naudojamų vaisių uogų priedų išsiskiria vaisių uogų ekstraktai. Dėl šiuose ekstraktuose esančių polifenolinių junginių teigiamo poveikio sveikatai [15, 16], jų papildomas įdėjimas į fenolinių junginių neturintį jogurtą yra labai skatinamas tiek gamintojų, tiek vartotojų [17]. Tačiau daugelis ekstraktuose esančių biologiškai aktyvių junginių yra nestabilūs ir greitai skyla jogurto gamybos bei laikymo metu, dėl ko prarandamas jų biologinis aktyvumas. Kita ekstraktų neigiama savybė – jų nepageidaujamos juslinės savybės. Šios vaisių uogų ekstraktų savybės bei ekstraktų panaudojimo jogurto gamyboje galimybės plačiai tiriamos pastaraisiais metais.

1.2. Vaisių uogų ekstraktų technologinės-funkcinės savybės pieno sistemose

Jogurtą praturtinant įvairių veiklių medžiagų turinčiais vaisių uogų ekstraktais, reikia žinoti apie šių produktų technologines-funkcines savybes bei biologinį aktyvumą. Ne mažiau svarbu įvertinti ir šių produktų galimą sąveiką su piene esančiomis medžiagomis.

Per pastaruosius 10 metų buvo tiriami su įvairiais augalų ekstraktais pagaminti jogurtai ir rauginti pieno gėrimai. Ramos'as ir kt. [18] į raugintą pieną įdėjo liofilizuoto gvazdikėlių vandeninio ekstrakto ir nustatė, kad produkte gerokai padidėjo bendras fenolinių junginių kiekis, o jo antioksidacinis aktyvumas ir juslinis priimtumas pagerėjo. Panašiai Liu'as [19], Gaglio'as ir kt. [20] atliko tyrimus, kurių metu jogurtą praturtino arbatos *Fuzhuan* ir šafrano vandeniniais ekstraktais. Mokslininkai nustatė, kad didėjančios bioaktyvių vandeninių ekstraktų koncentracijos padidino jogurto antioksidacinį aktyvumą. Publikuoti moksliniai straipsniai apie jogurto, praturtinto juodųjų serbentų ir obuolių [21], vynuogių sėklų [22], *Hibiscus sabdariffa* [23] ekstraktais, savybes. Nustatyta, kad augaliniiais ekstraktais praturtintas jogurtas, pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu [24, 25] ir didesniu pieno rūgšties bakterijų gyvybingumu produkte [26].

Be galimos naudos vartotojų sveikatai, jogurto tekstūros savybės vaidina labai svarbų vaidmenį vertinant produktą. Keli tyrimai parodė, kad augalų ekstraktai gali turėti teigiamos įtakos jogurto tekstūros savybėms [17, 27] ir padidinti produkto stabilumą [28].

Analogiškus rezultatus gavo mokslininkai tyrinėję sūrį, praturtintą *Arbutus unedo* L. vaisių ekstraktu, t. y. augalinis priedas turėjo įtakos tvirtesnei ir elastingesnei sūrio tekstūrai, taip pat padidino produkto išėigą [29]. Yra keletas tyrimų, kuriuose analizuojama granatų žievės ekstrakto ir pasiflorų vaisių kaip biologinio konservanto įtaka atitinkamai lipidų oksidacijos stabilumui ir galima alternatyva mikrobu populiacijos slopinimui sūryje [30, 31].

Daugelyje prieš tai aptartuose tyrimuose buvo nustatyta, kad augalų ekstraktų įtaka jogurto savybėms buvo nulemta sąveikos tarp ekstrakto esančių fenolinių junginių ir pieno baltymų. Todėl toliau bus aptarta šios sąveikos mechanizmai bei veiksniai, galintys turėti įtakos fenolinių junginių ir pieno baltymų kompleksui susidaryti.

1.3. Vaisių uogų fenolinių junginių sąveika su pieno baltymais

Žinoma, kad kompleksams susidaryti tarp fenolinių junginių ir baltymų molekulių turi įtakos daug veiksnių. Tarp jų yra aplinkos sąlygos – temperatūra, pH, druskos koncentracija ir tam tikrų reagentų pridėjimas. Tačiau remiantis literatūros šaltiniais galima teigti, kad pieno baltymų ir fenolinių junginių struktūros yra pagrindiniai veiksniai lemiantys šių bioaktyviųjų junginių kompleksų sudarymą [32].

1.3.1. Pieno baltymų struktūros įtaka

Pieno baltymus sudaro du pagrindiniai komponentai: kazeinas ir išrūgų baltymai. Galvijų piene yra keturi pagrindiniai kazeino tipai (α_{s1} -, α_{s2} - β -, κ -), kurie skiriasi aminorūgščių sudėtimi, funkcinėmis savybėmis ir genetinėmis variacijomis, tačiau yra panašaus dydžio, molekulinės masės ir grynojo neigiamo krūvio [33, 34]. α_{s1} -kazeinas, α_{s2} -kazeinas ir β -kazeinas yra fosfoproteinai ir juos galima atskirti kalciui jungiantis prie jų serino-fosfato liekanų. κ -kazeinas yra glikoproteinas, kuris turi dvi cisteino liekanas, sudaro tarpmolekulinius disulfidinius ryšius ir daro įtaką kazeino micelių stabilizavimui piene. Beje, kazeino micelę sudaro submicelės, sujungtos hidrofobine sąveika, vandeniliniu ryšiu ir kalcio-fosfato tilteliais. Pieno išrūgų baltymus sudaro globulinės struktūros α -lakoalbuminas, β -laktoglobulinas, imunoglobulinai ir galvijų serumo albuminas (BSA). Išrūgų baltymuose yra daug sieros turinčių aminorūgščių, besijungiančių disulfidiniu ryšiu. Dėl šios priežasties baltymai yra kompaktiškos sferinės formos [35, 36].

Mokslinėje literatūroje teigiama, kad pieno baltymų konformacija yra ypač svarbi susidarant baltymų-fenolių kompleksui. Yildirim-Elikoglu'as ir kt. [35] nustatė, kad mažiau struktūrizuotų baltymų sąveika su fenoliniais junginiais stipresnė nei struktūrizuotų globulinių baltymų, nes pastarųjų struktūra lemia mažesnę aminorūgščių liekanų prieinamumą [37]. Nagy'as ir kt. [38] nustatė, kad BSA surišo daugiau fenolinių junginių nei nugriebto pieno baltymai ar β -laktoglobulinas. Nors BSA yra globulinis baltymas, tačiau jo molekulėje yra specifinės fenolių junginių prisijungimo vietos. BSA molekulės paviršiuje yra hidrofobines grupes turinti aminorūgštis Trp134 ir Trp213. Būtent šios hidrofobinės grupės yra epikatechino ir katechino jungimosi vietos. Be to, prolino kiekis baltymų molekulės paviršiuje lemia baltymų gebėjimą prisijungti prie fenolių [39, 35]. Yra duomenų, kad fenoliniai junginiai prisijungė ir prie kitų aminorūgščių liekanų, tokių kaip fenilalaninas, histidinas, tirozinas ir argininas [40].

Atlikta nemažai tyrimų siekiant nustatyti skirtingų pieno baltymų frakcijų įtaką kompleksui susidarymui su polifenoliais. β -laktoglobulinas yra gausiausias išrūgų baltymų komponentas, susidedantis iš dviejų α -spiralių ir aštuonių antiparalelių β -lakštų, kurie sudaro taurelės formos β -statinės struktūrą [41]. Jis susideda iš laisvojo tiolio ir dviejų disulfidinių jungčių. Žinoma, kad β -laktoglobulinas, esant neutraliam pH, yra dimero būsenos ir sudaro tirpius ar netirpius agregatus dėl sulfhidril-disulfido sąveikos, kai denatūruoja 75–80 °C temperatūroje [42]. Manoma, kad β -laktoglobulinas turi tris ligando prijungimo vietas: baltymo išorinis paviršius šalia Trp19-Arg124, vidinė β -statinės ertmė ir paviršiau hidrofobinė kišenė tarp α -spiralės ir β -statinės [35]. Autorių [43] gauti prieštaringi tyrimų rezultatai rodo, kad fenolinis junginys naringeninas jungėsi išorinėje β -

laktoglobulino paviršiaus vietoje su trimis vandenilio ryšiais, nepaveikdamas antrinės baltymo struktūros. Dimero formos β -laktoglobulino (pH 7,3) jungimosi vieta yra dviejų monomerų sąsajoje. Esant rūgštiniam pH 2–3, β -laktoglobulinas įgauna monomerinę struktūrą dėl didelio elektrostatinio atostūmio tarp dviejų dimero subvienetų. Kompleksuojantis baltymams su fenoliniais junginiais pakinta baltymo antrinė struktūra, o tai rodo, kad molekulinė sąveika vyksta monomero ir dimero formose. Nustatyta, kad sąveika su fenoliniais junginiais buvo stipresnė, kai β -laktoglobulinas buvo monomero formos. Tokia baltymo molekulė su ferulo rūgštimi jungiasi per taurelės formos β -statinės ertmę. Yra keletą išorinių vietų, kuriose β -laktoglobulinas jungiasi su hidrofilinėmis ir amfifilinėmis molekulėmis, tačiau jo vidinė ertmė stabilizuojama vandenilio ryšiais ir π -alkilo sąveika laikoma pagrindine hidrofobinių molekulių, pvz., fenolių, jungimosi vieta [44].

α -laktoalbuminai yra mažesni ir ne tokie hidrofobiški baltymai nei β -laktoglobulinas ir BSA, todėl tai gali paskatinti pastarųjų baltymų stipresnę sąveiką su fenoliniais junginiais [45]. Mokslinėje literatūroje yra mažai tyrimų, kuriuose analizuojama α -laktoalbuminų sąveika su fenoliais, tačiau yra duomenų, kad šis baltymas, jungiantis metalo katijonus pieno sistemoje, lygiai taip pat sąveikauja su skirtingais flavonoidais, pvz., kurkuminu, resveratroliu, genisteinu ir kaepferoliu [46]. Be to, tokia sąveika nepakeičia α -laktoalbumino struktūros [45]. Šis išrūgų baltymas sudarytas iš dviejų pagrindinių domenų (α -spiralių ir β -lakštų), sujungtų per dvi disulfidines jungtis. Tarp šių domenų esančioje hidrofobinėje kišenėje prisijungęs epigalokatechin-3-gelatas, žaliosios arbatos katechinas parodė didžiausią rišimosi energijos vertę [46, 47].

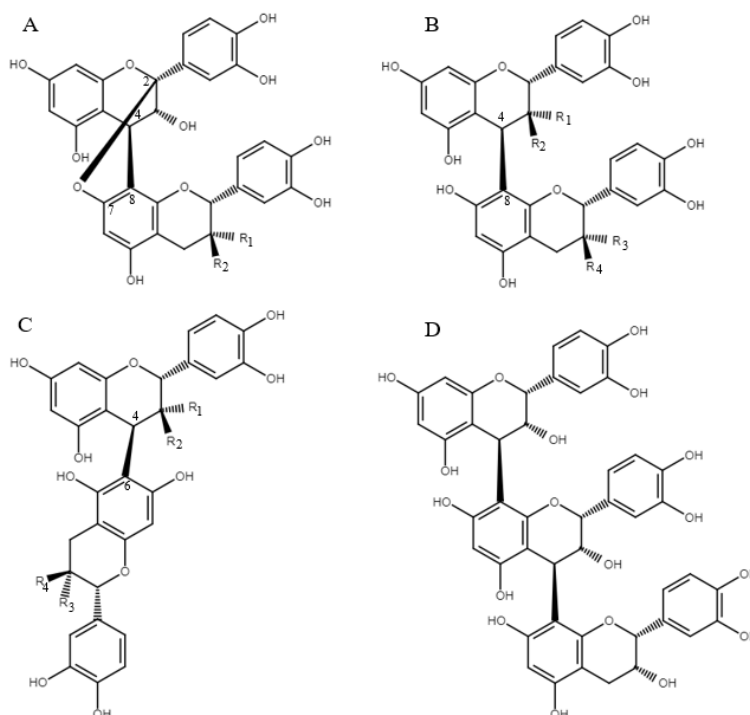
Pasak Li'as ir kt. [48] β -kazeino ir fenolinių rūgščių jungimosi būdai ir sąveikos stiprumas anksčiau nebuvo tirti, todėl šio komplekso susidarymas tebėra menkai suprantamas. Remiantis šių mokslininkų tyrimais galima teigti, kad prolino kiekis baltymo paviršiuje turi įtakos baltymų-fenolių kompleksui susidaryti. Todėl α -kazeinas, kurio struktūroje yra mažiau prolino nei β -kazeino struktūroje, sudarė silpnesnį ryšį su fenoliniais junginiais [39]. Autoriai paskelbė, kad pieno baltymai pagal sąryšio su fenoliniais junginiais stiprumą išsidėsto tokia tvarka: β -kazeinas > α -kazeinas > β -laktoglobulinas. Fenoliniai junginiai, kompleksuodami su baltymais, gali pakeisti antrinę baltymo konformaciją, sumažindami α -spiralių ir β -lakštų struktūras α - ir β -kazeinuose ir taip dalinai destabilizuodami baltymų struktūrą [49]. Ankstesniuose tyrimuose buvo nustatyta, kad aromatinių amino rūgščių ir histidino liekanos taip pat gali būti fenolinių junginių prisijungimo vietos baltymų molekulėse [40].

1.3.2. Fenolinių junginių struktūros įtaka

Fenoliniai junginiai yra didelė grupė biologiškai aktyvių medžiagų, antriniai augalų metabolitai, atsakingi už augalo augimo, vystymosi ir apsaugines funkcijas bei jo juslines savybes, dalyvaujantys ląsteliniuose ir tarpląsteliniuose fiziologiniuose procesuose [50, 51]. Tai komponentai, turintys vieną ar daugiau hidroksilo (-OH) ar metoksi (-OCH₃) grupių tiesiogiai prijungtų prie vieno (pvz., fenolio rūgštys, fenoliai) ar kelių (pvz., polifenoliai) aromatinių žiedų [48]. Žinoma, kad šie junginiai pasižymi antioksidaciniu aktyvumu ir turi teigiamą poveikį įvairių sveikatos sutrikimų, tokių kaip širdies ir kraujagyslių ligos, vėžys ar osteoporozės, prevencijai. Kadangi žmogaus organizmas nesintetina fenolinių junginių, jie turi būti gaunami su maisto produktais ar gėrimais, pvz., kava [52], arbata [47], vynu [53], kakava [54], javų grūdais, vaisiais, daržovėmis ar uogomis [55]. Šie biologiškai aktyvūs junginiai pagal molekulės struktūrą paprastai skirstomi į pogrupius, pvz., fenolio rūgštys, flavonoidai, stilbenai, kumarinai, lignanai ir taninai [55].

Maisto produktuose fenoliniai junginiai gali jungtis su baltymais ir sudaryti baltymų-fenolių kompleksą, kurio ryšio stiprumas priklauso ne tik nuo baltymų, bet ir nuo fitocheminių medžiagų tipo, kuris skiriasi molekuline mase, hidrofobiškumu, molekulinio lankstumu, metilinimo, hidroksilinimo ir glikozilinimo laipsniu [46]. Chanphai'as ir kt. [56] patvirtino, kad kuo didesnė fenolinio junginio molekulinė masė tuo stabilesnis polifenolių-baltymų kompleksas susidaro. Pavyzdžiui, epigalokatechino galato kompleksas su baltymais buvo stabilesnis nei katechino, kai šių junginių molekulinė masė buvo atitinkamai 458,372 g/mol ir 290,26 g/mol. Be to fenolinio junginio sudėtis ir hidroksilo grupių skaičius molekulės struktūroje turėjo įtakos kafeoilchino rūgšties esterio antioksidaciniam aktyvumui t. y. kuo didesnė molekulinė masė tuo stipresnės antioksidacinės savybės [42].

Ma'as ir kt. [57] aprašė sąveikos mechanizmą tarp β -kazeino ir penkių oligomerinių proantocianidinų, tipų: B1, B2, B3, A2 ir C1. Proantocianidinus kaip oligomeras sudaro vienas po kito einantys flavon-3-olio monomerai. A tipo struktūra yra sudėtingesnė ir neįprasta, nes ją sudaro C–C ryšiai ir ryšiai tarp flavonoidų, t. y. vieno flavon-3-olio monomero C₂ ir C₄ atomai atitinkamai jungiasi per deguonį (eterinį ryšį) prie kito monomero C₇ ir prie C₆ ar C₈ atomų (žr. 1 pav. A). B tipo struktūra vadinama tada, kai du monomerai jungiasi per C₄–C₆ ar C₄–C₈ atomus (žr. 1 pav. B ir C) ir C tipo struktūra – trimeras (žr. 1 pav. D). Tyrimų rezultatai parodė, kad pagal sąveikos tarp baltymų ir skirtingų proantocianidinų struktūrų stiprumą, proantocianidiniai išsidėstė tokia tvarka: B1 > B2 > B3 > C1 > A2. A ir B tipo dimerų sąveika su baltymais neturėjo didelio reikšmingo skirtumo lyginant su monomeriniais flavon-3-oliais [57, 58].



1 pav. Proantocianidinų cheminė struktūra: (A) A tipo dimeras sujungtas C₄→C₈ ir C₂–O–C₇ ryšiu ryšiu; (B) B tipo dimeras sujungtas C₄→C₈ ryšiu; (C) B tipo dimeras sujungtas C₄→C₆ ryšiu; (D) trimeras C1

Proantocianidiniai priklausomai nuo flavano branduolio hidroksilinimo schemos skirstomi į procianidinus, prodelfinidinus, propalergonifidinus ir kt. [59]. Proantocianidinų polimerizacijos laipsnis svarbus jų sąveikai su baltymais. Mokslininkai analizavo skirtingo polimerizacijos laipsnio procianidinų sąveiką su α -laktoalbuminu esant pH 5,5 ir nustatė, kad procianidinų, kurių

polimerizacijos laipsnis $n = 5,5$, sąveika su baltymais buvo vidutinio stiprumo. Tuo tarpu proantocianidinų, kurių $n = 7,4$ sąveika su baltymais buvo stipri (n – vidutinis subvienetų skaičius viename oligomere) [46, 58].

Al-Hanish'as ir kt. [47] nustatė, kad galoilo funkcinės grupės buvimas epigalokatechin-3-galato struktūroje sustiprina šio junginio prisijungimo prie išrūgų baltymų ryšį. Panašūs rezultatai aprašyti ankstesniuose Soares'o [60], Skrt'o [61], Kanakis'o ir kt. [62] tyrimuose.

1.3.3. Baltymų-fenolių junginių kompleksų susidarymo mechanizmas ir jungtys

Mokslinėje literatūroje jau kelis dešimtmečius publikuojami duomenys apie baltymų-fenolinių junginių sąveiką ir kompleksų tarp šių junginių susidarymo mechanizmus. Žinoma, kad fenolinių junginiai sąveika su baltymais gali būti kovalentinė ir / ar nekovalentinė, ir tai lemia grįžtamąjį ar negrįžtamąjį junginių kompleksavimą [42]. Nekovalentinė sąveika, tokia kaip vandenilinis ryšys, hidrofobinė ir joninė sąveika bei van der Valso trauka yra susijusi su grįžtamu baltymų ir fenolinių junginių reagavimu [50]. Fenolio grupės žinomos kaip puikūs vandenilio donoriai, kurie gali formuoti vandenilio ryšius su baltymų C=O grupėmis. Taip pat vandenilio ryšiai susidaro sąveikaujant polifenolių OH grupėms su deguonimi ar azotu, o ypač hidroksilo (-OH) ir amino (-NH₂) grupėmis baltymų molekulėse. Ferulo rūgšties hidroksilo grupės gali reaguoti su pagrindinės BSA polipeptidinės grandinės C, O atomais ir NH grupe formuodami stiprų vandenilinį ryšį. Hidrofobinė sąveika taip pat dalyvauja konjuguojant baltymus ir polifenolius, kur hidrofobinės aminorūgštys (leucinas, izoleucinas, glicinas, metioninas, alaninas, fenilalaninas, valinas, tirozinas, cisteinas ir triptofanas) sąveikauja su nepoliniais aromatiniais polifenolių žiedais. Kitos sąveikos, tokios kaip joninės jungtys, gali vaidinti nedidelį vaidmenį baltymų ir polifenolių sąveikoje, kai teigiamai įkrautos baltymų grupės, tokios kaip lizino ϵ -amino grupės, reaguoja su neigiamai įkrautomis polifenolių hidroksilo grupėmis [39]. Nustatyta, kad hidrofobinės jėgos dominavo fenolio rūgščių ir β -laktoglobulino sąveikoje, o vandenilinis ryšys ir van der Valso jėga buvo pagrindinės jėgos palaikančios miricetino ir baicalino kompleksus su β -laktoglobuliniu [63, 64]. Zahao'as ir kt. [65] tyrimas įrodė, kad taninai ir galo rūgštis sąveikauja su kazeinu formuodami kompleksus hidrofobinės (van der Valso jėgos arba vandenilio jungimasis) ir hidrofobinės sąveikos būdu. Kovalentinio ryšio tarp fenolinių junginių ir baltymų susidarymas gali būti katalizuojamas fermentu oksidaze. Taip pat gali būti inicijuojamas terminiu, oksidaciniu būdu arba šarminėje aplinkoje susidariusių o-chinonų reakcija su nukleofiliniais radikalais (metioninu, lizinu, triptofanu, cisteinu ir tirozinu) baltymų šoninėse grandinėse [42, 66, 67]. Taigi, tarp baltymo ir fenolio molekulių gali būti suformuotas kovalentinis kryžminis C-N ar C-S ryšys [39]. Kovalentinė sąveika yra labiau pageidautina, nes ji sukuria stabilesnius kovalentinius kompleksus. Nustatyta, kad kovalentiškai sujungto zeino-epigalokatechino galato kompleksų šiluminis stabilumas ir antioksidacinis aktyvumas pagerėjo lyginant su nekovalentiškai sujungtu kompleksu [68]. Taip pat, mokslininkai teigė, kad kovalentinė fenolių-baltymų sąveika gali turėti įtakos jų biologiniam prieinamumui [67].

1.3.4. Technologinių veiksnių įtaka

Turkijos mokslininkai atliko pieno baltymų ir polifenolinių junginių sąveikos analizę bei aptarė aplinkos veiksnių įtaką kompleksavimo reakcijoms. Nustatyta, kad baltymų-polifenolių kompleksų susidarymas priklauso nuo technologinių veiksnių, tokių kaip pH, joninė jėga ir temperatūra [35].

Temperatūra gali turėti įtakos baltymų-polifenolių sąveikai, dėl sukeltų pavienių struktūrinių pokyčių baltymų molekulėse bei poveikio ligandų tirpumui. Prigent'as ir kt. [69] atliko tyrimą apie

temperatūros poveikį nekovalentinio monomerinio fenolinio junginio chlorogeno rūgšties sąveikai su galvijų serumo albuminiais ir nustatė, kad chlorogeninės rūgšties kiekis sumažėjo apie 4 kartus didinant temperatūrą nuo 5 °C iki 60 °C. Jie taip pat nustatė, kad įvykus galvijų serumo albuminų terminiai denatūracijai, buvo prijungta dvigubai mažiau chlorogeninės rūgšties lyginant su natyviniais albuminiais. O α -laktoalbumino terminė denatūracija neturėjo jokio poveikio šio baltymo sąveikai su polifenoliais [69]. Naujesnėje mokslinėje literatūroje skelbiami tyrimų rezultatai yra priešingi, t. y. (-)-epigalokatechino galato adsorbcija ant galvijų serumo albumino paviršiaus stiprėja didinant temperatūrą nuo 25 °C iki 35 °C [70]. Autoriai [71] nustatė optimaliausias sąlygas β -laktoglobulino sąveikai su (-)-epigalokatechin-3-gelatu. Išmatuotas statistiškai reikšmingas asociacijos konstantos skirtumas, kai sužadavimo bangos ilgis 280 nm, lyginat fenolinių junginių sąveiką su termiškai apdorotais baltymais (75–85 °C, 20 min.) ir baltymais kambario temperatūroje. Tokiame bangos ilgyje sužadintas baltymas buvo žymiai didesnis, o tai rodo geresnę (-)-epigalokatechin-3-gelato prisijungimą prie denatūruoto baltymo. Pakeitus sužadavimo bangos ilgį į 295 nm, tyrimo rezultatai tarp denatūruoto ir natyvinio baltymo statistiškai nereikšmingi [71]. Turkijos mokslininkai atliko analizę, kurioje aptarė kvercetino ir chlorogeno rūgšties sąveikos sumažėjimą su termiškai denatūruotais galvijų serumo baltymais. Jie taip pat padarė išvadą, kad denatūruotas α -laktoalbuminas surišo daugiau chlorogeno rūgšties nei termiškai nepaveikti baltymai [35]. Prieštaringi įvairių mokslininkų rezultatai rodo, kad nėra lengva priimti galutinę išvadą apie temperatūros įtaką baltymų-polifenolių sąveikai, dėl didelės polifenolių ir baltymų struktūros įvairovės maisto matricose [72]. Todėl kuriant daug polifenolinių junginių turinčius pieno produktus reikėtų atsižvelgti į žalio pieno šiluminį apdorojimą bei norimo gauti galutinio produkto funkcines savybes.

Baltymų-polifenolių kompleksai gali būti formuojami plačiame pH intervale nuo 4 iki 10 dėl kovalentinės arba nekovalentinės sąveikos tarp šių junginių [73]. Vienas iš mokslinėje spaudoje paskelbtų tyrimų buvo apie pH pokyčius, atsirandančius žmogaus virškinimo trakte (1,2–2,5 skrandyje ir 7,2 žarnyne bei seilėse) ir jų įtaką polifenolinių junginių bei baltymų sąveikos stiprumui. Polifenoliniais junginiais turtingi juodosios, žaliosios arbatos, kavos ir kakavos ekstraktai, nepriklausomai nuo cheminės sudėties, apsaugojo β -laktoglobulino antrinę struktūrą nuo hidrolizės pepsino fermentu, esant rūgštiniam pH 1,2. Tuo tarpu esant neutraliam pH nustatyti baltymo struktūros pokyčiai iš β -lakštų ir α -spirales dėl baltymo sąveikos su polifenoliniais junginiais [74]. Kitų tyrėjų duomenimis pH pokytis nuo 3 iki 8 ir joninė jėga neturėjo didelės įtakos chlorogeninės rūgšties sąveikai su BSA ir α -laktoalbuminiais [69]. Frazier'as ir kt. [35, 75] taip pat nenustatė reikšmingos pH įtakos (-)-epikatechino ir BSA sąveikos stiprumui. Dar vienoje publikacijoje buvo teigiama, kad BSA jungiantis su tanino rūgštimi stipresnė sąveika tarp junginių buvo esant pH 4,9 nei pH 7,8 [76]. Ferulinės ir chlorogeninės rūgšties sąveikos su BSA stiprumas sumažėjo apie 4 kartus didinant pH nuo 4,8 iki 7,0, priešingai nei baltymo ir galo rūgšties komplekso, kurio disociacijos konstanta padidėjo apie 6 kartus mažinant pH nuo 6,0 iki 3,5. Kitame šių autorių eksperimente buvo tiriama ferulinės rūgšties ir išrūgų baltymų komplekso susidarymas ir nustatyta, kad sąveikos stiprumas reikšmingai didesnis esant rūgštinei terpei lyginant su neutralia terpe [77]. Apibendrinant, galima teigti, kad polifenoliniai junginiai turi didesnę gebėjimą surišti baltymus į stabilų kompleksą, kai baltymai yra netoli izoelektrinio taško, išskyrus tuos atvejus, jei sąveika tarp junginių būtų elektrostatinė [35].

1.4. Vaisių uogų fenolinių junginių sąveikos su pieno baltymais įtaka jogurto charakteristikoms

Maisto mokslo ir technologijų požiūriu, polifenoliai yra svarbūs junginiai, kurie yra atsakingi už maisto produktų skonį, spalvą ir antioksidacines savybes ir daro įtaką maisto produktų kokybei ir stabilumui. Daugybė tyrimų atskleidžia, kad pieno baltymų ir fenolinių junginių sąveika gali pakeisti baltymų struktūrą, virškinamumą ir funkcines savybes bei biologinį prieinamumą [35].

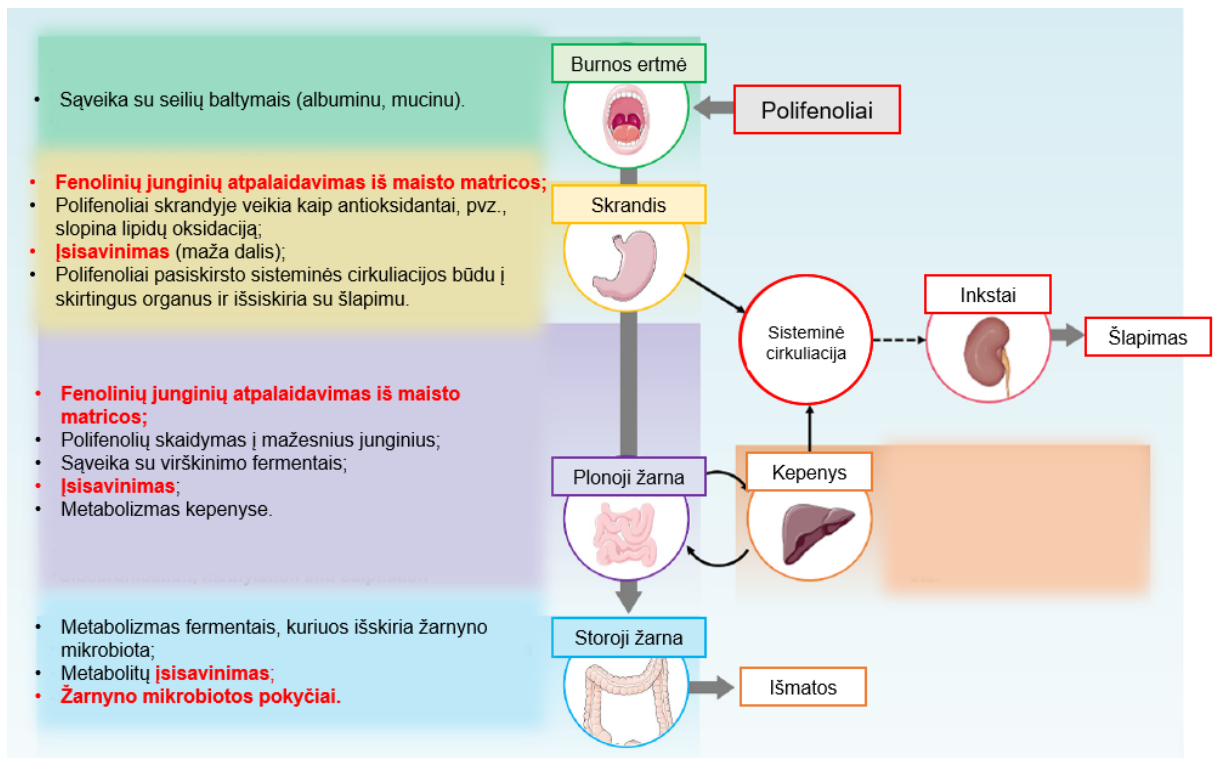
1.4.1. Fenolinių junginių sąveikos su pieno baltymais įtaka fizikinėms cheminėms savybėms

Dažniausiai pasitaikantys fermentuotų pieno produktų technologiniai trūkumai yra mažas klampumas ir padidėjusi sinerezė (išrūgų išsiskyrimas) dėl sumažėjusio struktūros tvirtumo. Gamintojai siekia užtikrinti tinkamas jogurto fizikines-chemines savybes, todėl į produktą prideda tirštiklių, stabilizatorių, pieno ingredientų ar padidina bendrą sausųjų medžiagų kiekį. Tradiciniame jogurte rūgštinis pieno baltymų gelis stabilizuojamas gausiais nekovalentiais ryšiais. Naujų kovalentinių ryšių susidarymas, pridėjus fenolinių junginių turinčių ingredientų, gali pagerinti produkto reologines ir juslines savybes. Yra duomenų, kad mažo riebumo arba liesas jogurtas, praturtintas fenoliniais junginiais pasižymėjo mažesne sinereze ir kietumu, tačiau didesniu elastingumu ir tamprumu lyginant su jogurtu be priedų [78, 79]. Panašius rezultatus publikavo ir kiti mokslininkai [50], kurie nustatė, kad žaliosios arbatos ir žalios kavos polifenoliniai junginiai gali sąveikauti su kazeino micelėmis jogurte. Ši sąveika skatino stipresnio kazeino tinklo susidarymą ir stabilizavo jogurto struktūrą, padidindama erdvinės struktūros tankumą ir sumažindama sinerezės greitį esant tam tikroms fenolinių junginių priedo koncentracijoms [50]. Bertolino'as ir kt. [80] paneigė lazdyno riešutų odelėse esančių fenolinių junginių įtaką jogurto sinerezės sumažėjimui laikymo metu. Mokslininkai nustatė, kad didinant riešutų odelių 0,5 mm dalelių frakcijų kiekį nuo 3 % iki 6 %, sinerezė proporcingai didėjo. Keli tyrimai parodė, kad fenolinių junginių koncentracija jogurte susijusi su statistiškai reikšmingu titruojamo rūgštingumo padidėjimu produkto laikymo metu [79]. Apibendrinant galima teigti, kad skirtinga fenolinių junginių įtaka jogurto cheminėms-fizikinėms savybėms gali būti nulemta tyrimams naudotų fenolinių junginių cheminės struktūros skirtumais ir skirtingomis jų koncentracijomis [50].

1.4.2. Fenolinių junginių sąveikos su pieno baltymais įtaka biologiniam prieinamumui ir virškinamumui

Fenolinių junginių-baltymų kompleksų susidarymas maisto sistemose gali turėti įtakos abiejų junginių stabilumui virškinimo metu bei jų biologiniam prieinamumui. Manoma, kad *in vivo* tyrimai yra būtini siekiant sužinoti šio komplekso susidarymo poveikį žmogaus organizmui [78].

Laisvų, su kitais maisto komponentais nesukompleksuotų, fenolių vartojimas ir įsisavinimas žmogaus organizme išsamiai aprašytas Li'as ir kt. [81] moksliniame straipsnyje. Fenoliniai junginiai į organizmą patenka per burną ir pereina per virškinamąjį traktą, kur vyksta įvairūs jų pokyčiai bei įsisavinimas. Fenolinių junginių asimiliacija ir metabolizmas žmogaus virškinamajame trakte pavaizduota 2 paveiksle.



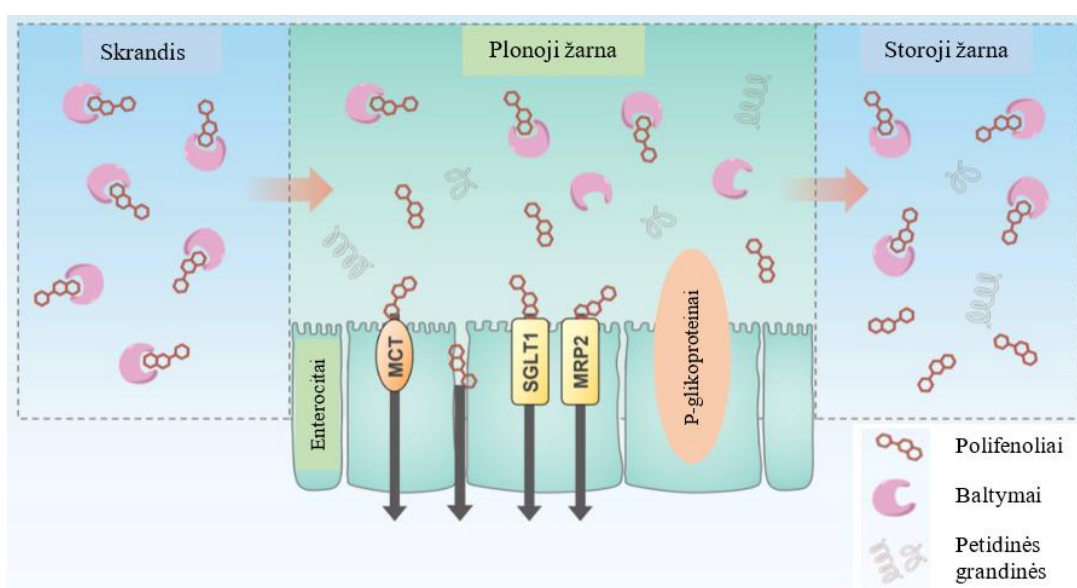
2 pav. Fenolinių junginių asimiliacija ir metabolizmas žmogaus virškinamajame trakte [81]

Maža dalis polifenolių burnos ertmėje gali sudaryti sąveiką su seilių baltymais, t. y. albuminu ir mucinu, dėl ko jaučiamas kartus fitocheminių junginių skonis. Šį teiginį patvirtino mokslininkai, analizavę žaliojoje arbatoje esančius fenolinius junginius, ir nustatė, kad seilėse esanti katechino esterazė katalizavo (-)-epigalokatechino galatą į (-)-epigalokatechiną, ir abu šie junginiai buvo absorbuojami per burnos gleivinę [82]. Taip pat mokslininkai įrodė, kad rutinas, katechinas, galo rūgštis, kvercetas ir kt. sąveikavo su seilių mucinu ir albuminu dėl ko pagerėjo šių fenolinių junginių tirpumas seilėse [83]. Fenolinių junginių atpalaidavimas iš maisto matricos ir įsisavinimas prasideda skrandyje. Pavyzdžiui, dalis fenolinių rūgščių gali būti įsisavinamos skrandyje, dalyvaujant monokarboksirūgšties pernešėjui (MCT) [84] ar pasyvios difuzijos būdu per epitelį [85]. Pasak Li'o ir kt. [81] virškinimo metu dažnai vyksta polifenolių skaidymasis, transformacija ar net oksidacija dėl ko gali sumažėti jų antioksidacinis aktyvumas. Buvo įrodyta, kad kavos fenoliniai junginiai slopino lipidų oksidaciją skrandyje [86]. Maža dalis įsisavinusių polifenolių pasiskirsto sisteminės cirkuliacijos būdu į skirtingus organus ir išsiskiria su šlapimu [81]. Tačiau kaip pavaizduota 3 paveiksle, susidaręs polifenolių-baltymų kompleksas apsaugo fenolinius junginius nuo skilimo skrandyje. Liu'as [81], Betz'as ir kt. [87] teigė, kad skrandyje esant rūgštinėms sąlygoms polifenoliai buvo stabilūs.

Aktyvus nepakitusių fenolinių junginių atpalaidavimas iš maisto matricos ar baltymų komplekso, skaidymas į mažesnius junginius ir įsisavinimas vyksta neutralioje plonojo žarnyno terpėje [87]. Mokslininkai teigė, kad veikiant plonojo žarnyno virškinimo fermentams polifenolių-baltymų sąveika gali suirti ir atsiskyrę fenoliniai junginiai pereiti per plonosios žarnos epitelį daugiausiai pasyvios difuzijos būdu. Taip pat kai kurie pernešėjai gali dalyvauti transportuojant fenolinius junginius trans-epiteliniu būdu [81]. Pavyzdžiui, Dang'o ir kt. [88] teigė, kad MCT buvo atsakinga už p-kumaro ir kofeino rūgšties pernašą per plonojo žarnyno epitelį, o natrio-gliukozės kotransporteris 1 (SGLT1), baltymas (MRP2) ir p-glikoproteinas dalyvavo emodino ir krisofanolio pernašoje [89]. Taip pat fenoliniai junginiai gali būti pasisavinami enterocitų ir toliau metabolizuoti

kepenyse, o gauti metabolitai sisteminės cirkuliacijos būdu pasiskirsto į skirtingus organus ir išsiskiria su šlapimu [90]. Tačiau plonosios žarnos sienelė padengta gleivėmis, kurios veikia kaip apsauginis barjeras, todėl polifenolių, kurių molekulinė masė didelė, absorbcija per šį gleivių sluoksnio 400 nm poras yra sudėtinga [91].

Viršutiniame virškinimo trakte neabsorbuoti polifenoliai patenka į storąją žarną, kur vykdomas jų metabolizmas žarnyno mikrobiotos išskirtais fermentais. Fitocheminės medžiagos kartu su baltymais taip pat gali patekti į storąją žarną jei baltymų-polifenolių kompleksas labai stiprus ir fenoliniai junginiai negali atsipalaiduoti plonajame žarnyne. Kaip Xie'as ir kt. [92] teigė, mikrobinės esterazės galėjo hidrolizuoti dikafeoilchinino rūgšties esterio ryšį, kad būtų gauta kofeino ir monokafeoilchinino rūgštis, kurias toliau gali veikti mikrobinė reduktazė. Taip pat mokslininkai teigė, kad žmogaus žarnyno mikroflora gali skirtis, todėl fenolinių junginių metabolizmas ir galutiniai virškinimo produktai gali būti labai skirtingi [93].



3 pav. Fenolinių junginių ir baltymų komplekso stabilumas skrandyje ir atsipalaidavimas žarnyne [81]

Nors stabili polifenolių ir baltymų sąveika maisto produkte pagerina produkto funkcionalumą, padidina jo antioksidacinį aktyvumą, tačiau yra priešaringų nuomonių apie šių junginių biologinį prieinamumą virškinimo metu. Pasak Vital'as ir kt. [78] *Pleurotus ostreatus* grybų vandeniniu ekstraktu praturtintas liesas jogurtas pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu ir polifenolių kiekiu lyginant su jogurtu be ekstrakto. Pieno produktų matrica yra svarbus polifenolių biologinio prieinamumo veiksnys. Nustatyta, kad skysti ir pusiau skysti produktai, tokie kaip pienas ir jogurtas, virškinosi lengviau ir pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu palyginti su sūriu, kietu pieno produktu [94]. Yra duomenų, kad fenoliniais junginiais turtingo cinamono ekstrakto naudojimas jogurto gamyboje lemia didesnę fenolinių junginių kiekį ir radikalų surišimo aktyvumą produkte, lyginant su jogurtu be cinamono ekstrakto. Tačiau šio tyrimo rezultatai parodė, kad cinamono ekstraktu praturtintame jogurte buvo rasta tik 34,7 % fenolinių junginių iš visų esančių cinamono vandeniniame ekstrakto, nes likusi dalis šių junginių buvo surišta su baltymais. Virškinant *in vitro* cinamonu praturtintą jogurtą fenoliniai junginiai atsipalaidavo iš matricos dėl ko virškinimo pabaigoje fenolinių junginių kiekis cinamonu praturtintame jogurte buvo didesnis nei analogiškai suvirškinamame cinamono vandeniniame ekstrakto. Akivaizdu, kad jogurto matrica padidino polifenolių stabilumą ir biologinį prieinamumą virškinamajame trakte [95]. Tačiau mokslinėje

literatūroje galime rasti ir kitokius tyrimų rezultatus. Nustatyta, kad įdėjus į jogurtą fenoliniais junginiais turtingų granatų sulčių miltelių, padidėjo produkto antioksidacinis aktyvumas, tačiau reikšmingų biologinio prieinamumo skirtumų tarp kontrolinio ir praturtinto jogurto nebuvo nustatyta [96].

Mokslinėje literatūroje galima rasti daug informacijos apie įvairių fenolinių junginių svarbą žmogaus mityboje ar maisto produktų juslinių ir fizikinių-cheminių savybių gerinimą, tačiau duomenų apie polifenolių-baltymų virškinamumą konkrečiuose pieno produktuose labai nedaug. Anskčiau aprašyto Pan'o ir kt. [96] tyrimo rezultatai parodė, kad 1–5 % granatų sulčių milteliais praturtinto jogurto baltymų virškinamumas *in vitro* sulėtėja dėl susidariusių sunkiai virškinamų baltymų-fenolinių junginių kompleksų ir virškinimo fermentų slopinimo. Žinoma, kad fenoliniai junginiai, pvz., epigalokatechino galatas, epikatechino galatas, epigalokatechinas ir galo rūgštis, slopina įvairių proteazių, tokių kaip pepsinas, tripsinas, α -chymotripsinas, aktyvumą. Tai gali būti dėl polifenolių ir fermentų sąveikos, kurios metu pasikeičia fermentų molekulinė konfigūracija ir prarandamas katalizinis aktyvumas. Kita vertus, kai kurie tyrimai rodo, kad resveratrolis, žaliosios arbatos epigalokatechino galatas ir kvercetas padidina fermentinį pepsino aktyvumą imituotame virškinimo modelyje, tačiau autoriai nepateikė mechanizmo, kaip stimuliuojamas fermento aktyvumas [94].

Yra duomenų apie atskirų pieno baltymų frakcijų, paveiktų fenoliais, virškinamumą. Nors su fenoliniais junginiais kompleksuotų baltymų hidrolizės laipsnis žarnyno virškinimo fazėje buvo gerokai didesnis nei skrandžio fazėje, tačiau rezultatai rodo, kad polifenoliai virškinimo metu sumažino kazeino-fenolių [65] ir šaltalankių proantocianidinų-BSA kompleksų [97] hidrolizės laipsnį lyginant su ekstraktais nepraturtintu kontroliniu mėginiu. Dėl polifenolių slopinančio poveikio baltymų hidrolizei daroma išvada, kad polifenoliai kompleksuodami su virškinimo fermentais, sumažino jų katalizinį aktyvumą ir dėl to sumažėjo baltymų virškinamumas [65]. Tačiau kiti mokslininkai teigė, kad epigalokatechino galatas turėjo įtakos baltymų struktūros išsivyniojimui taip padidindamas prieinamumą prie peptidinių ryšių dėl ko pagerėjo išrūgų baltymų virškinamumas [98]. Panašiai teigė Zhou'as ir kt. [99], kurie aprašė, kad nekovalentinė baltymų-polifenolių sąveika gali skatinti baltymų struktūrų atsiskleidimą dėl ko virškinimo fermentai gali lengviau prieiti prie jų veikimo vietas.

1.5. Spanguolių ekstraktų technologinės-funkcinės savybės, biologinis aktyvumas ir panaudojimas pieno produktuose

Paprastai didžiųjų (*Vaccinium macrocarpon*) ir mažųjų (*Vaccinium oxycoccos*) spanguolių sudėtyje yra angliavandenių, organinių rūgščių ir fenolio junginių, įskaitant flavon-3-olius, antocianinus, A ir B tipo monomerinius proantocianidinus ir flavonolius [100, 101]. Spanguolių uogos ir jose esantys junginiai turi sveikatą gerinančių savybių, ypač mažinant vėžio, širdies ir kraujagyslių ligų riziką, reguliuojant gliukozės kiekį 2 tipo diabetu sergantiems žmonėms [100]. Laikymo metu uogų juslinės savybės keičiasi ir tampa nebetinkamos tiesiogiai vartoti, todėl didžioji dalis derliaus perdirbama į sultis, uogienes, džemus ar saldintas džiovintas spanguoles. Kasmet spaudžiant sultis susidaro dideli kiekiai kietos frakcijos, sudarytos iš odelių ir sėklų, kuriose gausu fitocheminių ir kitų vertingų maistinių medžiagų.

Atsižvelgiant į šių išspaudų naudą žmonių sveikatai, mokslininkai pradėjo jas tirti ir pritaikyti funkcionaliojo maisto kūrime. Visai neseniai spanguolių išspaudoms pradėta taikyti superkritinis anglies dioksido ir suslėgtų skysčių ekstrakcija siekiant išgauti lipofilines ir fenolio frakcijas [102].

Pastaroji frakcija, kurią didžiaja dalimi sudaro antocianinai ir proantocianidinai, pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu prieš deguonies radikalus. Be to, mokslininkai nustatė spanguolėse esančių polifenolių antimikrobinį poveikį prieš patogenines bakterijas, tokias kaip *Listeria* spp. [103], *Staphylococcus aureus* [100], *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* [104]. Spanguolių sudedamosios dalys, o ypač proantocianidinai, flavonoliai ir hidroksicinaminės rūgštys gali veikti prieš bakterijas trukdant jų adhezijai ir koagregacijai, mažinant bioplėvelių formavimą ir / ar mažinat uždegimą. Proantocianidinių antimikrobines savybės siejamos su jų polimerizacijos laipsniu bei A ir B tipo ryšių skaičiumi. Nustatyta, kad proantocianidinai turintys didesnę polimerizacijos laipsnį, daugiau A jungčių nei B, efektyviau sumažina bakterijų judrumą [105]. Skirtingai nei kai kurių įprastų augalinės kilmės maisto produktų, pvz., vynuogių, granatų, kuriuose yra daug B tipo proantocianidinių, spanguolės išsiskiria tuo, kad turi A tipo jungtis, kurios labai susijusios su antibakterinėmis adhezijos savybėmis [106]. Pagal Europos maisto saugos tarnybą spanguolių ekstraktas yra naujas ir saugus maisto ingredientas, kuris gali būti naudojamas jogurto gamyboje. Šiame reglamente paminėta, kad jogurte spanguolių ekstrakto miltelių turėtų būti 150 mg/porcijoje, kuriuose yra apie 55–60 % proantocianidinių [107].

Nors ekstraktas, pagamintas iš spanguolių išspaudų, atrodo yra perspektyvus funkcinis ingredientas, tačiau jo panaudojimas jogurte dar nebuvo ištirtas. Todėl šio tiriamojo darbo tikslas yra nustatyti, ar su įvairios sudėties spanguolių ekstraktais pagaminto jogurto maistinė vertė netampa mažesnė dėl sulėtėjusio baltymų virškinamumo ir sumažėjusio fenolinių junginių biologinio prieinamumo. Gauti tyrimo rezultatai leis pateikti pieno produktų gamintojams rekomendacijas dėl įvairios sudėties spanguolių ekstraktų galimybės naudoti jogurto gamyboje, siekiant užtikrinti kiek galima didesnę produkto teigiamą įtaką vartotojų sveikatai.

2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos ir reagentai

Lieso pieno milteliai buvo gauti iš *UAB Marijampolės pieno konservai* (Marijampolė, Lietuva). Sudėtis: 34,5 % baltymų, 52,0 % laktozės, 0,8 % riebalų, 8,7 % pelenu, 4,0 % vandens.

Vynuogių sėklų ekstraktas. Vynmedžio *Vitis vinifera* uogų ekstraktas buvo gautas iš *DRT the Best of Nature* (Vielle-Saint-Girons, Prancūzija). Sudėtis: 80,4 % proantocianidinų, iš kurių 19,6 % monomerai ir 40,8 % dimerai ir trimerai. 20 °C temperatūroje pH=2,9.

Spanguolių išspaudų ekstraktas buvo pagamintas KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros laboratorijoje iš šaldytų spanguolių, kurias padovanojo įmonė *Fudo* (Kaunas, Lietuva). Uogos buvo atšildytos ir spaustos sulčiaspaude *Philips HR1880/01*. Išspaudos buvo nedelsiant išdžiovintos karšto oro džiovintuve 35 °C temperatūroje (galutinis drėgnumas 5,83 %) ir sumaltos rotoriniu smulkintuvu *Retsch ZM200* (Haanas, Vokietija) naudojant 0,2 mm sietą. Lipofilinės frakcijos iš spanguolių išspaudų ekstrakto buvo pašalinamos taikant superkritinę ekstrakciją anglies dioksidu. Gauta liekana buvo toliau ekstrahuota etanoliu, o tada vandeniu pakopinės ekstrakcijos būdu padidinto slėgio aplinkoje. Etanolis iš ekstrakto buvo pašalintas rotaciniu vakuuminiu garintuvu, o vanduo – ekstrakto liofilizavimo metu [102]. Ekstraktas be tirpiklio laikomas 4 °C temperatūroje iki tolesnio panaudojimo.

Mažos ir didelės molekulinės masės junginių spanguolių ekstraktai. Spanguolių išspaudų ekstraktas buvo frakcionuojamas į mažos ir didelės molekulinės masės junginių frakcijas naudojant Sephadex™ LH-20 kolonėlę (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheimas, Jungtinė Karalystė). Mažos molekulinės masės junginių frakcija atskirta kolonėlę plaunant 50 % vandeniniu etanolio tirpalu, didelės molekulinės masės junginių frakcija – 80 % vandeniniu acetono tirpalu. Surinktų frakcijų organinio tirpiklio dalis buvo nugarinta rotaciniu vakuuminiu garintuvu *IKA RV 10* (*VWR International*s, JAV) atitinkamai 45 °C ir 40 °C temperatūroje. Gauti tirpalai buvo džiovinami liofilizatoriuje (*Harvest Right*, JAV). Ekstraktai laikomi 4 °C temperatūroje iki tolesnio panaudojimo.

Raugų kultūros. Pieno rauginimui buvo naudojamas *CHR. Hansen YF-L903* (Danija) liofilizuotas termofilinis raugas, kurį sudaro *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ir *Streptococcus thermophilus* bakterijos. Raugo paruošimas: 11 g lieso pieno miltelių sumaišoma su 89 g distiliuoto vandens ir autoklavuojama 121 °C temperatūroje 15 min. Į 42 ± 0,5 °C temperatūros atgamintą pieną dedama 0,0192 g susmulkinto raugo ir paliekama purtyklėje-inkubatoriuje *ES-20* (*Biosan*, Latvija) 15 min esant 120 apsk./min. greičiui. Vėliau užraugtas pienas 6 val. laikomas termostate (*Termaks AS*, Norveija) 42 ± 0,5 °C temperatūroje, pirmas 3 val. purtant mėginį. Gautas raugas laikomas šaldytuve 4 °C temperatūroje iki tolesnio naudojimo, bet ne ilgiau kaip 5 paras.

Mėginių virškinimui in vitro naudoti reagentai: kiaulių pepsinas, pankreatinas, kiaulių tulžies druskos, druskos rūgštis (HCl), natrio chloridas (NaCl), natrio hidroksidas (NaOH), natrio hidrokarbonatas (NaHCO₃), kalio chloridas (KCl), monokalio fosfatas (KH₂PO₄), kalcio chlorido dihidratas (CaCl₂(H₂O)₂), magnio chlorido heksahidratas (MgCl₂(H₂O)₆), amonio karbonatas ((NH₄)₂CO₃), distiliuotas vanduo (H₂O). Reagentų tiekėjas – *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheimas, Jungtinė Karalystė) ir *UAB Eurochemicals* (Vilnius, Lietuva).

Mėginių analizei po virškinimo naudoti reagentai: L-leucinas (L8000), natrio tetraboratas ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), trichloracto rūgštis (TCA) ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$), druskos rūgštis (HCl), bevandenis acetonas ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), fluoresceminas (F9015), natrio karbonatas (Na_2CO_3), Folin-Ciocalteu reagentas (F9252), geležies sulfatas (FeSO_4), n-butanolis ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), distiliuotas vanduo (H_2O), miliQ vanduo. Reagentų tiekėjas – *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheimas, Jungtinė Karalystė).

Kitiems tyrimams naudoti reagentai: Gliukono-delta-laktonas (GDL) (*ThermoFisher GmbH*, Vokietija), druskos rūgštis (HCl) (*ReAgent*, Jungtinė Karalystė), etanolis ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (*Stumbras*, Kaunas, Lietuva), acetonas ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheimas, Jungtinė Karalystė), MRS agaras (Nr. 4017282) ir natrio chloridas (NaCl) (Nr. 4013952) iš *Biolife* (Milanas, Italija).

2.2. Tyrimo objektai, jų paruošimas

Pieno mišinių ir jogurto gamybai buvo naudojami 4 uogų ekstraktai:

- komercinis vynuogių sėklų ekstraktas (VSE);
- spanguolių išspaudų ekstraktas (SEN);
- mažos molekulinės masės junginių spanguolių išspaudų ekstraktas (MMM);
- didelės molekulinės masės junginių spanguolių išspaudų ekstraktas (DMM).

Pieno ir ekstraktų mišinių gamyba. Liesas atgamintas pienas (pH 6,4) gautas ištirpinus lieso pieno miltelius distiliuotame vandenyje (21 g/100g tirpalo). Taip paruošiami atgaminto lieso pieno mėginiai buvo pasterizuojami $95 \pm 0,5$ °C temperatūroje 5 min. vandens vonelėje *JB Nova* (*Grant Instruments*, Jungtinė Karalystė) bei atvėsunami iki kambario temperatūros.

Vandeniniai ekstraktų tirpalai gauti tirpinant ekstraktus distiliuotame vandenyje, pasterizuojant $95 \pm 0,5$ °C temperatūroje 5 min. ir atvėsinant iki kambario temperatūros.

Pieno ir ekstraktų mišiniai buvo gaminami maišant liesą atgamintą pieną su ekstraktų vandeniniais tirpalais skirtingais kiekiais. Taip gauti pieno ir ekstraktų mišinių mėginiai, kuriuose pieno baltymų kiekis buvo vienodas – 5,5 %, o ekstrakto kiekis keitėsi nuo 0,25 iki 0,75 %. Duomenys apie pieno ir ekstraktų mišinių mėginių sudėtį bei kodavimą pateikti 1 lentelėje. Mėginiai buvo laikomi šaldytuve 24 val. iki tolesnio tyrimo. Taip pat pieno ir ekstraktų mišiniai buvo naudojami jogurto gamyboje.

1 lentelė. Vandeninių tirpalų, pieno mišinių su ekstraktais ir jogurto mėginių sudėtis bei kodavimas

Vandeninio tirpalo su ekstraktu mėginio kodas	Pieno ir ekstrakto mišinio mėginio kodas	Jogurto mėginio kodas	Ekstraktas	Ektrakto kiekis g/100ml
–	M-0 (kontrolė)	J-0 (kontrolė)	–	0
–	M-VSE-1	J-VSE-1	Komercinis vynuogių sėklų ekstraktas	0,25
–	M-VSE-2	J-VSE-2		0,5
–	M-VSE-3	J-VSE-3		0,75
VT-SEN-1	M-SEN-1	J-SEN-1	Spanguolių išspaudų ekstraktas	0,25
–	M-SEN-2	J-SEN-2		0,5
VT-SEN-3	M-SEN-3	J-SEN-3		0,75

Vandeninio tirpalo su ekstraktu mėginio kodas	Pieno ir ekstrakto mišinio mėginio kodas	Jogurto mėginio kodas	Ekstraktas	Ekstrakto kiekis g/100ml
VT-MMM-1	M-MMM-1	J-MMM-1	Mažos molekulinės masės junginių spanguolių išspaudų ekstraktas	0,25
VT-MMM-3	M-MMM-3	J-MMM-3		0,75
–	M-DMM-1	J-DMM-1	Didelės molekulinės masės junginių spanguolių išspaudų ekstraktas	0,25
VT-DMM-3	M-DMM-3	J-DMM-3		0,75

Jogurtas. Iš pieno mišinių su ekstraktais buvo paruošti jogurto mėginiai, kurių kodai pateikti 1 lentelėje. Pieno mišiniai su ekstraktais buvo pašildomi iki $42 \pm 0,5$ °C temperatūros, į juos įdedama po 5 % paruošto termofilinio raugo, gerai išmaišoma ir rauginama $42 \pm 0,5$ °C temperatūroje 4–5 val. vandens vonelėje *JB Nova* (*Grant Instruments*, Jungtinė Karalystė), kol pH pasiekia $4,6 \pm 0,05$. Fermentacijos procesas buvo sustabdytas atšaldant jogurto mėginius iki $4 \pm 0,5$ °C temperatūros. Visi jogurto mėginiai buvo laikomi 24 val. $4 \pm 0,5$ °C temperatūroje iki tolesnės analizės.

2.3. Tyrimo metodai

2.3.1. Spanguolių ekstraktų vertinimo metodai

Vertindami spanguolių ekstraktus nustatėme bendrą fenolinių junginių kiekį, bendrą proantocianidinų kiekį, ekstraktų antioksidacines ir antimikrobines (prieš pieno rūgšties bakterijas, naudotas jogurto gamyboje: *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) savybes.

Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas

Bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktoje buvo nustatytas pagal Slinkard'o ir Singleton'o [108] metodą. Mėgintuvėlyje sumaišoma 0,5 ml tiriamojo mėginio su 2,5 ml Folin-Ciocalteu reagentu, praskiestu 10 kartų distiliuotu vandeniu, ir 2 ml 7,5 % natrio karbonatu. Lygiagrečiai buvo paruoštas kontrolinis bandinys vietoj mėginio pilant distiliuoto vandens. Po 30 min. inkubacinio laikotarpio tamsoje 20 °C temperatūroje spektrofotometru *Evolution™ 300 UV-Vis* (*Thermo Scientific*, Jungtinė Karalystė) matuojamos tiriamojo ir kontrolinio mėginių absorbcijos esant 765 nm šviesos bangos ilgiui. Bendras fenolinių junginių kiekis 1 ml mėginio buvo apskaičiuotas mg galo rūgšties ekvivalentų (GRE) pagal 1 formulę, gautą sudarius skirtingų koncentracijų galo rūgšties tirpalų kalibracinę kreivę. Rezultatai pateikti GRE. Prieš analizę ekstraktas buvo ištirpintas ir praskiestas etanolyje.

$$y = 9,6994x + 0,0104; \quad (1)$$

čia y – optinis tankis; x – galo rūgšties koncentracija, mg/ml.

Bendras proantocianidinų kiekio nustatymas

Bendra proantocianidinų koncentracija (PAC) ekstraktoje buvo nustatyta pagal Waterman'o ir Mole'es [109] metodą. Stikliniame 2 ml mėgintuvėlyje su kamščiu sumaišoma 0,05 ml tiriamojo mėginio su 0,7 ml butanolio reagentu ir kaitinama 45 min. 95 °C temperatūros vandens vonelėje *JB Nova* (*Grant Instruments*, Jungtinė Karalystė). Lygiagrečiai buvo paruoštas kontrolinis bandinys vietoj mėginio pilant distiliuoto vandens. Butanolio reagentas buvo paruoštas sumaišius 70 mg geležies sulfato su 5

ml koncentruota druskos rūgštimi ir praskiesta iki 100 ml n-butanoliu. Į atšaldytus mėginius buvo pilama 0,25 ml n-butanolio ir spektrofotometru *EvolutionTM 300 UV-Vis* (*Thermo Scientific*, Jungtinė Karalystė) matuojamos tiriamojo ir kontrolinio mėginių absorbcijos esant 550 nm šviesos bangos ilgiui. Bendra proantocianidinų koncentracija 1 ml mėginio buvo apskaičiuota mg/ml pagal 2 formulę. Prieš analizę ekstraktas buvo ištirpintas ir praskiestas etanolyje.

$$C = \frac{A_{bs} \cdot MW \cdot F_{skiedimo}}{\varepsilon \cdot L}; \quad (2)$$

čia C – bendra proantocianidinų koncentracija, mg/ml; A_{bs} – optinis tankis; MW – molinė masė pagal cianidiną be cukraus, g/mol; $F_{skiedimo}$ – praskiedimo faktorius; ε – ekstinkcijos koeficientas; L – optinio kelio ilgis, cm.

Antioksidacinės savybių nustatymas (DPPH•) radikalų sujungimo metodu

DPPH laisvųjų radikalų sujungimas buvo nustatytas pagal Brand-Williams'o ir kt. [147] metodinį aprašymą. DPPH metodu įvertinamas antioksidantų gebėjimas redukuoti violetinės spalvos DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) radikalus į blankiai geltonos spalvos hidraziną. Antiradikalinis ekstraktų aktyvumas nustatomas pagal trolokso kalibracinės kreivės lygtį ir išreiškiamas mg Trolox ekvivalentais/g.

Difuzijos į agarą (įdubų) metodo analizė

Spanguolių ekstraktų antimikrobinės savybės buvo įvertintos difuzijos į agarą metodu su įdubomis. Steriliame inde sumaišoma 14 ml išlydinto MRS agaro (*Biolife*, Italija) su 0,1 ml pirmo skiedimo *CHR. Hansen YF-L903* raugu (Danija), kuris vėliau buvo naudojamas jogurto gamyboje. Terpė su mikroorganizmų suspensija pilama į sterilią Petri lėkštelę. Terpei sustingus ant jos paviršiaus padaromos keturios 0,6 cm skersmens įdubos. Į jas sulašinama 50 µl 0,75 % spanguolių ir vynuogių sėklų ekstraktų vandeniniai tirpalai. Po 48 val. inkubacijos 42 °C temperatūroje matuojamos skaidrios zonos skersmuo cm.

Pieno rūgšties bakterijų augimo kreivė

Į 9 ml fiziologinio tirpalo dedama 0,1 ml pirmo skiedimo *CHR. Hansen YF-L903* raugo (Danija) ir išmaišoma. 10 µl mikroorganizmų suspensijos maišoma su 0,375 g ekstrakto ir 50 ml MRS agaro terpe (*Biolife*, Italija) ir sėjama į sterilias Petri lėkštes. Skaičiuojamos pieno rūgšties bakterijų (PRB) kolonijos po 0 val., 1 val., 2 val., 3 val., 4val., 8 val. ir 24 val. inkubacijos, kurios išreiškiamos lg KSV/ml.

2.3.2. Pieno mišinių su ekstraktais ir iš jų pagaminto jogurto fizikinių cheminių savybių vertinimo metodai

Baltymų dalelių dydžio nustatymas

Pieno ir ekstraktų mišinių bei iš jų pagaminto jogurto dalelių dydžio nustatymui buvo naudojamas lazerinio spindulio difrakcinis spektrofotometras *Malvern Mastersizer 2000* (*Malvern Instruments Ltd*, Jungtinė Karalystė). Nedidelis kiekis mėginio pilama į maišyklę, besisukančią 1200 apsk./min greičiu, kuri išsklaido mėginį distiliuotame vandenyje. Naudojant spektrofotometro programinę įrangą apskaičiuojamas vidutinis baltymų dalelių dydis pagal tūrį ($d_{[4,3]}$) ir sudaromas dalelių pagal dydį pasiskirstymo grafikas.

Rūgštinės koaguliacijos savybių analizė

Pieno ir ekstraktų mišinių rūgštinės koaguliacijos trukmė buvo matuojama reologiniu metodu. Matavimai buvo atlikti reometru *Physica MCR 301* (*Anton Paar GmbH*, Vokietija) naudojant kūgis-cilindras geometrinę sistemą (cilindro skersmuo – 25 mm). Vibracijos režimas buvo parinktas 1 Hz ir pastovia deformacija – 0,003. 10 ml mėginio iš anksto pašildoma iki 30 °C temperatūros ir joje išlaikant 10 min. Į pašildytą mėginį įdedama 3 % gliukono-delta-laktono (GDL) pasverto *ALJ 220-4NM* analitinėmis svarstyklėmis (*KERN & Sohn GmbH*, Vokietija), išmaišoma ir supilama į reometro analizavimo cilindrą. Matavimas vyko 60 min. palaikant 30 °C temperatūrą ir fiksuojant klampos bei elastingumo modulius G' ir G'' kas 1 min. Rūgštinės koaguliacijos trukmė fiksuojama nuo GDL pridėjimo iki $G' = G''$.

Reologinių charakteristikų nustatymas

Pieno ir ekstraktų mišinių bei iš jų pagaminto jogurto reologinės charakteristikos nustatytos užrašant tekėjimo kreives, t. y. poslinkio įtempio (τ , Pa) pasikeitimus kintant poslinkio greičiui nuo 1 iki 500 s^{-1} . Reologinės charakteristikos matuojamos reometru *Physica MCR 301* (*Anton Paar GmbH*, Vokietija) naudojant kūgis-cilindras geometrinę sistemą (cilindro skersmuo – 25 mm, kampas – 2° ir tarpas iki cilindro dugno – 0,05 mm) palaikant $21 \pm 0,5$ °C temperatūrą. Tekėjimo kreivių analizei pritaikomas matematinis *Ostwald* (3) arba *Herschele Bulkley* (4) modelis, kuris geriausiai aprašo pieno mišinių ir jogurto mėginių elgesį dominuojančioje įtempio srityje.

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n; \quad (3)$$

$$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n; \quad (4)$$

čia τ – poslinkio įtempis, Pa; τ_0 – ribinis poslinkio įtempis, Pa; k – klampos koeficientas, Pa·sⁿ; $\dot{\gamma}$ – poslinkio greitis, s^{-1} ; n – takumo indeksas.

Sinerezės savybių analizė

Jogurto išrūgų sulaikymo pajėgumas buvo išmatuotas remiantis Bai'o ir kt. [110] metodika su tam tikrai pakeitimais. Pasveriamas 10 g jogurto mėginio į 50 ml plastikinį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 1600 apsk./min. greičiu 10 min. 4 °C temperatūroje naudojant centrifugą *MPW-260/R/RH* (*MPW MED. Instruments*, Lenkija). Mėgintuvėlio viršuje išsiskyres supernatantas nupilamas ir pasveriamas analitinėmis svarstyklėmis *ADAM AE437766* (*ADAM equipment Co. Ltd.*, Jungtinė Karalystė). Sinerezė procentais apskaičiuojama pagal formulę:

$$\text{Sinerezė} = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100; \quad (5)$$

čia m_1 – supernatanto svoris, g; m_2 – mėginio svoris, g.

Gyvybingų pieno rūgšties bakterijų skaičiaus jogurte nustatymas

Pieno rūgšties bakterijų kiekis jogurte buvo nustatytas vadovaujantis Lietuvos standartizacijos departamento standartu ISO 15214:2009 [111]. Jogurto *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ir *Streptococcus thermophilus* bakterijų skaičius buvo nustatomas atliekant serijinius skiedimus 10 kartų. Visi skiedimai buvo daromi naudojant sterilų fiziologinį tirpalą, t. y. 0,85 % NaCl vandeninį

tirpalą. Nulinis skiedimas atliktas į mėgintuvėlį su 9 g fiziologinio tirpalo pasvėrus 1 g jogurto 0,01 g tikslumu naudojantis svarstyklėmis *PLJ 600-3CM* (*KERN*, Vokietija). Į kiekvieną Petri lėkštelę įpilta 1 ml praskiesto mėginio ir užpilta apie 15 ml komercinės selektyvios MRS agaro terpės, kuri buvo paruošta pagal gamintojo rekomendacijas. Mėginiai pasėti giluminiu būdu. Sustingus terpei, lėkštelės anaerobinėmis sąlygomis inkubuojamos 48 val., 42 °C temperatūros termostate (*Termaks AS*, Norvegija). Praėjus inkubacijos periodui suskaičiuotos lėkštelėse išaugusios pieno rūgšties bakterijų kolonijos ir apskaičiuojamas jų kiekis tiriamajame mėginyje pagal (6) lygtį. Rezultatai išreikšti lg kolonijas sudarančiais vienetais, t. y. lg KSV/g.

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1+0,1n_2)d}; \quad (6)$$

čia N – mikroorganizmų skaičius tiriamajame mėginyje, KSV/g; ΣC – kolonijų suma, kai jas sudaro ne mažiau kaip 15 ir ne daugiau kaip 300 kolonijų iš dviejų vienas po kito einančių skiedinių; V – pasėtos medžiagos tūris, ml; n_1 – aukščiausio skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; n_2 – žemiausio skiedinio vertinamų lėkštelių skaičius; d – žemiausio vertinamo skiedinio skiedimo koeficientas.

2.3.3. Pieno mišinių su ekstraktais ir iš jų pagaminto jogurto virškinamumo tyrimas *in vitro*

Mėginių *in vitro* analizė buvo atliekama pagal *INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion* protokolą [112]. Ši analizė paremta statine mėginio hidrolize, kurios metu naudojamas pastovus produkto kiekis ir virškinimo sulčių santykis bei pH. Taikant šį metodą maisto mėginiai nuosekliai virškinami imituojant sąlygas burnoje, skrandyje ir plonojoje žarnoje, o tokie parametrai kaip fermentų, tulžies druskų kiekis, skiedimai, pH ir virškinimo laikas yra pagrįsti turimais fiziologiniais duomenimis. Nuoseklią virškinimo *in vitro* eigą galima suskirstyti į 3 etapus: reagentų ir mėginių pasiruošimas, virškinimo proceso imitavimas burnoje, skrandyje, plonojoje žarnoje ir mėgino analizė po virškinimo.

Virškinimo sulčių ir fermentų paruošimas

Dirbtinės seilių (SSF), skrandžio (SGF) ir plonosios žarnos (SIF) sultys ruošiamos pagal eigą nurodytą 2 lentelėje. Elektrolitų pradiniai tirpalai ruošiami iš anksto, praskiedžiami distiliuotu vandeniu iki 400 ml ir laikomi -18 °C temperatūroje. Prieš analizę darbiniai tirpalai yra pašildomi iki 37 °C temperatūros.

2 lentelė. Elektrolitų tirpalų tūriai ir koncentracijos darbinių virškinimo sulčių gamybai

Druskų baziniai tirpalai (DBT)	Koncentracija		SSF (pH 7)	SGF (pH 3)	SIF (pH 7)
	g/L	M			
KCl	37.3	0.5	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	68	0.5	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	84	1	6.8	12.5	42.5
NaCl	117	2	-	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.15	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.5	0.06	0.5	-
HCl	219	6	0.09	1.3	0.7
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ *	44.1	0.3	0.025	0.005	0.04

Druskų baziniai tirpalai (DBT)	Koncentracija		SSF (pH 7)	SGF (pH 3)	SIF (pH 7)
	g/L	M	DBT kiekis, ml		
pH koregavimui					
NaOH	40	1	4	-	0,5
HCl	36,5	1	1	3	0,3

* $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ pridamas į galutinį mėginio virškinimo tūrį siekiant išvengti nuosėdų.

Fermentų vandeniniai tirpalai riošiami atsižvelgiant į reikiamą gauti fermentų aktyvumą visame mėginio tūryje (skrandžio fazėje – 20 ml, plonosios žarnos fazėje – 40 ml) (žr. 3 lentelę). Gaminant tulžies druskos ir pankreatino vandeninius tirpalus jie maišomi magnetine maišykle *F-91 T (FALC Instruments, Italija)* leduotame vandenyje.

3 lentelė. Fermentų vandeninių tirpalų ruošimas

Fermentas	Fermento reikalingas mėginiui	kiekis vienam	Tirpiklis	Tirpiklio reikalingas mėginiui	kiekis vienam	Fermento aktyvumas visame mėginio tūryje
Pepsinas (2500 U/ml)	0,016 g/ml		Distiliuotas vanduo	0,5 ml		2000 U/ml
Tulžies druskos (10 mM)	0,0108 g/ml			2,5 ml		10 mM
Pankreatinas (20 U/ml)	0,272 g/ml			5 ml		100 U/ml

Mėginių paruošimas

Vieno pakartojimo vienas mėginys sveriamas į 4 laboratorinius buteliukus po $5 \pm 0,05$ g jogurto ar pieno mišinio ir įdedama po 2 g stiklinių rutuliukų siekiant virškinimo metu imituoti virškinimo trakto peristaltinius judesius. Laboratoriniai buteliukai su mėginiu sužymimi:

- G0 – mėginys po virškinimo skrandžio fazėje 0 min.;
- G120 – mėginys po virškinimo skrandžio fazėje 120 min.;
- D0 – mėginys po virškinimo žarnyno fazėje 0 min.;
- D120 – mėginys po virškinimo žarnyno fazėje 120 min.

Burnos virškinimo fazė

Tiriamą mėginį $5 \pm 0,05$ g sumaišomi su $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (žr. 2 lentelę), SSF ir distiliuotu vandeniu iki galutinio 10 ml tūrio ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 2 min. (žr. 4 pav.) vandens vonelėje *GFL 1092 (GFL Lauda, Vokietija)*. Kadangi tiriamasis objektas yra pieno mišinys ir jogurtas, kuriuose nėra didelio kiekio angliavandenių, todėl jų skaldančio fermento amilazės nededame.

Skrandžio virškinimo fazė

Mėginys po burnos fazės sumaišomas su $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (žr. 2 lentelę), SGF (žr. 4 pav.) ir koreguojamas pH iki 2–3 su 6 M HCl naudojantis pH-metru *Mi 105* su *Ma 920* elektrodu (*Milwaukee, JAV*), fiksuojant sunaudotas rūgšties kieki. Po to pilamas pepsino vandeninis tirpalas paruoštas pagal 3 lentelę ir distiliuotas vanduo iki galutinio 20 ml mėginio tūrio. Mėginiai inkubuojami atitinkamai 1 min. (G0) ir 120 min. (G120, D0, D120) 37 °C temperatūroje (žr. 4 pav.). Po inkubacijos skrandžio

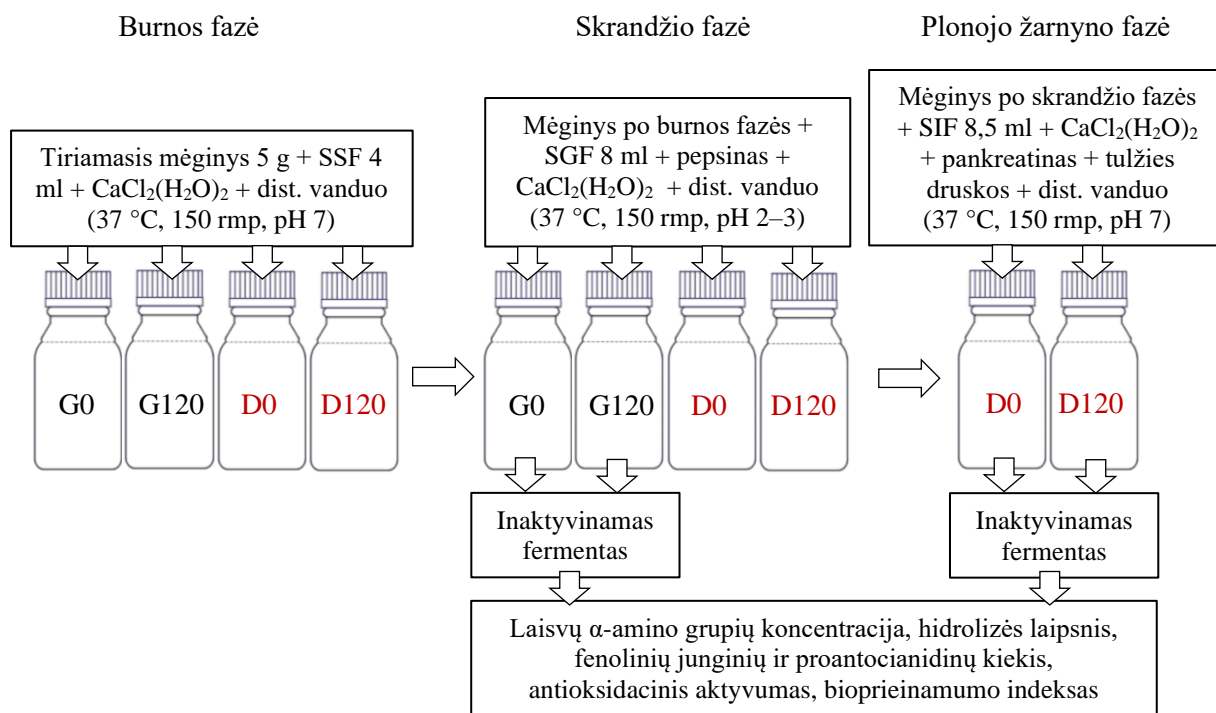
fazės mėginių (G0 ir G120) fermentas inaktyvuojamas koreguojant pH iki 7 su 7,5 M NaOH fiksuojant sunaudoto šarmo kiekį. Laboratorinis buteliukas su mėginiu laikomas 4 °C temperatūroje leduotame vandenyje iki tolimesnio mėginio apdorojimo.

Žarnyno virškinimo fazė

Po skrandžio fazės į D0 ir D120 mėginius pilama SIF (žr. 4 pav.), $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (žr. 2 lentelę) ir tulžies druskos vandeninis tirpalas (žr. 3 lentelę). Koreguojamas mėginių pH iki 7 su 7,5 M NaOH ir fiksuojamas sunaudoto šarmo kiekis. Supilamas pankreatino vandeninis tirpalas paruoštas pagal 3 lentelę ir distiliuotas vanduo iki galutinio 40 ml mėginio tūrio. Po inkubacijos plonojo žarnyno fazės mėginių fermentai inaktyvinami atšaldant mėginius 4 °C temperatūroje leduotame vandenyje.

Mėginių paruošimas analizei po virškinimo *in vitro*

Laboratorinių buteliukų turis su suvirškintu mėginiu nukošiamas per sietelį į 50 ml centrifugavimo mėgintuvėlius. Centrifuguojama 4000 apsk./min. 4 °C temperatūroje 20 min. centrifuga *MPW-260R* (*MPW Med. Instruments*, Lenkija) ir filtruojama per filtrinį popierių. Tirpi virškinimo frakcija buvo surinkta, užšaldyta ir laikoma -18 °C temperatūroje iki tolesnės analizės.



4 pav. *In vitro* virškinimo schema vienam mėginiui (G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D0 – žarnyno fazė 5 min., D120 – žarnyno fazė 120 min.)

2.3.4. Pieno mišinių su ekstraktais ir iš jų pagaminto jogurto virškinamumo vertinimo metodai

Laisvų α -amino grupių analizė

Fluoresceminės analizės metu nustatomas laisvų α -amino grupių kiekis mM/l. Mėginio baltymai nesuskaldyti proteolitiniais fermentais po virškinimo *in vitro* pašalinami nusodinant trichloracto rūgšties tirpalu. Fluramo tirpalas sumaišytas su supernatante esančiais proteolizės produktais, jungiasi su laisvomis amino rūgštimis, peptidais ir junginys tampa fluorescuojančiu – identifikuojamu.

Laisvų α -amino grupių analizė buvo atlikta remiantis [113] literatūros šaltiniu. 75 μ l bandinio sumaišyta su 75 μ l 24 % TCA mėgintuvėlyje (*Eppendorf*) ir paliekama 30 min. -18 °C temperatūroje, kad pagreitėtų baltymų nusodinimas. Po to mėginys atšildomas ir centrifuga *MSC-6000* (*Biosan*, Latvija) centrifuguojamas 6000 rpm 4 °C temperatūroje 20 min. Po to 30 μ l supernatanto maišoma su 900 μ l 0,1 M natrio tetraborato buferiu (natrio tetraboratas tirpinamas miliQ vandenyje karšto vandens vonelėje, pH 8 – koreguojama su HCl) ir 300 μ l fluorescemino tirpalo (0,2 mg/ml fluorescamino bevandeniam acetone). Į lėkštutės šulinėlius pilama 250 μ l analizei paruošto mėginio. Analogiškai paruošiamas standartiniai leucino tirpalai ir tuščias bandinys. Analizė buvo atlikta su mikroplokštelių analizatoriumi *FLUOstar Omega* (*BMG LABTECH*, Vokietija) 25 °C temperatūroje esant sužadavimo bangos ilgiui 390 nm ir spinduliavimo – 480 nm. Mėginių skiedimai daromi naudojant 1 mM HCl tirpalą, fiksuojant ir įvertinant praskiedimo faktorių. Kiekybinis proteolizės produktų kiekis buvo apskaičiuotas remiantis skirtingų koncentracijų leucino standarto tirpalų kalibracinės kreivės lygtimi, kuri gaunama kiekvieną kartą atlikus tyrimą.

Bendras fenolinių junginių kiekis ir biologinio prieinamumo indeksas

Bendras fenolinių junginių kiekis, išsiskyręs į virškinimo sultis, buvo nustatytas naudojant Folin-Ciocalteu reagentą, kaip aprašyta 2.3.1. skyriuje. Rezultatai išreikšti GRE. Išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis procentais apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{Išsiskyrusių junginių kiekis} = \frac{C_f \text{ virškinimo sultyse}}{C \text{ mėginyje iki virškinimo}} \cdot 100 \quad (6)$$

čia C_f virškinimo sultyse – bendras fenolinių junginių kiekis virškinimo sultyse, C mėginuje iki virškinimo – bendras fenolinių junginių kiekis mėginyje iki virškinimo.

Fenolinių junginių biologinio prieinamumo indeksas (BI, %) apskaičiuotas kaip procentinis santykis bendro fenolinių junginių kiekio, nustatyto žarnyno virškinimo sultyse po 120 min. virškinimo ir bendro fenolinių junginių kiekio, nustatyto mėginyje iki virškinimo.

Bendras proantocianidinų kiekis ir biologinio prieinamumo indeksas

Bendras proantocianidinų kiekis, išsiskyręs į virškinimo sultis, buvo nustatytas pagal 2.3.1 skyriuje pateiktą tyrimo metodą. Rezultatai išreikšti mg/ml. Išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis procentais apskaičiuotas taikant (6) formulę.

Proantocianidinų biologinio prieinamumo indeksas (BI, %) apskaičiuotas kaip procentinis santykis bendro proantocianidinų kiekio, nustatyto žarnyno virškinimo sultyse po 120 min. virškinimo ir bendro proantocianidinų kiekio, nustatyto mėginyje iki virškinimo.

Antioksidacinės savybės

Antioksidacinės savybės virškinimo sultyse nustatytos kaip aprašyta 2.3.1. skyriuje.

2.3.5. Statistinė analizė

Visi tyrimai buvo atlikti po 3 pakartojimus. Rezultatai išreikšti apskaičiuotais vidurkiais ir standartiniais nuokrypiais. Matematinė statistinė duomenų analizė atlikta naudojant *Microsoft Excel* programą taikant Stjudento t-testą, kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Spanguolių ekstraktų charakterizavimas

Šio mokslinio tiriamojo darbo pradžioje spanguolių išspaudų ekstraktas buvo išfrakcionuotas į mažos ir didelės molekulinės masės junginių frakcijas naudojant SephadexTM LH-20 kolonėlę ir buvo išanalizuota gautų frakcijų sudėtis bei savybės. Pirmiausia buvo nustatytas bendras fenolinių junginių, proantocianidinų ir kai kurių antocianidinų kiekis siekiant išsiaiškinti, ar pavyko išfrakcionuoti spanguolių ekstraktą į mažos ir didelės molekulinės masės junginių frakcijas. Taip pat buvo analizuojamas spanguolių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas bei jų įtaka jogurto gamyboje naudojamų pieno rūgšties bakterijų aktyvumui ir slopinimui. Palyginimui buvo naudotas komercinis vynuogių sėklų ekstraktas, kurio kokybės sertifikate nurodyta, kad jo sudėtyje yra 80,4 % proantocianidinų, iš kurių 19,6 % monomerai ir 40,8 % dimerai ir trimerai.

Iš 4 lentelėje pateiktų duomenų galima matyti, kad DMM ekstrakto fenolinių junginių kiekis buvo $94519,38 \pm 686,00$ mg/100 g. Tai žymiai didesnis šių bioaktyviųjų medžiagų kiekis nei komerciniame vynuogių sėklų ekstrakto ($62632,74 \pm 1296,62$ mg/100g). Mažiausias bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas MMM ekstrakto, t. y. $5278,44 \pm 198,20$ mg/100g. Tai, kad pavyko išskirti spanguolių išspaudų ekstraktą į didelės ir mažos molekulinės masės junginių frakcijas rodo proantocianidinų ir antocianinų kiekio nustatymo rezultatai, kurie pateikti 4 lentelėje. Kadangi PAC yra oligomerų mišinys, todėl MMM ekstrakto buvo rastas mažiausias šių junginių kiekis, t. y. $60,31 \pm 0,60$ mg/100g, bei didžiausi kiekiai skirtingų monomerinių antocianinų. Pavyzdžiui, cyanidin-3-O-galaktozido MMM frakcijų ekstrakto buvo rasta $1376,62 \pm 5,23$ mg/100g, o DMM ekstrakto tik $20,41 \pm 1,29$ mg/100mg. Tačiau žymiai didesnis PAC kiekis nustatytas DMM ekstrakto t. y. $1813,95 \pm 11,04$ mg/100g, o tai panašus kiekis, kuris buvo nustatytas komerciniame vynuogių sėklų ekstrakto – $1161,00 \pm 66,47$ mg/100g.

Kadangi fenoliniai junginiai susiję su spanguolių biologiniu aktyvumu, t. y. antioksidaciniu ir antibakteriniu aktyvumu, todėl buvo svarbu nustatyti kaip skiriasi nefrakcionuoto ir frakcionuoto spanguolių ekstraktų antioksidacinės savybės ir ištirti jų galimą poveikį pieno rūgšties bakterijoms. Pagal DPPH radikalų surišimo pajėgumą didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo DMM ekstraktas, o mažiausiu – MMM ekstraktas, atitinkamai $305 \pm 0,01$ mg TE/g ir $102 \pm 0,02$ mg TE/g (žr. 4 lentelę). Kadangi SEN buvo pastarųjų ekstraktų mišinys, todėl nustatytas vidutinis jo antioksidacinis aktyvumas, t. y. $198 \pm 0,01$ mg TE/g. Ankstesni mokslininkų tyrimai parodė, kad fenolinių junginių sudėtis ir hidroksilo grupių skaičius molekulės struktūroje turėjo įtakos didesniai antioksidaciniam aktyvumui [42]. Šį teiginį patvirtino Liu'is ir kt. [114], kurie analizavo p-kumaro ir kofeino rūgšties antioksidacines savybes ir nustatė, kad pastaroji rūgštis, turinti dvi hidroksilo grupes, pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei p-kumaro rūgštis, turinti vieną -OH grupę. Tačiau Denev'as ir kt. teigė, kad juodųjų aronijų proantocianidiniai gali būti paversti didesniu antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčiais antocianidiniais, kurių antimikrobinis aktyvumas nustatytas silpnesnis nei proantocianidinų [115].

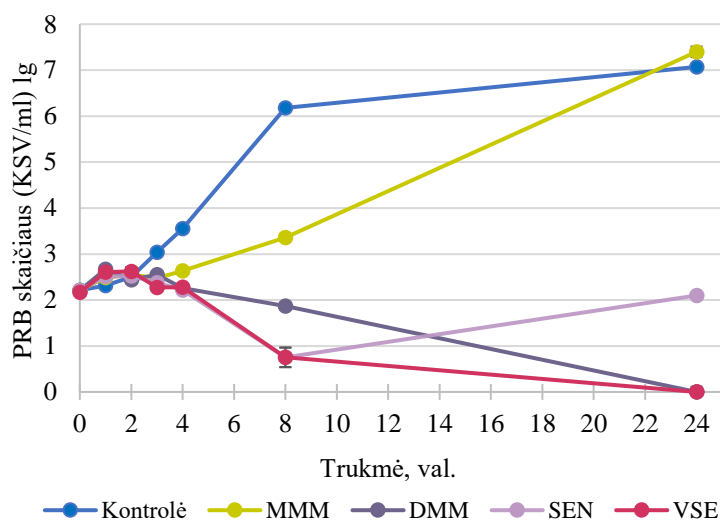
Difuzijos į agarą metodu su įdubomis buvo ištirta spanguolių ekstraktų ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto įtaka PRB, naudojamų jogurto gamyboje, slopinimui (žr. 4 lentelę). Tyrimo rezultatai rodo, kad agarą terpėje susidarė slopinimo zona aplink DMM ekstraktą ir VSE, atitinkamai $0,7 \pm 0,08$ cm ir $0,96 \pm 0,10$ cm. Šie tyrimo rezultatai koreliuoja su PRB augimo skaičiaus pokyčiu laikymo metu pateiktu 5 paveiksle. Iš diagramos galima matyti, kad DMM ekstraktas ir VSE slopino jogurto raugo

bakterijas laikymo metu, o po 24 val. jų buvo 0 KSV/ml lg. Analogiškus tyrimo rezultatus gavo Tabasco‘as ir kt. [116], kurie nustatė, kad vynuogių sėklų ekstrakto monomerai ir oligomerai slopino *S. Thermophilus* ir *L. casei* PRB fermentuotame piene. Pastebėta, kad MMM ekstraktas neturėjo įtakos PRB augimui lyginant su kontrole, o SEN per pirmas 8 val. slopino raugo bakterijas, o vėliau skaičius augo ir po 24 val. jų rasta 2,10 KSV/ml lg.

4 lentelė. Skirtingų spanguolių ekstraktų ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto charakteristika

Sudėtis ir savybės	Spanguolių ekstraktas			
	MMM	DMM	SEN	VSE
Fenolinių junginių kiekis, mg/100g pagal GRE	5278,44 ± 198,20	94519,38 ± 686,00	11129,75 ± 23,83	62632,74 ± 1296,62
Proantocianidinų kiekis, mg/100g	60,31 ± 0,60	1813,95 ± 11,04	333,91 ± 5,19	1161,00 ± 66,47
Kai kurių antocianinų kiekis, mg/100g				
cyanidin-3-O-galaktozidas	1376,62 ± 5,23	20,41 ± 1,29	25,33 ± 1,19	–
cyanidin-3-O-gliukozidas	176,55 ± 1,13	11,26 ± 1,06	7,916 ± 0,44	–
cyanidin-3-O-arabinozidas	333,79 ± 2,43	10,94 ± 0,99	10,58 ± 1,02	–
DPPH radikalai, mg Trolox ekvivalentais/g	102 ± 0,02	305 ± 0,01	198 ± 0,01	–
Pieno rūgšties bakterijų* slopinimo zonos skersmuo, cm	0	0,70 ± 0,08	0	0,96 ± 0,10

* Pieno rūgšties bakterijos, naudotos jogurto gamyboje: *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.



5 pav. Spanguolių ekstraktų ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto įtaka pieno rūgšties bakterijų, naudojamų jogurto gamyboje: *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, augimo kreivėms

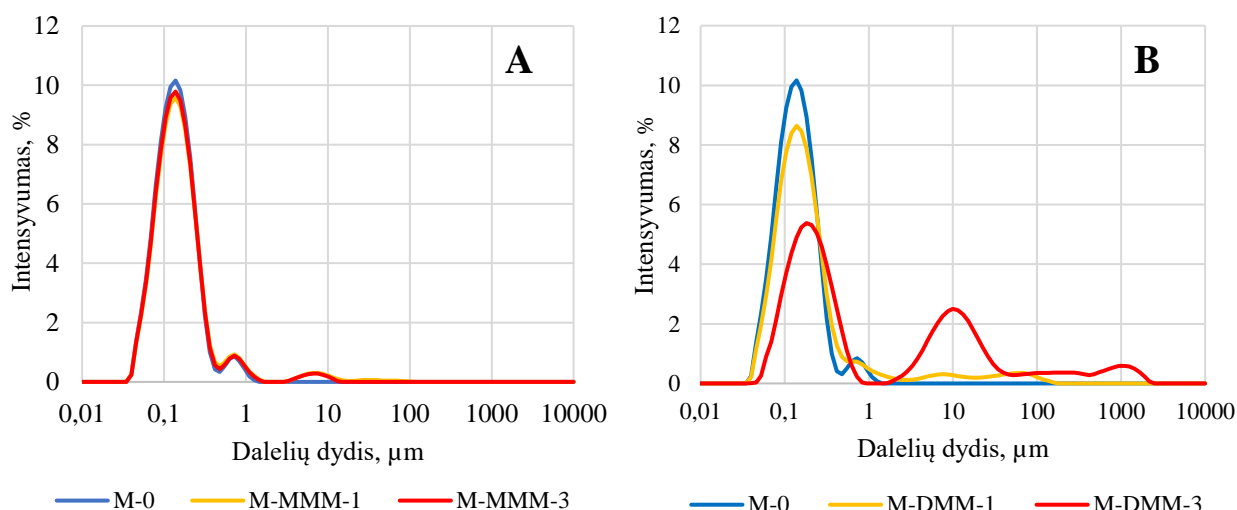
3.2. Pieno mišinių su spanguolių ekstraktais fizikinės cheminės savybės

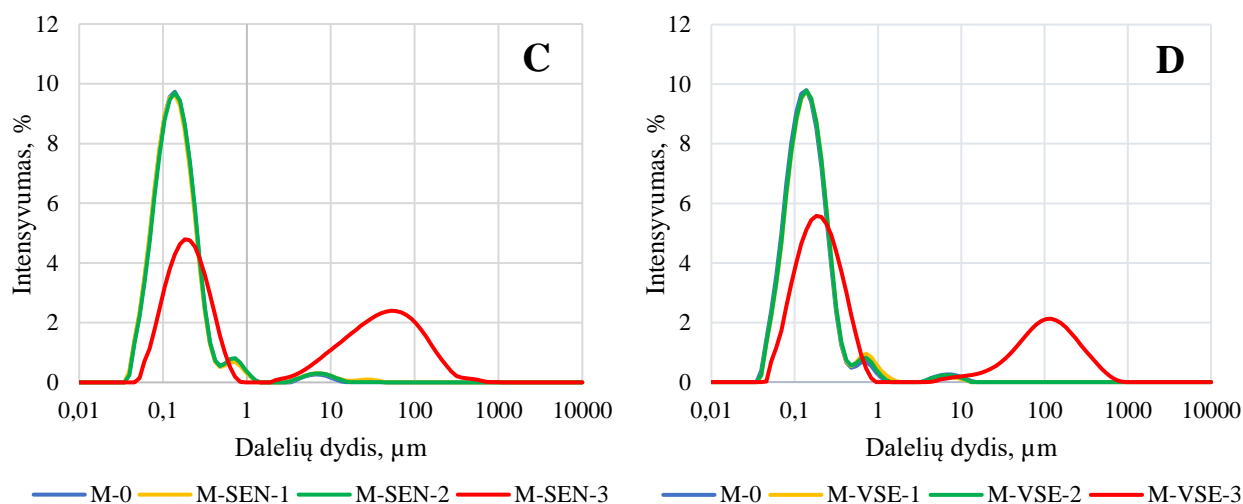
Prieš ekstraktų įtakos jogurto savybėms analizę, buvo svarbu nustatyti jogurto gamyboje naudotų pieno mišinių su ekstraktais savybes. Dėl galimo pieno baltymų kompleksavimo su ekstraktuose esančiais fenoliniais junginiais mišiniuose galimi specifiniai baltymų dalelių savybių pokyčiai.

Pasikeitus baltymų dalelių dydžiui, gali sumažėti koloidinis baltymų stabilumas ir pasikeisti pieno mišinių su ekstraktais klampa. Buvo iškelta hipotezė, kad visi šie pokyčiai gali turėti įtakos iš mišinio gaminamo jogurto savybėms.

Pirmiausia buvo palyginta pieno mišinių su spanguolių ekstraktais baltymų dalelių dydis pagal tūrį ir jų pasiskirstymas mėginyje. Iš 6 paveiksle pateiktų rezultatų matyti, kad MMM ekstraktas neturėjo įtakos baltymų dalelių dydžiui. Nepriklausomai nuo įdėto ekstrakto kiekio dauguma baltymų dalelių užfiksuotos diapazone nuo $\sim 0,05 \mu\text{m}$ iki $\sim 0,6 \mu\text{m}$ ir tik nedidelė jų dalis buvo diapazone nuo $\sim 0,6 \mu\text{m}$ iki $\sim 1 \mu\text{m}$ ir nuo $\sim 1,5 \mu\text{m}$ iki $\sim 10 \mu\text{m}$. Pieno mišiniuose su DMM ekstraktu baltymų dalelių pasiskirstymas priklausė nuo įdėto ekstrakto kiekio. Kai DMM ekstrakto kiekis mišinyje buvo 0,75 %, nustatytas polidispersinės sistemos pobūdis, kai dalelės pasiskirstė trijuose diapazonuose: didžiausios baltymų dalelės užregistruotos nuo $\sim 5 \mu\text{m}$ iki $\sim 50 \mu\text{m}$ bei nuo $\sim 500 \mu\text{m}$ iki $\sim 1500 \mu\text{m}$, o mažesnės dalelės nuo $\sim 0,05 \mu\text{m}$ iki $\sim 1 \mu\text{m}$. Tai, kad didelės molekulinės masės fenoliniai junginiai spanguolių ekstrakto yra susiję su baltymų dalelių dydžio pokyčiais mišiniuose įrodo pieno mišinių tyrimai su nefrakcionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu, kurių sudėtyje yra proantocianidinų oligomerų. Kai į pieną buvo įpilta 0,75 % šių ekstraktų, baltymų dalelės pasiskirstė nuo $\sim 0,6 \mu\text{m}$ iki $\sim 1 \mu\text{m}$ ir nuo $\sim 5 \mu\text{m}$ iki $\sim 1000 \mu\text{m}$.

Tos pačios tendencijos pastebėtos ir analizuojant vidutinį dalelių dydžio pieno mišiniuose su ekstraktais reikšmes (žr. 5 lentelę). Vidutinis baltymų dalelių dydis išreikštas pagal tūrį buvo $11,02 \pm 1,61 \mu\text{m}$, $25,43 \pm 1,11 \mu\text{m}$, $33,57 \pm 17,09 \mu\text{m}$ atitinkamai mėginiams, kuriuose ekstrakto kiekis buvo didžiausias, t. y. M-DMM-3, M-SEN-3 ir M-VSE-3, kontrolinio bandinio, kurio baltymų dalelių dydis tik $0,27 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (žr. 5 lentelę). Manoma, kad nekovalentinė baltymų-polifenolių sąveika daugiausiai atsiranda dėl vandenilinių jungčių, van der Valso ir hidrofobinės sąveikos bei rečiau dėl kovalentinių ryšių, t. y. o-chinonų reakcijos su nukleofiliniais radikalais [99]. Remiantis rezultatais, padidinus ekstrakto kiekį pieno mišinyje padidėjo polifenolinių jungčių skaičius dėl to baltymų dalelės padidėjo.





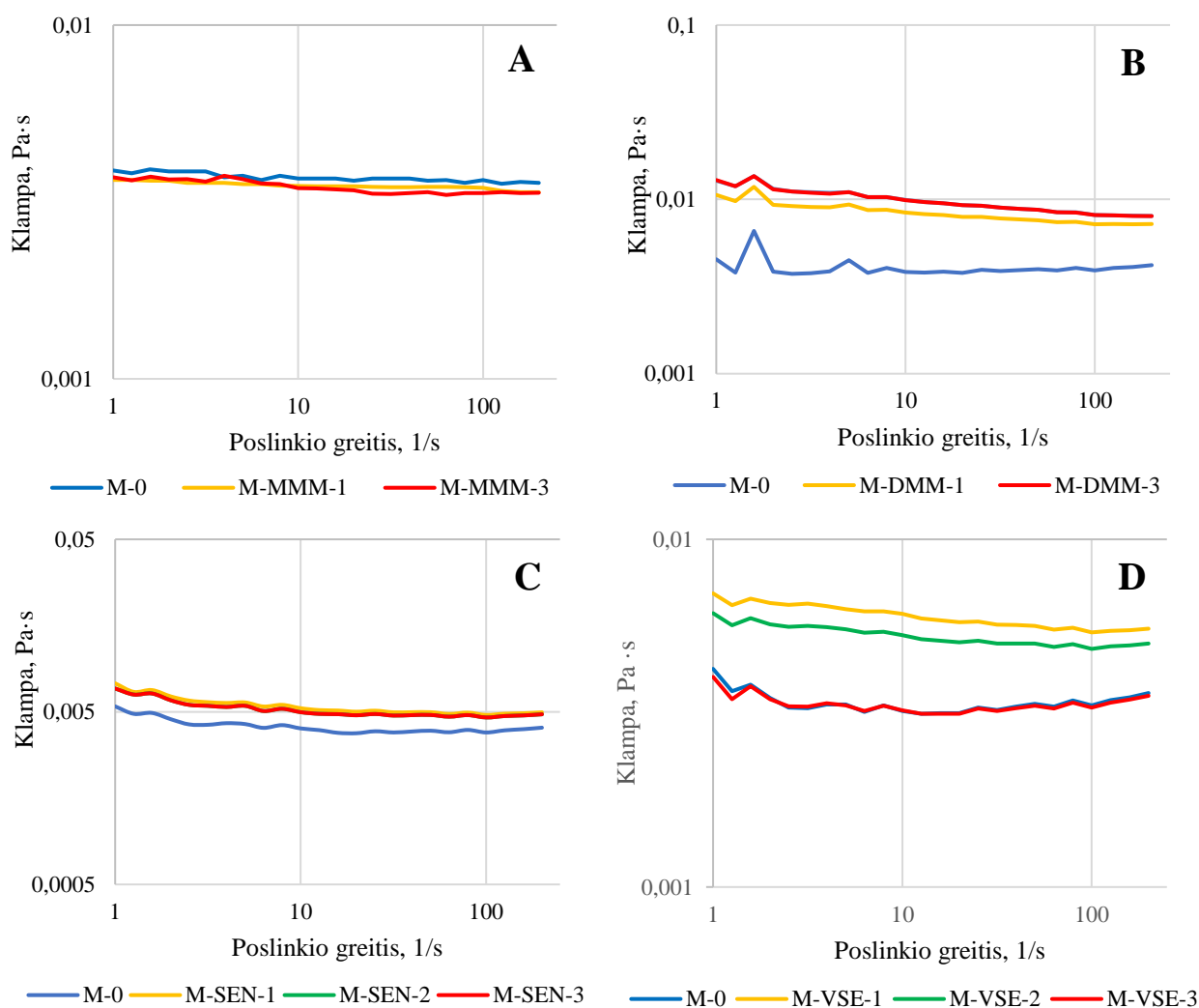
6 pav. Pieno baltymų dalelių pasiskirstymas pieno mišiniuose su spanguolių išspaudų ekstraktais (A, B, C) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (D) (M-0 – pienas be ekstrakto, M-MMM-1, M-DMM-1, M-SEN-1, M-VSE-1 – pienas su 0,25 % ekstrakto, M-SEN-2, M-VSE-2 - pienas su 0,5 % ekstrakto, M-MMM-3, M-DMM-3, M-SEN-3, M-VSE-3 – pienas su 0,75 % ekstrakto)

5 lentelė. Pieno mišinių su ekstraktais vidutinio dalelių dydžio pagal tūrį $d_{[4,3]}$ (μm) priklausomybė nuo ekstrakto kiekio

Ekstraktas mišinyje	Ektrakto kiekis mišinyje			
	0 %	0,25 %	0,5 %	0,75 %
MMM	$0,27 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,41$	–	$0,28 \pm 0,01$
DMM	$0,27 \pm 0,05$	$2,52 \pm 1,22$	–	$11,02 \pm 1,61$
SEN	$0,27 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,04$	$25,43 \pm 1,11$
VSE	$0,27 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,04$	$33,57 \pm 17,09$

Pieno mišinių su ekstraktais reologinės savybės buvo įvertintos užrašant klampas ir tekėjimo kreives. Klampas kreivės pateiktos 7 paveiksle. Analizuojamų pieno mišinių su ekstraktais tekėjimo kreivių matematiniam aprašymui buvo parinktas *Ostwald* modelis. Šio reologinio modelio regresijos kreivės atitikimo koeficientas R^2 artimas vienetui ($\geq 0,99$) (žr. 6 lentelę). Iš 7 paveiksle pateiktų klampas kreivių matyti, kad pieno mišinių su 0,25 % ir 0,75 % MMM ekstraktu klampas kreivės persidengusios ar išsidėsčiusios kiek žemiau nei pieno be ekstrakto klampas kreivė (kontrolinio mėginio). Vadinasi, šis ekstraktas ir skirtingos jo koncentracijos neturėjo įtakos pieno klampai. Tai patvirtina 6 lentelėje pateikti klampas koeficientai K , kurie artimi ar net mažesni nei pieno be ekstrakto, kurio $K = 0,0047 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Nežymus klampas padidėjimas buvo pastebėtas pieno mišinių su nefrakcionuotiu spanguolių ekstraktu (žr. 7 pav. C), tačiau apskaičiuotas klampas koeficientas (žr. 6 lentelę) rodo, kad nėra reikšmingo skirtumo tarp pieno mišinių su šiuo ekstraktu ir kontrolės (pieno be ekstrakto). Priešingai, DMM spanguolių ekstraktas įmaišytas į pieną padarė pastebimus pokyčius pieno klampas kreivėms (žr. 7 pav. B). Didinant ekstrakto kiekį mišinyje, jo klampa didėjo ir didžiausia klampa pastebėta esant didžiausiam (0,75%) DMM ekstrakto kiekiui mišinyje (M-DMM-3 mėginys), kurio klampas koeficientas $K = 0,0125 \pm 0,001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Kiek kitokie rezultatai gauti užrašant pieno mišinio su vynuogių ekstraktu klampas kreives. Didinant ekstrakto kiekį mišinyje iki 0,5 %, mišinio klampa didėjo, tačiau įdėjus 0,75 % VSE, mišinio klampa sumažėjo. Be to, didelės visų mėginių n vertės (0,90–1,18) reiškia mažą mėginių pseudoplastiškumą ir tai, kad pieno mišinių su

ekstraktais reologinės charakteristikos buvo artimos Niutoniniams skysčiams, o tai užtikrina didesnę koloidinės sistemos stabilumą.



7 pav. Pieno mišinių su ekstraktais klampos kreivės, esant skirtingomis spanguolių ekstraktų (A, B, C) ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto (D) koncentracijomis (M-0 – pienas be ekstrakto, M-MMM-1, M-DMM-1, M-SEN-1, M-VSE-1 – pienas su 0,25 % ekstrakto, M-SEN-2, M-VSE-2 – pienas su 0,5 % ekstrakto, M-MMM-3, M-DMM-3, M-SEN-3, M-VSE-3 – pienas su 0,75 % ekstrakto)

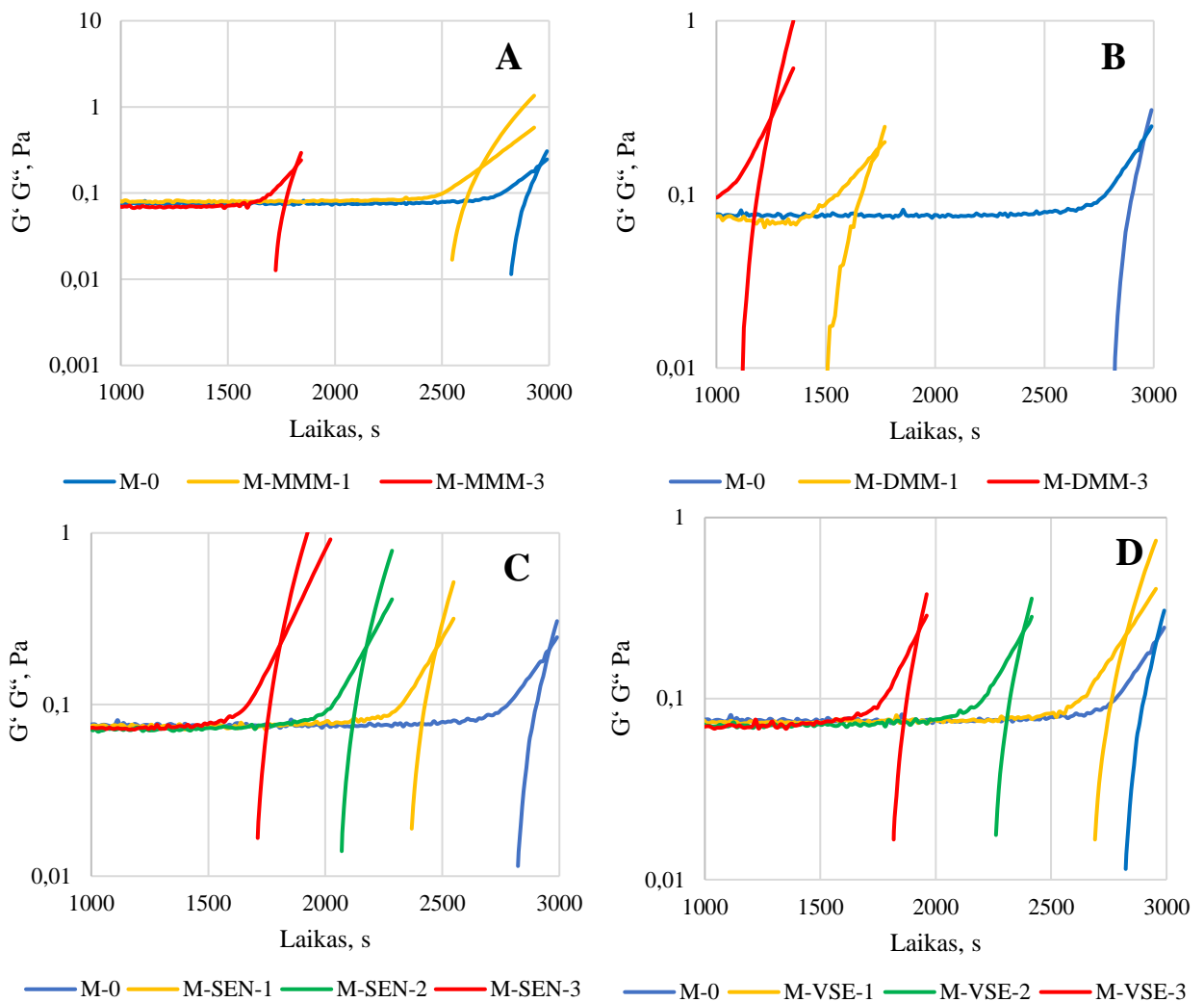
6 lentelė. Pieno mišinių su ekstraktais reologinių charakteristikų priklausomybė nuo ekstraktų ir jų koncentracijos pieno mišinyje

Mėginys	K (Pa·s)	n	R ²
M-0	0,0047 ± 0,001	0,9541 ± 0,001	0,9923 ± 0,000
M-MMM-1	0,0031 ± 0,005	1,1405 ± 0,001	0,9900 ± 0,000
M-MMM-3	0,0027 ± 0,003	1,1829 ± 0,001	0,9977 ± 0,001
M-DMM-1	0,0098 ± 0,001	0,9277 ± 0,001	0,9983 ± 0,001
M-DMM-3	0,0125 ± 0,001	0,9090 ± 0,002	0,9987 ± 0,002
M-SEN-1	0,0040 ± 0,002	0,9795 ± 0,005	0,9947 ± 0,001
M-SEN-2	0,0039 ± 0,001	0,9538 ± 0,001	0,9916 ± 0,000
M-SEN-3	0,0049 ± 0,003	0,9831 ± 0,001	0,9946 ± 0,001

Mėginys	K (Pa·s)	n	R ²
M-VSE-1	0,0067 ± 0,000	0,9520 ± 0,001	0,9992 ± 0,001
M-VSE-2	0,0057 ± 0,000	0,9594 ± 0,003	0,9986 ± 0,002
M-VSE-3	0,0045 ± 0,002	0,9568 ± 0,001	0,9939 ± 0,002

Kadangi buvo nustatyta, kad kai kurie ekstraktai slopinančiai veikia jogurto gamyboje naudojamo pieno rūgšties raugo bakterijas, buvo svarbu įvertinti ekstraktų poveikį pieno rūgštinio gelio (rūgštinės baltymų koaguliacijos) susidarymui. Rūgštinio gelio susidarymas buvo matuojamas reologiškai kaip laikas nuo glukono-delta-laktono (GDL) įdėjimo į mėginį iki modulių G' ir G'' susikirtimo ($G' = G''$). Iš 8 paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad didinant spanguolių ir vynuogių sėklų ekstraktų kiekius mišinyje su pienu, žymiai sutrumpėjo pieno rūgštinio gelio susidarymo trukmė. Trumpiausias gelio susidarymo laikas nepriklausomai nuo ekstrakto rūšies buvo pieno mišinių su 0,75 % ekstrakto, o pienui be ekstrakto koaguliuoti reikėjo 2955 s. Labiausiai rūgštinės koaguliacijos greičiu išsiskyrė pieno mišiniai su DMM ekstraktu, t. y. M-DMM-3 mėginys koaguliavo per 1250 s, o M-DMM-1 – per 1750 s (žr. 8 pav. B). Pieno mišinių su MMM ekstraktu koaguliacijos laikas labai nesiskyrė nuo pieno mišinių su komerciniu vynuogių sėklų (VSE) ir nefrakcionuotu spanguolių (SEN) ekstraktais. Galima manyti, kad greitesniam gelio susidarymui turėjo įtakos fenolinių junginių oligomerai, kurių daugiausia buvo DMM ekstrakto. Gauti duomenys prieštarauja mokslininkų gautiems rezultatams, kurie tyrė vynuogių ekstrakto įtaką rūgštinio pieno gelio susidarymui, ir nustatė, kad didinant uogų priedo koncentraciją nuo 1,5 g/L iki 3,0 g/L, rūgštinės baltymų koaguliacijos laikas ilgėja [118]. Kwon'as ir kt. taip pat tyrė fenolinių junginių turinčių ispaninio šalavijo sėklų ekstraktą ir nustatė, kad didinant vandeninio ar etanolinio sėklų ekstrakto kiekį piene nuo 0,05 % iki 0,1 %, rūgštinės koaguliacijos trukmė trumpėja [119] lygiai taip pat kaip pieną praturtinus pasiflorų sultimis [120].

Pieno baltymų rūgštinės koaguliacijos metu pH mažėjimas sukelia laipsnišką kalcio ir neorganinio fosfato tirpimą kazeino micelėse. Bendrasis neigiamas kazeino micelių krūvis neutralizuojamas ir tai lemia baltymų agregaciją [121]. Žinoma, kad net nedidelis pH sumažėjimas turi lemiamos įtakos baltymų dalelių krūvio pasikeitimui, o tai silpnina jų koloidinį stabilumą [122]. Kadangi į pieną dedamų ekstraktų pH buvo labai mažas (pH 2,3–2,5), pieno mišinių su ekstraktais pH pradėjo mažėti anksčiau, palyginti su sistema be ekstrakto. Galima manyti, kad tai galėjo būti pagrindinė pastebėto pieno baltymų rūgštinės koaguliacijos proceso sutrumpėjimo priežastis. Atlikto tyrimo ir kitų mokslininkų gautų rezultatų skirtumų priežastimi galėjo būti pieno baltymų koaguliacijos trukmės nustatymui naudoti metodai. Šiame tyrime mišinio pH laipsniškas mažėjimas buvo dėl įdėto GDL, o cituojamuose darbuose tyrėjai naudojo pieno rūgšties kultūras pieno pH mažinimui. Mokslinėje literatūroje galim rasti duomenų, kad pienas, parūgštintas pieno rūgštimi produkuojama pieno rūgšties bakterijomis, sudarė silpnesnius gelius ir reikėjo ilgesnės trukmės palyginti su rūgštiniais geliais, pagamintais pridėdant GDL [123]. Pasirinkimą šiame tyrime pH mažinimui naudoti GDL, nulėmė noras išvengti kultūrų aktyvumo pokyčių ir padermių skirtumų, kurie galėtų turėti didelį poveikį rūgštinio gelio susidarymui.



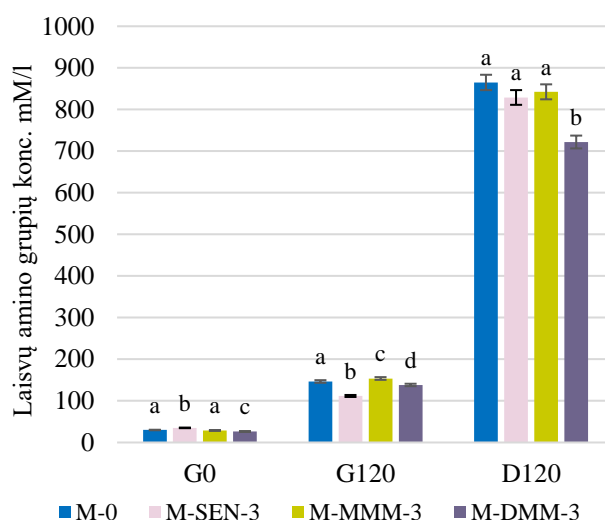
8 pav. Pieno baltymų rūgštinės koaguliacijos trukmė pieno mišiniuose su skirtingomis spanguolių ekstraktu (A, B, C) ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto (D) koncentracijomis (M-0 – pienas be ekstrakto, M-MMM-1, M-DMM-1, M-SEN-1, M-VSE-1 – pienas su 0,25 % ekstrakto, M-SEN-2, M-VSE-2 – pienas su 0,5 % ekstrakto, M-MMM-3, M-DMM-3, M-SEN-3, M-VSE-3 – pienas su 0,75 % ekstrakto)

3.3. Pieno mišinių su ekstraktais virškinamumas

Kaip parodė pieno mišinių su spanguolių ir vynuogių ekstraktais fizikinių savybių tyrimų rezultatai, nustatyti pieno koloidinės sistemos pokyčiai galimai įvyko dėl susidariusių kompleksų tarp pieno baltymų ir ekstraktuose esančių fenolinių junginių. Galima manyti, kad šie pokyčiai turės įtakos tokių sistemų virškinamumui. Todėl kitame eksperimento etape buvo nustatytas pieno mišinių su didžiausiu spanguolių ekstraktų kiekiu (0,75 %) virškinamumas *in vitro*. Šiame tyrime buvo imituotas pieno mišinių su ekstraktais virškinimas skrandyje (120 min.) bei plonojoje žarnoje (120 min.). Mėginiai analizuoti virškinimo skrandžio fazės pradžioje (G0) ir pabaigoje (G120) bei virškinimo plonosios žarnos fazės pabaigoje (D120). Virškinimo metu pieno baltymai hidrolizuojami virškinamajame trakto esančių fermentų dėl ko susidaro mažesnės molekulinės masės junginiai – peptidai ir aminorūgštys. Jų kiekis virškinimo trakto skysčiuose buvo nustatytas kaip laisvųjų α -amino grupių koncentracija virškinimo sultyse (žr. 9 pav.). Taip pat buvo analizuojamas fenolinių junginių išsiskyrimas į virškinimo sultis (žr. 10 pav.) ir skaičiuojamas jų biologinio prieinamumo indeksas (žr. 8 lentelę). Gauti rezultatai palyginti su fenolinių junginių išsiskyrimu į virškinimo sultis, virškinant ekstraktų vandeninius tirpalus.

Laisvų α -amino grupių susidarymas virškinant pieno mišinius su skirtingais spanguolių ekstraktais (0,75 %) ir pienu be ekstrakto (kontrolinis mėginys) parodytas 9 paveiksle. Iš pateiktų duomenų galima matyti, kad skrandžio virškinimo fazės pradžioje (G0) laisvų α -amino grupių kiekis mėginiuose svyravo ribose tarp $26,35 \pm 0,66$ ir $35,10 \pm 0,60$ mM/l. Apskaičiavus baltymų hidrolizės laipsnį, nustatyta, kad virškinimo pradžioje jis buvo labai mažas t. y. tarp $0,56 \pm 0,01$ ir $0,75 \pm 0,01$ % (žr. 7 lentelę). Praėjus 120 min. po virškinimo skrandyje (G120) pastebėtas reikšmingas skirtumas tarp laisvų α -amino grupių kiekio pieno mišiniuose su spanguolių ekstraktais ir kontroliniame mėginyje (be ekstrakto). Daugiausiai laisvų amino grupių t. y. $153,76 \pm 1,29$ mM/l, rasta virškinant pieno mišinį su MMM ekstraktu, tuo tarpu virškinant kontrolinį mėginį skrandžio fazės pabaigoje nustatyta $146,60 \pm 3,16$ mM/l. Kaip ir buvo tikėtasi, visų mėginių amino grupių kiekis skrandžio fazės pabaigoje (G120) reikšmingai padidėjo, lyginant su jų kiekiu G0 taške, t. y. virškinimo pradžioje. Baltymų hidrolizės laipsnis virškinimo skrandyje pabaigoje taip pat padidėjo. Iš 7 lentelės duomenų galima matyti, kad kontroliniame mėginyje bei pieno mišinyje su MMM ekstraktu baltymų hidrolizės laipsnis buvo didesnis lyginant su M-DMM-3 ir M-SEN-3 mėginiais.

Plonajame žarnyne vyksta didžioji dalis baltymų virškinimo, todėl pastebimas intensyvesnis laisvų α -amino grupių išsiskyrimas į virškinimo sultis bei didžiausias baltymų hidrolizės laipsnis (žr. 7 lentelę). Žarnyno hidrolizės metu, kasos fermentas pankreatinas ir tulžies druskos hidrolizuoja skrandyje susidariusius polipeptidus į tripeptidus, dipeptidus ir į atskiras amino rūgštis [124]. Iš 9 paveikslo galima matyti, kad pieno mišiniui su DMM ekstraktu virškinimo pabaigoje būdingas mažiausias proteolizės produktų kiekis – laisvų α -amino grupių koncentracija šiame mėginyje buvo $721,91 \pm 9,62$ mM/l, o baltymų hidrolizės laipsnis – $15,41 \pm 0,21$ %. Kontrolinio mėginio virškinimo pabaigoje nustatytas didesnis laisvų α -amino grupių kiekis – $865,02 \pm 19,57$ mM/l ir didesnis baltymų hidrolizės laipsnis – $18,47 \pm 0,42$ %. Tokie tyrimo rezultatai gali būti susiję su stabilių baltymų-polifenolių kompleksų formavimu, kurių metu tarp baltymų ir fenolinių junginių susidaro kovalentiniai ir / ar nekovalentiniai ryšiai. Tokią pačią tendenciją pastebėjo mokslininkai analizavę taninų įtaką baltymų virškinamumui. Manoma, kad pieno sistemoje esantys polifenoliai slopino katalizinį virškinimo fermentų aktyvumą [125] ar net susidarė polifenolių-fermentų sąveika, kurios metu pasikeitė fermentų molekulinė konfigūracija [126]. Analizuojant pieno mišinių su MMM ir SEN spanguolių ekstraktais baltymų virškinamumo duomenis D120 fazėje matome, kad šie ekstraktai neturėjo reikšmingos įtakos ($p > 0,05$) laisvų α -amino grupių susidarymui lyginant su kontroliniu mėginiu. Baltymų hidrolizės laipsnis šių mėginių virškinimo pabaigoje buvo $17,99 \pm 0,27$ % ir $17,70 \pm 0,51$ %, t. y. kiek mažesnis nei kontrolinio mėginio, tačiau gerokai didesnis lyginant su M-DMM-3 mėginiu.



9 pav. Laisvų α -amino grupių koncentracijos kitimas pieno mišinių su skirtingais spanguolių ekstraktais virškinimo metu: G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D120 – žarnyno fazė 120 min. (M-0 – pienas be ekstrakto, M-SEN-3 – pienas su 0,75 % nefrakcionuoto spanguolių ekstrakto, M-MMM-3 – pienas su 0,75 % mažos molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstrakto, M-DMM-3 – pienas su 0,75 % didelės molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstrakto). Vertės pateikiamos kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis; raidės rodo reikšmingus pagal Studento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant mėginius tame pačiame virškinimo proceso taške

7 lentelė. Pieno mišinių su skirtingais spanguolių ekstraktais baltymų hidrolizės laipsnio kitimas virškinimo metu

Virškinimo fazė	Hidrolizės laipsnis, %			
	M-0	M-SEN-3	M-MMM-3	M-DMM-3
G0	$0,64 \pm 0,02^a$	$0,75 \pm 0,01^b$	$0,62 \pm 0,03^a$	$0,56 \pm 0,01^c$
G120	$3,13 \pm 0,07^a$	$2,39 \pm 0,05^b$	$3,28 \pm 0,03^c$	$2,95 \pm 0,05^d$
D120	$18,47 \pm 0,42^a$	$17,70 \pm 0,51^a$	$17,99 \pm 0,27^a$	$15,41 \pm 0,21^b$

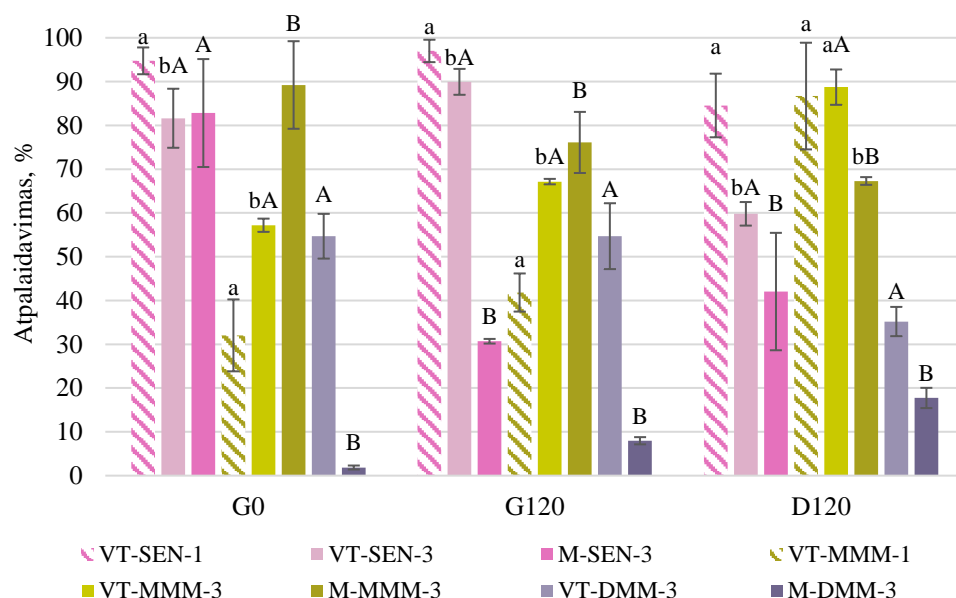
Kadangi fenoliniai junginiai laikomi vienais nestabiliausių junginių maiste ir jų kiekis virškinimo metu gali pasikeisti, svarbu nustatyti, ar galimas jų kompleksų su baltymais susidarymas ekstraktų mišinyje su pienu gali apsaugoti šiuos junginius nuo nepalankių virškinimo sąlygų skrandyje ir pagerinti polifenolių išsiskyrimą žarnyne. 10 paveiksle pateikti duomenys apie virškinimo *in vitro* poveikį spanguolių ekstraktų fenolinių junginių atpalaidavimo dinamikai iš ekstrakto vandeninio tirpalo ir ekstrakto mišinio su pienu. Galima manyti, kad *in vitro* virškinimo metu pieno baltymai ir MMM frakcijų spanguolių ekstrakto esantys fenoliniai junginiai sudarė silpnus kovalentinius ryšius dėl ko G0 ir G120 fazėje jų atsipalaidavo daugiau iš ekstrakto ir pieno mišinio t. y. $89,22 \pm 10,01$ % ir $76,10 \pm 6,98$ %, nei iš vandeninio tirpalo ($57,19 \pm 1,51$ % ir $67,15 \pm 0,62$ %). Pagal Gonzalez'ą ir kt. [127] po virškinimo skrandyje didesnis fenolinių junginių kiekis galėjo atsirasti todėl, kad buvo nutraukti šių junginių ryšiai su baltymais dėl rūgštinio pH ir fermentų aktyvumo, kuris padidino polifenolių išsiskyrimą iš maisto matricos. Tačiau galutiniame virškinimo taške fenolinių junginių BI rodo, kad iš pieno baltymų matricos fenolinių junginių išsiskyrė mažiau nei po 120 min. skrandyje, t. y. 67,29 % (žr. 8 lentelę). Fenolinių junginių išsiskyrimo sumažėjimas D120 fazėje rodo, kad maisto matrica buvo veikiamą virškinimo trakto sąlygų dėl ko dalis polifenolių virto skirtingomis struktūrinėmis formomis, turinčiomis skirtingas chemines savybes, biologinį aktyvumą ir prieinamumą [127]. Taigi, stebint fenolinių junginių išsiskyrimo dinamiką virškinimo proceso metu

galima pastebėti, kad fitocheminių medžiagų atsipalaidavimas iš vandeninių tirpalų didėjo, o iš pieno mišinių mažėjo.

Statistiškai reikšmingo ($p < 0,05$) skirtumo nepastebėta G0 fazėje VT-SEN-3 mėginį lyginant su M-SEN-3. Šių mėginių fenolinių junginių atsipalaidavimas svyravo nuo $81,62 \pm 6,74$ % iki $82,81 \pm 12,33$ %. Tačiau pieno mišinio su SEN mėginys G120 ir D120 taške parodė žymiai ($p < 0,05$) mažesnę išsiskyrusių fenolinių junginių kiekį ($30,70 \pm 0,53$ % ir $42,04 \pm 0,70$ %) lyginant su vandeniniu tirpalu, praturtintu SEN. Pastarojo mėginio BI buvo 59,80 %, o mišinio su 0,75 % SEN – 42,05 % (žr. 8 lentelę). Be to, BI rodo tam tikro junginio, ištirpusio plonosios žarnos sultyse, kiekį, kurį organizmas gali absorbuoti. Vadinasi, tai yra labai svarbu, nes junginiai, išsiskyrę iš maisto matricos ir stabilūs virškinamo trakto, gali būti biologiškai prieinami ir turėti teigiamą poveikį virškinimo traktui [128]. Lyginant polifenolių atpalaidavimo dinamiką virškinimo proceso pradžioje ir pabaigoje galima pastebėti, kad fenolinių junginių išsiskyrimas procentais sumažėjo.

Virškinant *in vitro* DMM junginių ekstrakto mišinį su pienu, nustatyta, kad fenolinių junginių atsipalaidavo žymiai ($p < 0,05$) mažiau nei iš to paties ekstrakto vandeninio tirpalo. Pavyzdžiui, G0 ir D120 fazėje iš VT-DMM-3 atsipalaidavo $54,70 \pm 5,10$ % ir $35,20 \pm 3,34$ %, o iš M-DMM-3 atitinkamai $1,85 \pm 0,45$ % ir $17,74 \pm 2,31$ %. Šie VT-DMM-3 mėginio atpalaidavimo skaičiai taip pat rodo mažėjančią fenolinių junginių išsiskyrimo tendenciją virškinimo proceso metu, priešingai nei su M-DMM-3 mėginiumi, kurio dinamika didėjo. Analogiškus tyrimo rezultatus gavo Portugalijos mokslininkai, kurie analizavo pieno baltymų įtaką braškių ir persikų fenolinių junginių biologiniam prieinamumui virškinimo *in vitro* metu ir nustatė, kad baltymų matrica stabdė polifenolių atsipalaidavimą [129]. Pavyzdžiui, iš braškių fenolinių junginių ir baltymų komplekso katechino atsipalaidavo 47 %, o elaginės rūgšties 3 % mažiau. Gautos skirtingos apskaičiuotos BI reikšmės, pvz., tarp M-DMM-3 ir M-MMM-3, įrodo, kad baltymai ir fenoliniai junginiai formavo skirtingą baltymo-polifenolio kompleksą [130].

Iš 10 paveiksle pateiktų duomenų galima matyti kaip fenoliniai junginiai atsipalaidavo iš skirtingos koncentracijos vandeninių tirpalų ir mišinių su pienu virškinimo *in vitro* metu. Visose virškinimo fazėse iš vandeninio 0,75 % SEN tirpalo išsiskyrė mažiau fenolinių junginių nei iš vandeninio 0,25 % SEN tirpalo. Fenolinių junginių atpalaidavimo rezultatų dinamika virškinimo metu rodo, kad G120 taške iš VT-SEN-1 ir VT-SEN-3 mėginių fitocheminių medžiagų išsiskyrė nežymiai daugiau, atitinkamai $97,00 \pm 2,56$ % ir $89,94 \pm 2,96$ %, nei G0 taške ($94,73 \pm 3,06$ % ir $81,62 \pm 6,74$ %), tačiau virškinimo proceso pabaigoje fenolinių junginių atpalaidavimas gerokai sumažėjo. Analizuojant apskaičiuotą vandeninių tirpalų su 0,25 % ir 0,75 % SEN bioprieinamumo indeksą pastebėta, kad didėjant ekstrakto koncentracijai tirpale šio rodiklio vertė sumažėjo, atitinkamai buvo gauta 84,54 % ir 59,80 %. Tiriant fenolinių junginių atpalaidavimą iš skirtingos koncentracijos vandeninių MMM frakcijų tirpalų, nustatyta, kad pirmoje virškinimo skrandyje fazėje (G0) iš VT-MMM-1 ir VT-MMM-3 mėginių fenolinių junginių atsipalaidavo nuo $32,04 \pm 8,21$ % iki $57,19 \pm 1,51$ %. 0,25 % ir 0,75 % koncentracijos MMM ekstrakto bioprieinamumo indekso reikšmės labai panašios, t. y. VT-MMM-1 mėginio BI = 88,69 %, o VT-MMM-3 – 88,73 %.



10 pav. Virškinimo *in vitro* įtaka spanguolių ekstraktų fenolinių junginių atpalaidavimo dinamikai iš ekstrakto vandeninio tirpalo ir ekstrakto mišinio su pienu: G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D120 – žarnyno fazė 120 min. Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; mažosios raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant vandeninius tirpalus su vienodu spanguolių ekstraktu tarp skirtingų koncentracijų tame pačiame virškinimo proceso taške; didžiosios raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant vandeninio tirpalo ir pieno mišinio mėginius su vienodu spanguolių ekstraktu ir jo koncentracija tame pačiame virškinimo proceso taške

8 lentelė. Skirtingų spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų ir jų mišinių su pienu fenolinių junginių bei proantocianidinų bioprieinamumo indeksas

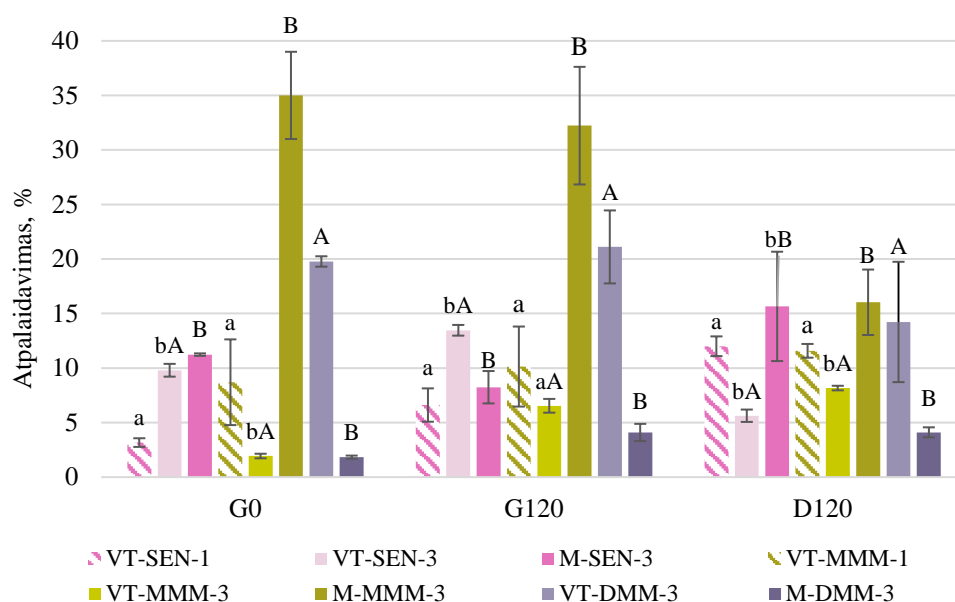
	Spanguolių ekstrakto vandeniniai tirpalai				
	VT-SEN-1	VT-SEN-3	VT-MMM-1	VT-MMM-3	VT-DMM-3
Fenolinių junginių BI, %	84,54	59,80	86,69	88,73	35,20
Proantocianidinų BI, %	12,00	5,63	11,57	8,16	14,23
	Spanguolių ekstrakto mišiniai su pienu				
	M-SEN-3		M-MMM-3	M-DMM-3	
Fenolinių junginių BI, %	42,04		67,30	17,74	
Proantocianidinų BI, %	15,65		16,03	4,10	

Taip pat buvo nustatyta PAC atpalaidavimas virškinimo *in vitro* metu iš skirtingų spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų ir jų mišinių su pienu, keičiant jų koncentracijas (žr. 11 pav.). Pirmiausia, buvo palygintas išsiskyres PAC kiekis, rastas virškinimo sultyse, tarp vandeninių 0,75 % SEN tirpalo ir tos pačios koncentracijos ekstrakto mišinio su pienu. Virškinimo *in vitro* proceso pradžioje iš VT-SEN-3 PAC atsipalaidavo statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) daugiau lyginant su M-SEN-3 mėginiu. Šiuose mėginiuose fitocheminių medžiagų kiekis procentais kito nuo $9,80 \pm 0,59$ % iki $11,23 \pm 0,11$ %. Po 120 min. virškinimo skrandyje PAC iš M-SEN-3 mėginio atsipalaidavo mažiau nei iš VT-SEN-3, o po 120 min. virškinimo žarnyne ši tendencija pasikeitė, t. y. PAC atpalaidavimas iš SEN ir pieno mišinio žymiai padidėjo, lyginant su jų atpalaidavimu iš vandens tirpalo ($p < 0,05$). Pagal 8 lentelėje pateiktus duomenis VT-SEN-3 mėginio bioprieinamumo indeksas buvo 5,63 %, o M-SEN-3–15,65 %. Labai panašios BI reikšmės buvo gautos VT-MMM-3 ir M-MMM-3 mėginių, atitinkamai

8,16 % ir 16,03 %. Analogiškas tyrimo tendencijas gavo mokslininkai, analizavę kurkumino ar mėlynių PAC bioprieinamumą ir nustatė, kad atitinkamai sojos ir žirnių baltymai turėjo teigiamos įtakos biologiniam prieinamumui lyginant su vandeniniu kurkumino ar mėlynių PAC tirpalu [131, 132]. Catalkaya'as ir kt. [133] moksliniame straipsnyje teigė, kad kai kurie polifenoliai, pavyzdžiui, antocianinai, kurių gausu MMM frakcijų ekstrakte, gali būti suskaldomi prieš absorbciją, todėl biologinio prieinamumo indeksas dažniausiai būna < 10 %. PAC atpalaidavimo dinamika virškinimo *in vitro* metu iš mėginio M-MMM-3 mažėjo, priešingai nei iš vandeninio tirpalo su 0,75 % MMM frakcijų ekstraktu.

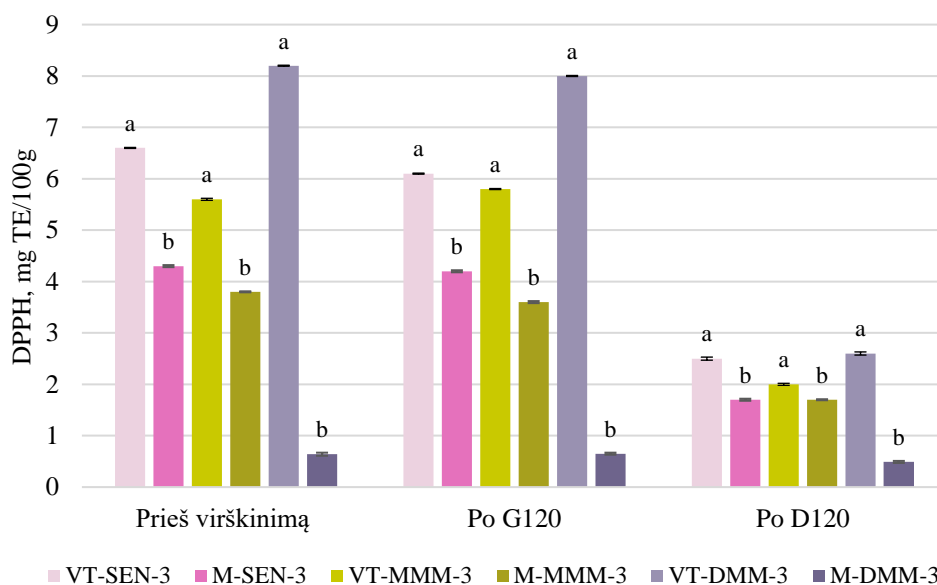
Didžiausias PAC bioprieinamumo indeksas buvo nustatytas vandeniniam 0,75 % spanguolių ekstraktų tirpalui VT-DMM-3 – 14,23 %, o mažiausias pieno mišiniui M-DMM-3 BI = 4,10 % (žr. 8 lentelę). Galima manyti, kad DMM ekstrakte esantys PAC su pieno baltymais sudarė sunkiai virškinamą kompleksą, todėl virškinimo metu PAC atsipalaidavo mažiau nei iš vandeninio spanguolių ekstrakto tirpalo. Teiginį, kad kazeino micelių ir polifenolių sąveika turi įtakos fenolinių junginių atsipalaidavimui, taip pat patvirtino Kostic'as ir kt. [134], kurie nustatė, kad nugriebto ožkos pieno praturtinimas žiedadulkėmis žymiai sumažino polifenolių ir flavonoidų kiekį. O Catalkaya'as ir kt. [133] teigė, kad virškinimo fermentai ir maisto matricos savybės gali labai paveikti fenolinių junginių biologinį prieinamumą. Be to, šarminėmis sąlygomis polifenoliai galėjo oksidotis iki o-chinono, kuris kovalentiškai prisijungė prie baltymų amino rūgščių liekanų ir todėl turėjo įtakos mažesniai PAC atpalaidavimui iš mišinio nei iš vandeninio tirpalo [99]. Virškinimo *in vitro* metu VT-DMM-3 mėginio PAC atpalaidavimo dinamika, lyginant G0 ir D120 taške, sumažėjo, o M-DMM-3 – nežymiai padidėjo.

Apžvelgiant į spanguolių ekstrakto skirtingos koncentracijos įtaką PAC atpalaidavimui, galima pastebėti, kad tendencijos labai skirtingos įvairiuose skrandžio virškinimo etapuose. Pavyzdžiui, G0 taške iš VT-SEN-1 mėginio PAC atsipalaidavo $3,17 \pm 0,40$ %, o VT-SEN-3 – $9,80 \pm 0,59$ %, priešingai nei iš vandeninių tirpalų su 0,25 % ir 0,75 % MMM frakcijų ekstraktu. Pastarųjų mėginių PAC atpalaidavimas po 0 min. skrandyje atitinkamai kito nuo $8,70 \pm 3,93$ % iki $1,93 \pm 0,21$ %. Bioprieinamumo indeksai rodo, kad plonajame žarnyne PAC pasisavinamumo tendencija tarp VT-MMM-1 ir VT-MMM-3 bei tarp VT-SEN-1 ir VT-SEN-3 mėginių tapo vienoda, t. y. didinant ekstrakto kiekį, mažėjo BI atitinkamai nuo 11,57 % iki 8,16 % ir nuo 12,00 % iki 5,63 %. Galima manyti, kad labai mažos BI vertės reiškia, kad polifenoliai sureagavo su virškinimo trakte esančiais junginiais, o tai lėmė netirpių kompleksų susidarymą dėl ko neigiamai paveikė PAC pasisavinamumą [91].



11 pav. Virškinimo *in vitro* įtaka spanguolių ekstraktų proantocianidinų atpalaidavimo dinamikai iš ekstrakto vandeninio tirpalo ir ekstrakto mišinio su pienu: G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D120 – žarnyno fazė 120 min. Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; mažosios raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant vandeninius tirpalus su vienodu spanguolių ekstraktu tarp skirtingų koncentracijų tame pačiame virškinimo proceso taške; didžiosios raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant vandeninio tirpalo ir pieno mišinio mėginius su vienodu spanguolių ekstraktu ir jo koncentracija tame pačiame virškinimo proceso taške

Kaip buvo paminėta literatūros apžvalgoje uogų ekstraktų fenoliniai junginiai pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis ir nauda sveikatai, nes suriša laisvuosius radikalus organizme, todėl buvo svarbu nustatyti, kaip virškinimo *in vitro* metu keičiasi ekstraktų vandeninių tirpalų ir jų mišinių su pienu antioksidacinės savybės. Iš 12 paveiksle pateiktos diagramos matyti, kad skirtingų spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų ir jų mišinių su pienu antioksidacinis aktyvumas mažėjo virškinimo *in vitro* metu. Vienodos tendencijos gautos lyginant vandeninių tirpalų ir mišinių su pienu mėginius esant skirtingiems spanguolių ekstraktams, t. y. pieno baltymai turėjo statistiškai reikšmingos ($p < 0,05$) įtakos stabdant skirtingų spanguolių ekstraktų fenolinių junginių antioksidacines savybes visuose virškinimo taškuose. Detaliau aptariant VT-SEN-3 ir M-SEN-3 mėginius, galima matyti, kad prieš virškinimą atitinkamai nustatytas DPPH radikalų surišimas $6,6 \pm 0,01$ ir $4,3 \pm 0,02$ mg TE/100 g, o virškinimo *in vitro* pabaigoje – $2,5 \pm 0,03$ ir $1,7 \pm 0,02$ mg TE/100 g. Labai panašus antioksidacinis aktyvumas D120 taške nustatytas VT-MMM-3 ir M-MMM-3 mėginiuose atitinkamai $2,00 \pm 0,02$ ir $1,7 \pm 0,01$ mg TE/100 g. Makori'as ir kt. [42] teigė, kad kuo didesnė fenolinių junginių molekulinė masė, tuo stipresnės jų antioksidacinės savybės. Šį mokslininkų teiginį patvirtino gauti tyrimo rezultatai su DMM ekstrakto vandeniniu tirpalu. Nors virškinimo metu VT-DMM-3 mėginio antioksidacinės savybės mažėjo, tačiau lyginant su kitais spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų mėginiais, DPPH radikalų surišimas buvo didžiausias. Prieš virškinimą buvo nustatyta $8,2 \pm 0,01$ mg TE/100g, po 120 min. skrandyje ir plonajame žarnyne atitinkamai $8,00 \pm 0,01$ mg TE/100g ir $2,60 \pm 0,03$ mg TE/100g. Priešingai, mažiausias antioksidacinis aktyvumas tarp ekstraktų ir pieno mišinių nustatytas mėginio su DMM ekstraktu. Kaip literatūros apžvalgoje paminėta, kad kuo didesnė fenolinio junginio molekulinė masė tuo stabilesnis polifenolių-baltymų kompleksas susidaro [49]. Todėl virškinimo *in vitro* metu iš M-DMM-3 mėginio atsipalaidavo mažas kiekis fenolinių junginių dėl ko antioksidacinis aktyvumas taip pat buvo mažas.



12 pav. Virškinimo *in vitro* įtaka spanguolių ekstraktų vandeninių tirpalų ir ekstraktų mišinių su pienu antioksidaciniam aktyvumui: G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D120 – žarnyno fazė 120 min. Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant vandeninio tirpalo ir pieno mišinio mėginius su vienu spanguolių ekstraktu tame pačiame virškinimo proceso taške

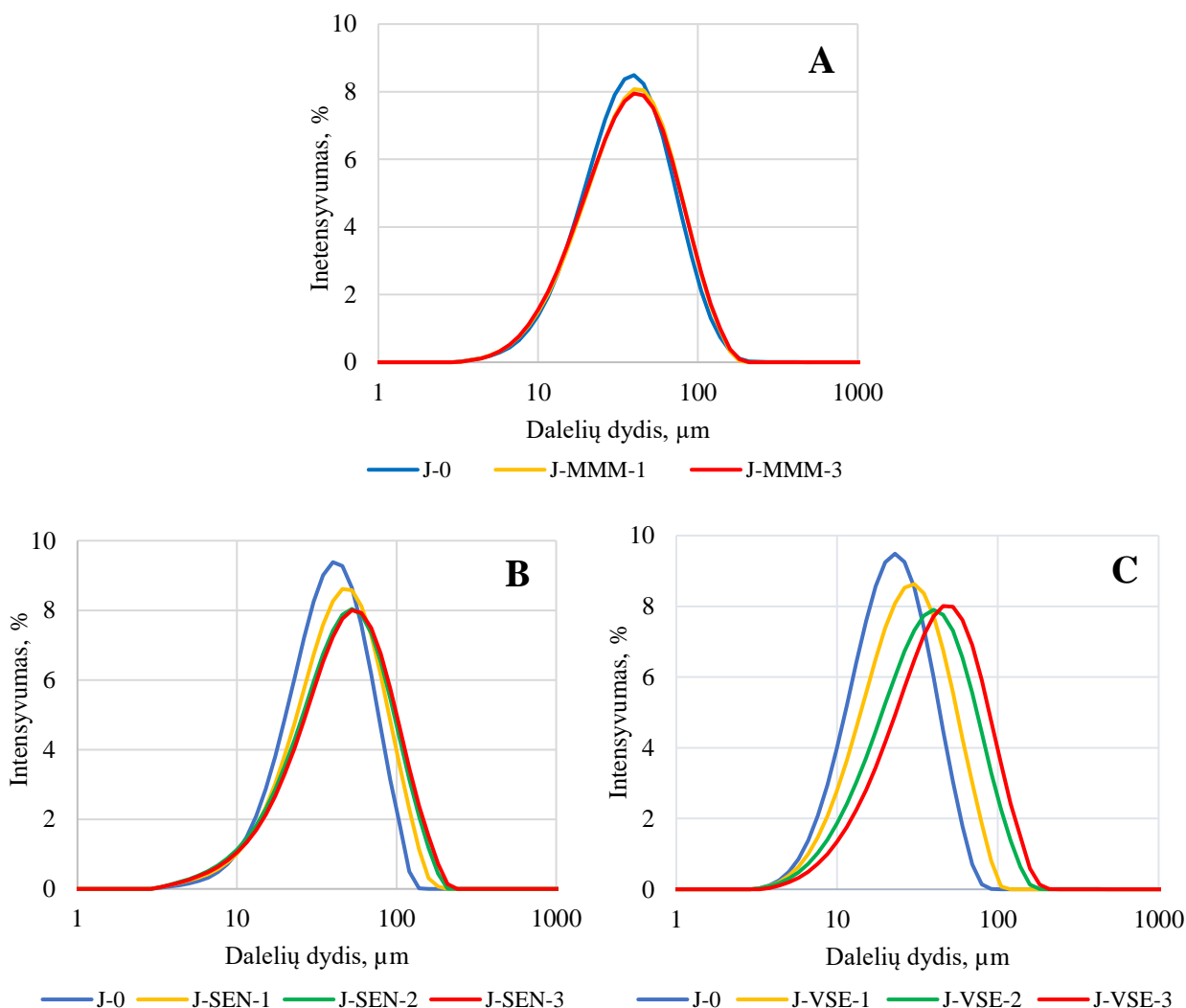
3.4. Skirtingais ekstraktais praturtinto jogurto fizikinės cheminės savybės

Kitame tyrimų etape buvo nustatyta iš pieno mišinio su spanguolių ekstraktais pagaminto jogurto fizikinės cheminės savybės. Jogurto gamybai buvo panaudota tradicinė technologija, kai pienas surauginamas *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* bakterijomis. Vykstant fermentacijai laktozė virsta pieno rūgštimi, pH laipsniškai mažėja ir pasiekus baltymų izoelektrinį tašką pH 4,6 iš agreguotų baltymų dalelių formuojamas gelis savo struktūroje sulaikantis vandenį. Produkto stabilumas laikymo metu priklauso nuo rūgštinio gelio struktūros pokyčių.

Pagal Tabasco‘ą ir kt. [116] vynuogių sėklų ekstrakto fenolinių junginių monomerai ir oligomerai slopino *S. Thermophilus* pieno rūgšties bakterijas fermentuotame piene. Toks mokslininkų teiginys prieštarauja šiame tyrime gautiems rezultatams, kurie parodė, kad pienas, praturtintas komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu, suformavo rūgštinę sutrauką naudojant *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ir *Streptococcus thermophilus* bakterijų raugą, priešingai nei pieno mišinys su DMM frakcijų spanguolių išspaudų ekstraktu. Dėl to tolimesni tyrimai buvo atlikti naudojant mažos molekulinės masės proantocianidinų ir nfracionuotą spanguolių ekstraktus bei komercinį vynuogių sėklų ekstraktą.

Jogurtas yra rūgštus pieno gelis, kuriame kazeino micelės agreguojasi ir formuoja tinklą, įtraukiantį serumą. Išrūgų baltymai, termiškai denatūruoti $95 \pm 0,5$ °C temperatūroje 5 min., formuoja kompleksus su κ -kazeinu. Dėl susidariusių organinių rūgščių rauginant pieną iš kazeino micelių atskyla kalcis ir kalcio fosfatas, tačiau baltymų dydis nepakinta. Artėjant prie kazeino izoelektrinio taško (pH $4,6 \pm 0,05$) elektrostatiniai atstumai tarp pieno baltymų mažėja ir jie agreguojasi į tinklą [117]. Galima daryti prielaidą, kad pieno praturtinimas fenolinių junginių ekstraktu prieš kazeino tinklo susidarymą gali pakeisti jogurto fizikines-chemines savybes.

Šią hipotezę patvirtino gauti tyrimo rezultatai, pateikti 13 paveiksle B ir C, rodantys dalelių dydžio pasiskirstymo pokyčius jogurte, pagamintame iš nefracionuoto spanguolių išspaudų ekstrakto ir komercinio vynuogių sėklų ekstrakto. Mėginių su šiais ekstraktais dalelių dydžio pasiskirstymo kreivių pasislinkimas į dešinę pusę rodo, kad net nedideli šių ekstraktų kiekiai (0,25 %) turėjo įtakos baltymų dalelių dydžiui, o reikšmingas skirtumas pastebėtas pridėjus didžiausią ekstrakto kiekį (0,75 %). Kadangi jogurto su MMM ekstraktu kreivės persidengia, vadinasi šio ekstrakto 0,25 % ir 0,75 % koncentracija neturėjo reikšmingo skirtumo kazeino dalelių pasiskirstymui (žr. 13 pav. A). Kontrolės, J-MMM-1 ir J-MMM-3 mėginių baltymų dalelės buvo užregistruotos intervale nuo ~5 μm iki ~210 μm apie 8 % intensyvumu. Be to, MMM taip pat neturėjo įtakos jogurto baltymų vidutiniam dalelių dydžiui pagal tūrį (žr. 9 lentelę). Kontrolinio mėginio $d_{[4,3]}$ buvo $39,997 \pm 0,192 \mu\text{m}$, o surauginus pieną su 0,25 % ir 0,75 % MMM ekstrakto, kazeino agregatų dydis jogurte atitinkamai buvo $41,368 \pm 0,229 \mu\text{m}$ ir $41,401 \pm 0,078 \mu\text{m}$. Vidutinis dalelių dydis pagal tūrį reikšmingai ($p < 0,05$) skiriasi mėginiuose, praturtintuose 0,75 % SEN ir VSE, atitinkamai $59,994 \pm 0,227 \mu\text{m}$ ir $47,155 \pm 0,115 \mu\text{m}$, lyginant su jogurtu be ekstrakto.



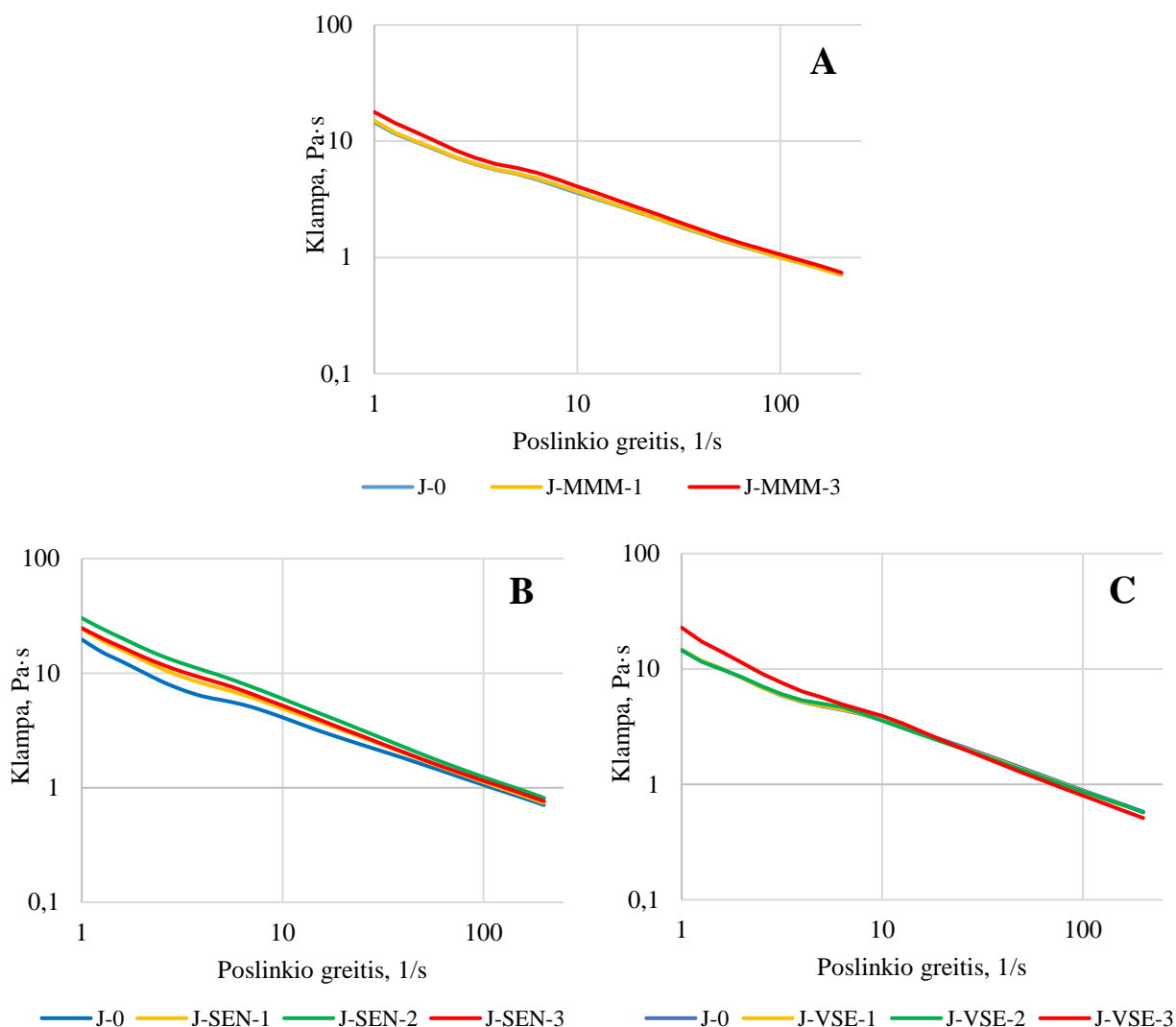
13 pav. Baltymų dalelių pasiskirstymas jogurto mėginiuose su fracionuotu mažos (A) molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstraktu, nefracionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu (B) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (C) (J-0 – jogurtas be ekstrakto, J-MMM-1, J-SEN-1, J-VSE-1 – jogurtas su 0,25 % ekstrakto, J-SEN-2, J-VSE-2 – jogurtas su 0,5 % ekstrakto, J-MMM-3, J-SEN-3, J-VSE-3 – jogurtas su 0,75 % ekstrakto)

9 lentelė. Skirtingais ekstraktais praturtinto jogurto vidutinio dalelių dydžio pagal tūrį priklausomybė nuo ekstrakto kiekio

Ekstraktas jogurte	Ektrakto kiekis jogurte			
	0 %	0,25 %	0,5 %	0,75 %
MMM	39,997 ± 0,192	41,368 ± 0,229	–	41,401 ± 0,078
SEN	39,997 ± 0,192	47,423 ± 0,073	51,373 ± 0,294	59,994 ± 0,227
VSE	39,997 ± 0,192	43,271 ± 0,226	44,785 ± 0,158	47,155 ± 0,115

Fenolinių junginių įtaką jogurto technologinėms savybėms buvo nustatytos vertinant jogurto klampą ir reologines charakteristikas bei sinerezę. Analizuojamų jogurto mėginių tekėjimo kreivių aprašymui buvo pasirinktas *Herschel–Bulkley* matematinis modelis pagal kurį apskaičiuotos jogurto reologinės charakteristikos (žr. 10 lentelę). Šis modelis buvo tinkamiausias dėl regresijos kreivės atitikimo koeficiento R^2 , kuris buvo artimiausias vienetui ($\geq 0,99$) lyginant su *Ostwald* moduliu. Iš 14 paveiksle pateiktų kreivių galima teigti, kad didėjant deformacijos greičiui, jogurto klampa mažėjo. Tai rodo, kad visi jogurto mėginiai yra tipiškai pseudoplastiniai skysčiai, kurių $\tau_0 > 1$ ir $n < 1$ (žr. 10 lentelę). 14 paveikslo A grafike galima matyti, kad jogurto klampa nepriklausė nuo MMM frakcijų ekstrakto kiekio, kadangi visos kreivės persidengė. Kiek kitokią išvadą galima daryti apie jogurto, praturtinto SEN ir VSE, klamos kreives (žr. 14 pav. B ir C). Pastebėta, kad jogurtas su 0,75 % VSE buvo klampesnis didinant poslinkio greitį nuo 0 iki 50 1/s nei kontrolinis mėginys ar jogurtai praturtinti 0,25 % ir 0,5 % ekstrakto. Didinant poslinkio greitį nuo 50 iki 200 1/s klamos kreivė buvo žemiau nei kitų mėginių. Jogurtai, praturtinti skirtingų koncentracijų SEN, buvo nežymiai klampesni lyginant su kontroliniu mėginiu (žr. 14 pav. B).

Analizuojant 10 lentelėje pateiktus skirtingų mėginių klamos koeficientus K pastebėta, kad jogurto, praturtinto 0,25 % MMM ekstraktu $K = 11,676 \pm 0,143$ Pa·s, o J-MMM-3 (0,75 %) $K = 11,761 \pm 0,109$ Pa·s, klamos koeficientas panašus į kontrolinio mėginio, kurio $K = 11,806 \pm 0,153$ Pa·s. Tikriausiai taip yra dėl didelės ekstrakto koncentracijos, silpninančios jogurto gelio struktūrą [135]. Hasneen‘as ir kt. [136] taip pat nustatė, kad 10 % vandeninis mairūno ekstraktas neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos jogurto klampai. Didinant SEN ir VSE kiekį jogurte nuo 0,25 iki 0,75 %, didėjo klamos koeficientas. Ryškus K padidėjimas pastebėtas jogurte su 0,75 % SEN ir VSE kiekiu, atitinkamai $14,001 \pm 0,092$ Pa·s ir $14,716 \pm 0,099$ Pa·s, lyginant su kontrolinio mėginio, kurio $K = 11,806 \pm 0,153$ Pa·s. Pastebėta, kad šių mėginių su 0,75 % ekstrakto reologinės charakteristikos parodė didžiausią poslinkio įtempį ($\tau_0 = 3,521 \pm 0,225$ Pa ir $\tau_0 = 8,9864 \pm 0,201$ Pa) lyginant su jogurtu praturtintu mažesniu kiekiu ekstrakto, t. y. 0,25 % ir 0,5 %. Galima manyti, kad jogurtai su didžiausiu klamos koeficientu ir ribiniu poslinkio įtempiu yra klampiausi.



14 pav. Jogurto klamos kreivės esant skirtingiems ekstraktams ir jų koncentracijomis: su frakcionuotu mažos (A) molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstraktu, nefrakcionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu (B) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (C) (J-0 – jogurtas be ekstrakto, J-MMM-1, J-SEN-1, J-VSE-1 – jogurtas su 0,25 % ekstrakto, J-SEN-2, J-VSE-2 – jogurtas su 0,5 % ekstrakto, J-MMM-3, J-SEN-3, J-VSE-3 – jogurtas su 0,75 % ekstrakto)

10 lentelėje nurodyta išsiskyrusių išrūgų kiekis kontroliniame jogurte ir į jį pridėjus ekstrakto. J-MMM-1 ir J-MMM-3 mėginius lyginant su kontrolinio mėginio išsiskyrusių išrūgų kiekiu, reikšmingo skirtumo nepastebėta. Didinant SEN ir VSE kiekį jogurte, proporcingai mažėja sinerezė. Rezultatai koreliuoja su Liu‘o ir kt. [137] gautais duomenimis, kurie tyrė mėlynių pulpos įtaką jogurto sinerezės sumažėjimui. Anuyahong‘as ir kt. [138] daug antocianų turintį ryžių uogų ekstraktą, įdėjo į jogurto baltymų matricą ir nustatė, kad didinant augalinio priedo kiekį nuo 0,125 % iki 0,5 %, išsiskyrusių išrūgų kiekis proporcingai mažėjo.

10 lentelė. Reologinių charakteristikų priklausomybė nuo skirtingų ekstraktų ir jų koncentracijos jogurte

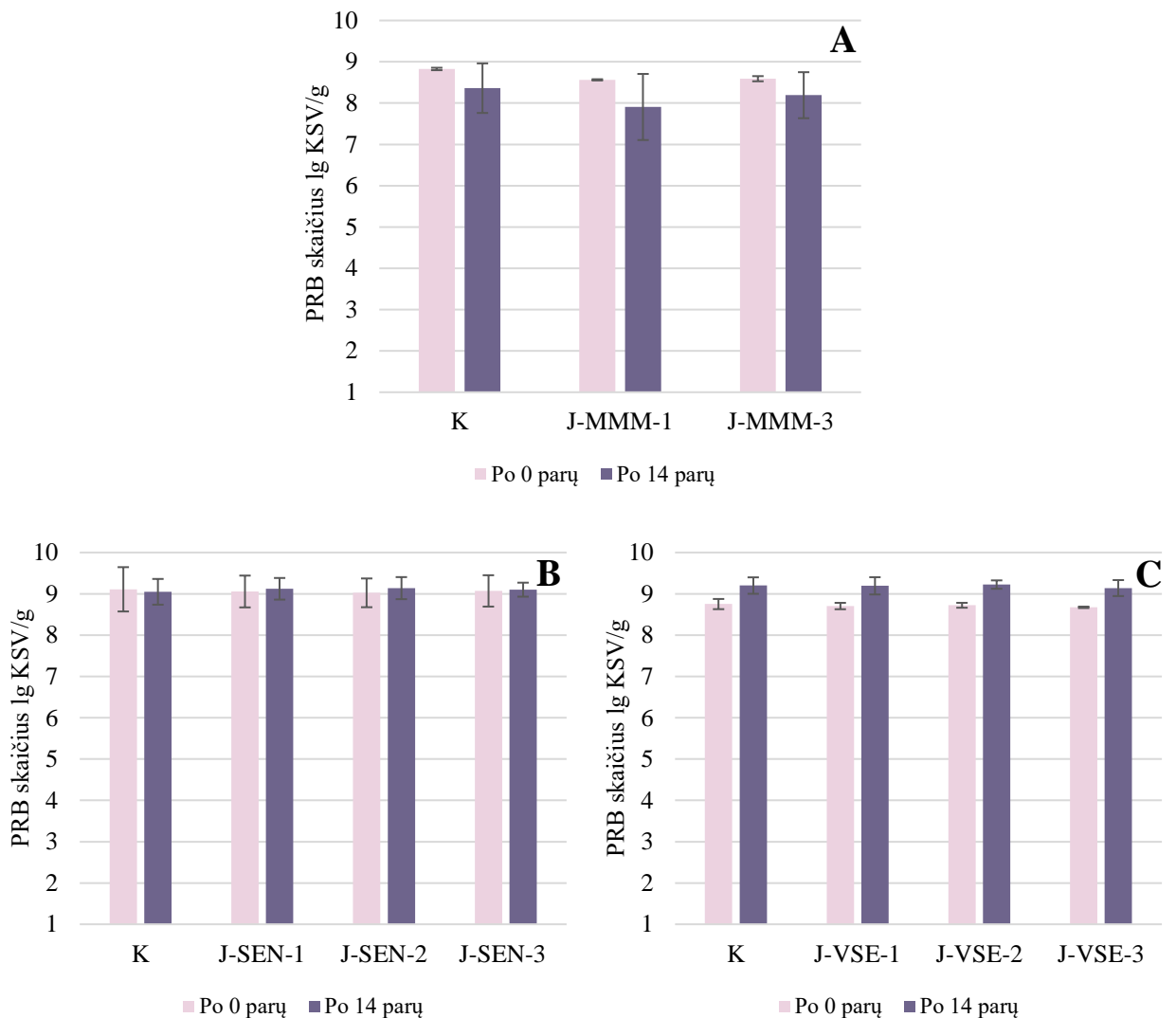
Mėginys	τ_0 , Pa	K (Pa·s)	n	R ²	Išsiskyrusių išrūgų kiekis, %
M-0	2,256 ± 0,230	11,806 ± 0,153	0,393 ± 0,001	0,993 ± 0,001	11,57 ± 0,20
M-MMM-1	2,947 ± 0,081	11,676 ± 0,143	0,403 ± 0,001	0,999 ± 0,000	11,07 ± 0,24
M-MMM-3	3,044 ± 0,099	11,761 ± 0,109	0,406 ± 0,000	0,999 ± 0,000	11,67 ± 0,31

Mėginys	τ_0 , Pa	K (Pa·s)	n	R ²	Išsiskyrusių išrūgų kiekis, %
M-SEN-1	2,352 ± 0,141	11,806 ± 0,089	0,412 ± 0,000	0,994 ± 0,001	11,59 ± 0,12
M-SEN-2	3,376 ± 0,281	13,821 ± 0,095	0,443 ± 0,002	0,999 ± 0,001	10,77 ± 0,01
M-SEN-3	3,521 ± 0,225	14,001 ± 0,092	0,443 ± 0,001	0,999 ± 0,001	10,22 ± 0,29
M-VSE-1	5,145 ± 0,132	12,774 ± 0,242	0,415 ± 0,006	0,995 ± 0,003	11,21 ± 0,23
M-VSE-2	5,802 ± 0,141	13,211 ± 0,309	0,447 ± 0,007	0,997 ± 0,002	10,79 ± 0,05
M-VSE-3	8,987 ± 0,201	14,716 ± 0,099	0,453 ± 0,003	0,995 ± 0,002	10,11 ± 0,15

Galima daryti prielaidą, kad jogurto, praturtinto SEN ir VSE, didesnę klampą ir mažesnę sinerezę lėmė stabili kazeino ir fenolinių junginių sąveika, sudaranti tirpų kompleksą [135]. Kazeino dalelių didėjimas piene, praturtintame SEN ir VSE, ir iš jo pagamintame jogurte (žr. 7 ir 14 pav.) patvirtino šį mokslininkų iškeltą teiginį. Fenolio grupės, turinčios vandenilio donorus, formuoja vandenilinius ryšius su baltymų C=O, o ypač su hidroksilo ir amino grupėmis baltymų molekulėse. Dėl papildomų vandenilinių ryšių susiformuoja stiprūs nekovalentiniai ryšiai stabilizuojantys baltymų tinklą [139]. Ši kompleksavimo reakcija gali būti priežastis klampesnės jogurto struktūros ir mažesnio vandens kiekio išskyrimo iš baltymų matricos. Dönmez‘as ir kt. [139] paaiškino, kad baltymų-baltymų kompleksų stiprinimas, formuojant jogurto struktūrą per baltymų ir polifenolių sąveiką, galėjo lemti jogurto, praturtinto žaliosios arbatos ir žaliosios kavos ekstraktais, klampos padidėjimą.

Taip pat buvo patikrinta gyvybingų pieno rūgšties bakterijų skaičius jogurte su MMM, SEN ir VSE, kuris galėjo sumažėti dėl ekstrakto esančių fenolinių junginių antimikrobinių savybių (žr. 15 pav.) Nustatyta, kad mažos molekulinės masės frakcijų ir nefrakcionuotas spanguolių ekstraktai neturėjo statistiškai reikšmingos ($p > 0,05$) įtakos jogurto pieno rūgšties bakterijų augimui laikymo metu. Analogiškus tyrimo rezultatus gavo Anuyahong‘as ir kt. [138] tyrinėję jogurtą, praturtintą antocianinų turinčiu ryžių uogų ekstraktu, t. y. augalinis priedas neturėjo įtakos *Lactobacillus* mikroorganizmų vystymuisi. Iš 15 paveiksle C pateiktos diagramos matyti, kad komercinis vynuogių sėklų ekstraktas turėjo statistiškai reikšmingą įtaką ($p < 0,05$) pieno rūgšties bakterijų augimui laikymo metu. Galima pastebėti, kad mikrobiologiškai tai nėra reikšmingas mikroorganizmų padidėjimas lyginant mėginius po 0 laikymo dienos ir po 14 laikymo dienos. Pastebėta, kad didesnis ekstrakto kiekis neturėjo įtakos mikroorganizmų dauginimuisi. Mokslinėje literatūroje skelbiami tyrimų rezultatai yra priešaringi, t. y. jogurtas praturtintas vynuogių sėklų ekstraktu, kuriame gausu polifenolių, neturėjo jokio poveikio pieno rūgšties bakterijų dauginimuisi lyginant su kontroliniu mėginiu be ekstrakto [140]. Kiti tyrimai rodo, kad vynuogių išspaudų pridėjimas neturėjo įtakos pradinių raugo kultūrų dauginimuisi laikymo metu. Po 21 dienos *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* skaičius ekstraktu praturtintame jogurte buvo panašus į kontrolinio mėginio be ekstrakto [141].

MMM, SEN ir VSE ekstraktais praturtintame jogurte PRB buvo apie 10^8 ir 10^9 lg KSV/g. Tai reiškia, kad šie pieno produktai pagaminti pridedant fenoliniais junginiais turtingų ekstraktų, turėjo daugiau PRB nei reikalaujama pagal *Codex Alimentarius* t. y. minimalus startinių kultūrų kiekis jogurte turi būti ne mažiau kaip 10^7 lg KSV/g [142]. Tai gali būti naudinga norint toliau vystyti produktą, turintį teigiamą poveikį žmogaus organizmui, pavyzdžiui, siekiant palaikyti normalios žarnyno mikrofloros pusiausvyrą ir apsaugoti nuo virškinimo trakto patogenų, sumažinti storosios žarnos vėžio ir žarnyno uždegimo riziką, pagerinti laktozės netoleravimą [143].



15 pav. Pieno rūgšties bakterijų skaičiaus pokyčiai laikymo metu jogurte, praturtintame skirtingais ekstraktais ir jų koncentracijomis: su frakcionuotu mažos (A) molekulinės masės frakcijų spanguolių ekstraktu, nefrakcionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu (B) ir komerciniu vynuogių sėklų ekstraktu (C) (J-0 – jogurtas be ekstrakto, J-MMM-1, J-SEN-1, J-VSE-1 – jogurtas su 0,25 % ekstrakto, J-SEN-2, J-VSE-2 – jogurtas su 0,5 % ekstrakto, J-MMM-3, J-SEN-3, J-VSE-3 – jogurtas su 0,75 % ekstrakto).

3.5. Jogurto su ekstraktais virškinamumas

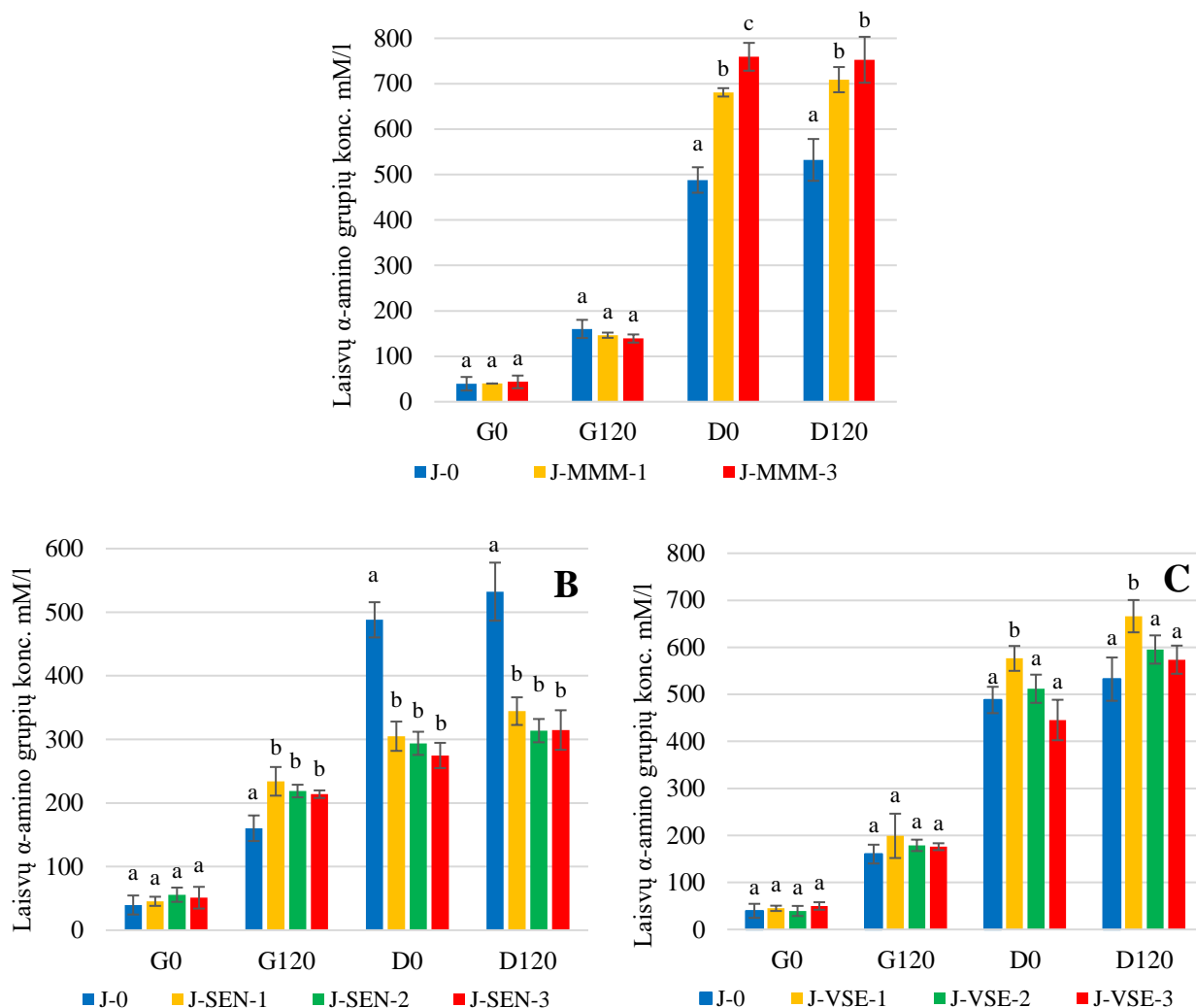
Analogiškai pieno mišiniams buvo atlikti jogurto mėginių virškinamumo *in vitro* tyrimai. Imituojant jogurto, praturtinto MMM, SEN ir VSE, virškinimą skrandžio (G0, G120) ir plonojo žarnyno (D0, D120) fazėse, skirtingais virškinimo etapais buvo analizuojamas laisvų amino grupių kiekis, fenolinių junginių ir proantocianinų atsipalaidavimas ir skaičiuojamas biologinio prieinamumo indeksas supernatante.

Pagal 16 paveiksle pateiktus duomenis, laisvų α -amino grupių koncentracija jogurto mėginiuose *in vitro* virškinimo proceso metu, didėjo. 16 A paveiksle pateikta laisvų amino grupių kiekis atskiruose MMM frakcijų ekstraktu praturtinto ir nepraturtinto jogurto *in vitro* virškinimo etapuose. Pirmoje virškinimo skrandyje fazėje (G0) suvirškintų J-0, J-MMM-1 ir J-MMM-3 mėginių supernatante α -amino grupių buvo rasta nuo $39,45 \pm 14,94$ mM/l iki $43,72 \pm 13,96$ mM/l. Statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo tarp kontrolės ir jogurto, praturtinto 0,25 % ir 0,75 % ekstrakto, nebuvo. Amino grupių koncentracija apie 4 kartus padidėjo pepsinui veikiant jogurto baltymus skrandžio fazėje 120

min. Statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) skirtumai tarp kontrolės mėginio ir jogurto, praturtinto skirtingu MMM keikiu, stebimas D0 ir D120 fazėse. Pastebėta, kad žarnyno fermentas pankreatinas ir tulžies druska hidrolizavo gerokai daugiau baltymų ekstraktu sustiprintame jogurte nei kontrolinio mėginio D120 taške. Galutiniame virškinimo etape statistiškai reikšmingo skirtumo tarp J-MMM-1 ir J-MMM-3 mėginių nebuvo. Tyrimo rezultatai koreliuoja su apskaičiuotu baltymų hidrolizės laipsniu (žr. 11 lentelę). Nustatyta, kad virškinimo plonojoje žarnoje pabaigoje (D120) baltymų hidrolizės laipsnis J-MMM-1 ir J-MMM-3 mėginio buvo didesnis, analogiškai $12,30 \pm 0,48$ % ir $13,06 \pm 0,88$ % lyginant su kontroliniu bandiniu, kurio hidrolizės laipsnis – $9,24 \pm 0,80$ %. Kaip literatūros apžvalgoje paminėta, žaliosios arbatos polifenoliai galėjo padidinti fermentinį pepsino aktyvumą imituotame virškinimo modelyje [126]. Galima daryti prielaidą, kad ekstraktas stimuliuo pankreatino aktyvumą žarnyno fazėje, todėl buvo aptikta didesnė laisvų amino grupių koncentracija lyginant su kontrolinio mėginio. Taip pat mokslininkai teigė, kad polifenoliai turėjo įtakos baltymų struktūros išsivyniojimui taip padidindami fermentų prieinamumą prie peptidinių ryšių dėl ko pagerėjo baltymų virškinamumas [144]. Imituotas virškinimo trakto tyrimas, kurį atliko Jiang'as ir kt. [145] parodė, kad nekovalentinė chlorogeno rūgštis sąveika su pieno baltymais skatino jų virškinimą dėl didesnio prieinamumo prie fermentų prisijungimo vietų, o tai turėjo įtakos daliniam baltymų struktūros atsiskleidimui.

Priešingi rezultatai gauti analizuojant SEN praturtinto jogurto hidrolizės metu susidariusių laisvų amino grupių kiekį (žr. 16 pav. B). Statistiškai reikšmingo skirtumo nepastebėta G0 fazėje kontrolės mėginį lyginant su skirtingomis ekstrakto koncentracijomis praturtinto jogurto mėginiais. Šių mėginių laisvų amino grupių koncentracija svyravo nuo $39,45 \pm 14,94$ mM/l iki $55,79 \pm 11,20$ mM/l, o hidrolizės laipsnis nuo $0,78 \pm 0,10$ % iki $0,97 \pm 0,21$ %. Kontrolinis jogurto mėginys G120 taške parodė žymiai ($p < 0,05$) mažesnę išsiskyrusių α -amino grupių kiekį ($160,32 \pm 20,01$ mM/l) lyginant su mėginiais, praturtintais SEN. Tačiau po žarnyno fazėse (D0 ir D120) J-0 mėginiui buvo nustatytas intensyvesnis α -amino grupių išsiskyrimas. Žarnyno fazės pradžioje α -amino grupės susidarė greitai, o po 120 min. virškinimo žarnyne nustatytas nedidelis padidėjimas. Nors statistiškai reikšmingo skirtumo nepastebėta, tačiau galima matyti, kad didinant SEN kiekį nuo 0,25 % iki 0,75 % laisvų α -amino grupių kiekis nežymiai mažėja D0 ir D120 fazėse. Tai patvirtinta baltymų hidrolizės laipsnis, kuris D120 fazėje mažėjo nuo $5,98 \pm 0,40$ % iki $5,43 \pm 0,31$ % (žr. 11 lentelę). Taigi, SEN pridėjimas į jogurtą žymiai sumažino ($p < 0,05$) baltymų hidrolizės laipsnį galutiniame virškinimo taške. Tokie gauti rezultatai gali būti susiję su kompleksų tarp polifenolių ir baltymų formavimusi [125]. Nustatyta, kad fenolinių junginių sąveika su baltymais lėtina jų hidrolizę. Gauti rezultatai panašūs į Pan'o ir kt. [130], kurie nustatė, kad jogurto praturtinto 1–5% granatų sulčių milteliais, kuriuose gausu polifenolių, virškinamumas *in vitro* sulėtėjo dėl susidariusių sunkiai virškinamų baltymų-fenolinių junginių kompleksų.

Iš 16 C paveiksle pavaizduotų diagramų galima pastebėti, kad VSE neturėjo įtakos jogurto baltymų hidrolizei pepsinu. G0 ir G120 virškinimo taškuose statistiškai reikšmingo skirtumo nepastebėta tarp kontrolinio mėginio ir jogurto, praturtinto 0,25–0,75 % VSE. Laisvų α -amino grupių kiekio padidėjimas buvo D0 fazėje dėl žarnyno fermento pankreatino ir tulžies druskų įdėjimo. Galutiniame virškinimo etape J-VSE-1 buvo rasta daugiausia laisvų amino grupių ($666,24 \pm 34,36$ mM/l). Statistiškai reikšmingo nepastebėta tarp kontrolinio mėginio ir J-VSE-2 ar J-VSE-3. Jogurto, praturtinto VSE, baltymų hidrolizės laipsnis kito nuo $9,95 \pm 0,52$ % iki $11,56 \pm 0,03$ %.



16 pav. Laisvų α-amino grupių skaičiaus kitimas skirtingais ekstraktais ir jų kiekiais praturtinto jogurto baltymų virškinimo metu: G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D0 – žarnyno fazė 0 min., D120 – žarnyno fazė 120 min. (J-0 – jogurtas be ekstrakto, J-MMM-1, J-SEN-1, J-VSE-1 – jogurtas su 0,25 % ekstrakto, J-SEN-2, J-VSE-2 – jogurtas su 0,5 % ekstrakto, J-MMM-3, J-SEN-3, J-VSE-3 – jogurtas su 0,75 % ekstrakto). Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant mėginius tame pačiame virškinimo proceso taške

11 lentelė. Skirtingais ekstraktais praturtinto jogurto baltymų hidrolizės laipsnio kitimas *in vitro* virškinimo metu

Virškinimo fazė	Hidrolizės laipsnis, %								
	J-0	J-MMM-1	J-MMM-3	J-SEN-1	J-SEN-2	J-SEN-3	J-VSE-1	J-VSE-2	J-VSE-3
G0	0,69 ± 0,26 ^a	0,70 ± 0,00 ^a	0,76 ± 0,28 ^a	0,79 ± 0,14 ^a	0,97 ± 0,21 ^a	0,89 ± 0,34 ^a	0,78 ± 0,10 ^a	0,68 ± 0,21 ^a	0,87 ± 0,14 ^a
G120	2,78 ± 0,35 ^a	2,54 ± 0,10 ^a	2,42 ± 0,16 ^a	4,06 ± 0,41 ^b	3,80 ± 0,04 ^b	3,71 ± 0,03 ^b	3,45 ± 0,18 ^a	3,10 ± 0,15 ^a	3,05 ± 0,13 ^a
D0	8,47 ± 0,49 ^a	11,82 ± 0,16 ^b	13,17 ± 0,53 ^c	5,29 ± 0,40 ^b	5,10 ± 0,31 ^b	4,61 ± 0,23 ^b	10,00 ± 0,37 ^a	8,88 ± 0,46 ^b	7,73 ± 0,75 ^a
D120	9,24 ± 0,80 ^a	12,30 ± 0,48 ^b	13,06 ± 0,88 ^b	5,98 ± 0,40 ^b	5,43 ± 0,31 ^b	5,63 ± 0,31 ^b	11,56 ± 0,03 ^a	10,33 ± 0,52 ^b	9,95 ± 0,52 ^a

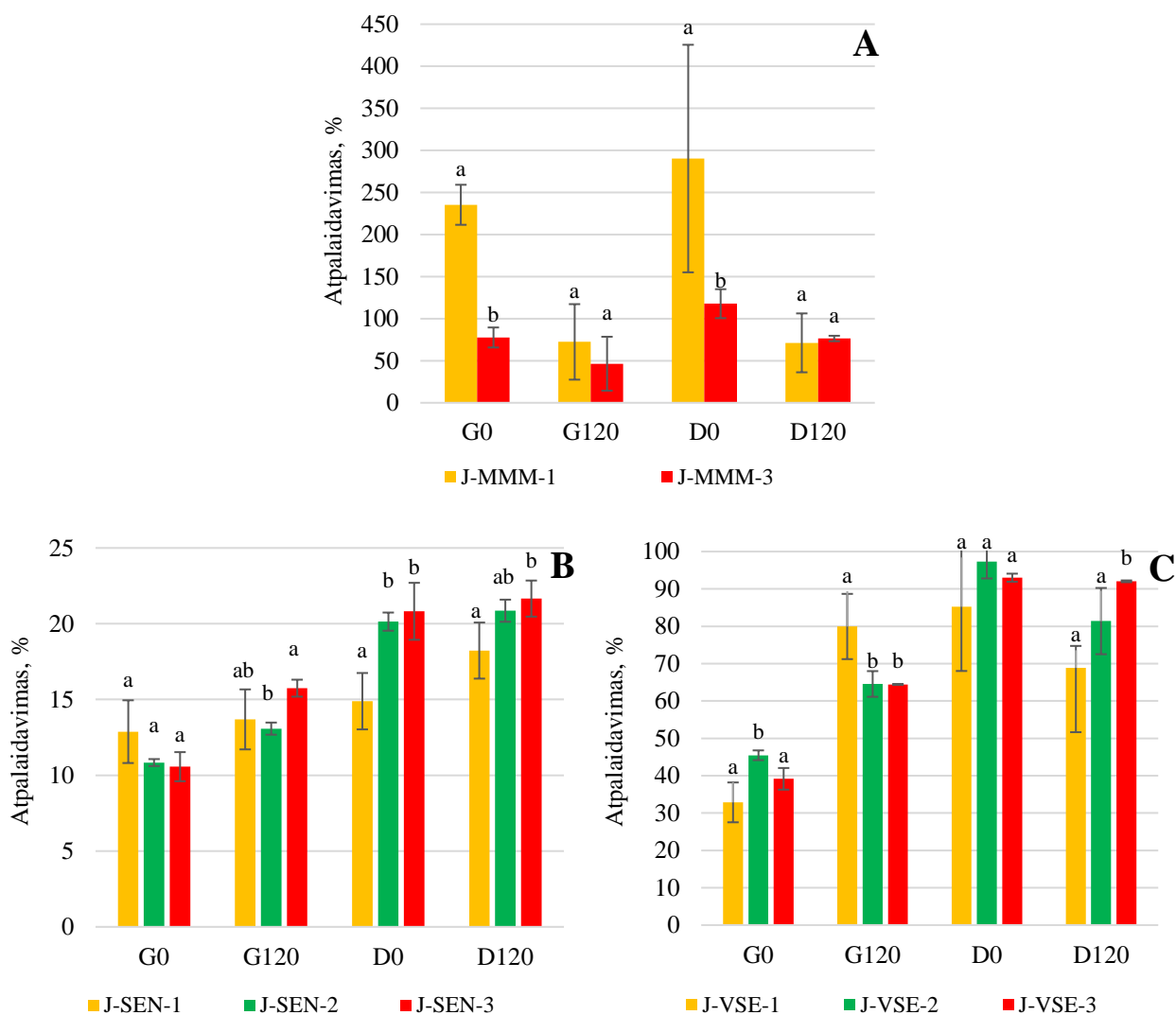
Jogurto virškinimo metu atpalaiduotų laisvų α -amino grupių koncentracijos nustatymo tyrime gauti rezultatai labai skirtingi. Nepastebėta vienos aiškios tendencijos lyginant kontrolinį mėginį su skirtingais ekstraktais ir koncentracijomis praturtintu jogurtu. Tai galėjo lemti skirtingas baltymų-fenolinių junginių komplekso susidarymas, dalyvaujant stabiliems kovalentiniams ir netvirtiems nekovalentiniams ryšiams bei polifenolių struktūrai [130]. Galima daryti prielaidą, kad jogurtas praturtintas SEN ir VSE, sudėtyje turinčių didelės molekulinės masės fenolinių junginių, sudarė stiprius kovalentinius ryšius, kurie turėjo įtakos baltymų dalelių dydžio padidėjimui (žr. 13 pav. B, C), klampesnei jogurto struktūrai (žr. 14 pav. B, C) ir sumažėjusiai laisvų α -amino grupių koncentracijai (žr. 16 pav. B, C). Priešingai, jogurto baltymai sudarė silpnus nekovalentinius ryšius su MMM dėl ko nepakito jogurto baltymų dydis (žr. 13 pav. A), klampa (žr. 14 pav. A), o virškinimo metu baltymų hidrolizavosi daugiau (žr. 16 pav. A) lyginant su kontroliniu bandiniu.

Remiantis 17 paveiksle pateiktais duomenimis fenolinių junginių atpalaidavimas iš skirtingais spanguolių ekstraktais praturtintų jogurto mėginių virškinimo metu didėjo. Tačiau dauguma fenolinių junginių liko netirpūs ir virškinimo metu nebuvo išskirti į virškinimo sultis. Iš 17 paveikslo A grafiko galima pastebėti, kad fenolinių junginių atpalaidavimo iš jogurto, praturtinto MMM spanguolių ekstraktu, nepavyko nustatyti, kadangi jų reikšmės G0 ir D0 taškuose viršijo 100 %. Tokiems rezultatams galėjo turėti įtakos analizės netikslumai, atsiradę dėl naudotų bazinių druskų tirpalų *in vitro* virškinimo metu ar susidariusių įvairių cheminių junginių, kurių atpalaidavimas ir bioprieinamumas gali būti skirtingas. Be to, galima manyti, kad naudoto metodo tikslumas buvo per mažas, todėl tolimesniems tyrimams reikėtų naudoti kitą analizę. Tačiau pagal J-MMM-1 ir J-MMM-3 mėginių BI indeksą, pateiktą 12 lentelėje, atitinkamai 85,51 % ir 76,25 %, galima teigti, kad padidinus spanguolių ekstrakto koncentraciją, fenolinių junginių bioprieinamumas procentais sumažėjo. Panašios fenolinių junginių atsipalaidavimo tendencijos buvo nustatytos cinamono ekstraktu praturtintame jogurte [128]. Helal'as ir kt. [128] nustatė, kad fenolinių junginių biologinio prieinamumo indeksas suvirškinus cinamono ekstraktu praturtintą jogurtą buvo 86,70 %. Teigiama, kad polifenolių-baltymų kompleksas apsaugojo polifenolius nuo oksidacijos ir fermentinės hidrolizės virškinimo metu, todėl pagerino jų įsisavinimo greitį ir biologinį prieinamumą plonajame žarnyne [81].

Taip pat tiriamajame darbe suvirškinto jogurto su VSE biologinio prieinamumo indeksai gauti panašūs į anksčiau aptartų Helal'o ir kt. [128] mokslininkų. Galutiniame *in vitro* virškinimo proceso taške pastebėta aiški tendencija, kad didinant ekstrakto kiekį jogurte, fenolinių junginių atpalaidavimas ir BI didėja, atitinkamai nuo 68,85 %, iki 92,03 % (žr. 12 lentelę). Nors statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo tarp J-VSE-1 ir J-VSE-2 fenolių atpalaidavimo D120 taške nepastebėta. Taip pat po virškinimo skrandyje keičiantis pH į šarminį žarnyno fazėje išsiskiria daugiau fenolinių junginių, t. y. nuo $85,22 \pm 17,20$ % iki $97,28 \pm 4,49$ %, dėl protonų atsiskyrimo nuo hidroksilo grupės aromatiniuose fenolių žieduose [146]. Be to, Li'as ir kt. [81] patvirtino, kad rūgštinėmis sąlygomis fitocheminės medžiagos stabilios, o neutralus pH plonojoje žarnoje pagreitina polifenolių skaidymąsi.

17 paveikslo B grafike pateikti jogurto su SEN rezultatai rodo, kad skrandžio fazės pradžioje į virškinimo sultis atsipalaidavo nuo $10,57 \pm 0,23$ % iki $12,88 \pm 2,11$ % fenolinių junginių. Žarnyno fazės pradžioje išsiskyrusių fenolių dalis buvo nuo $14,89 \pm 2,19$ % iki $20,82 \pm 1,82$ %. Ryšys tarp polifenolių išsiskyrimo į virškinimo sultis ir į jogurtą įdėto SEN kiekio skrandžio virškinimo etape nenustatytas. Tačiau D120 fazėje iš jogurto su 0,75 % SEN išsiskyrusių fenolinių junginių buvo žymiai daugiau ($p < 0,05$) palyginti su jogurtu, kuriame buvo 0,25 % SEN. Xiong'as ir kt. [132]

remiantis savo tyrimo rezultatais teigė, kad baltymų-polifenolių dalelės gali palaikyti fenolinių junginių stabilumą virškinamajame trakte ir padidinti biologinį prieinamumą žarnyne. Šį mokslininkų teiginį gali patvirtinti apskaičiuoti jogurto, praturtinto 0,25 %, 0,5 % ir 0,75 %, BI, kurie buvo atitinkamai 18,28 %, 20,31 % ir 22,17 % (žr. 12 lentelę).

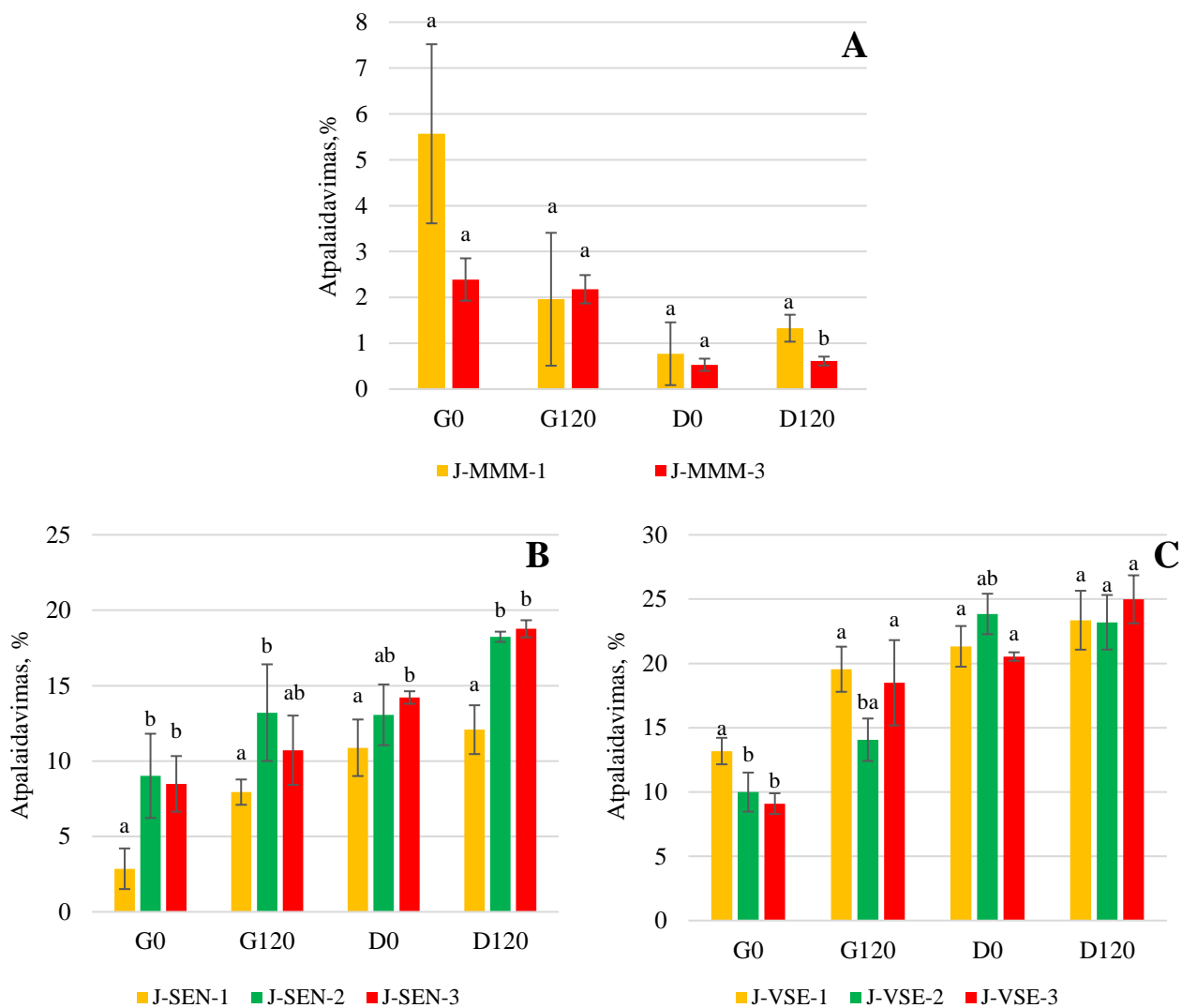


17 pav. Virškinimo *in vitro* įtaka fenolinių junginių atpalaidavimo dinamikai iš jogurto su skirtingais spanguolių ekstraktais: G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D0 – žarnyno fazė 0 min., D120 – žarnyno fazė 120 min. Vertės pateikiamos kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis; raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant mėginius tame pačiame virškinimo proceso taške

12 lentelė. Jogurto su skirtingais ekstraktais fenolinių junginių ir proantocianidinų bioprieinamumo indeksas

	Fenolinių junginių bioprieinamumas							
	J-MMM-1	J-MMM-3	J-SEN-1	J-SEN-2	J-SEN-3	J-VSE-1	J-VSE-2	J-VSE-3
BI, %	85,51	76,25	18,28	20,31	22,17	68,85	81,38	92,03
	Proantocianidinų bioprieinamumas							
	J-MMM-1	J-MMM-3	J-SEN-1	J-SEN-2	J-SEN-3	J-VSE-1	J-VSE-2	J-VSE-3
BI, %	1,33	0,61	12,08	18,24	18,77	23,36	23,20	24,99

Galutiniame jogurto su spanguolių ekstraktais tyrimo etape buvo nustatyta PAC atpalaidavimas virškinimo *in vitro* metu. 18 paveikslo A grafike pateikti jogurto su MMM junginių rezultatai rodo, kad skrandžio fazės pradžioje virškinimo sultyse rasta nuo $2,39 \pm 0,45$ % iki $5,57 \pm 1,95$ % PAC. Praėjus 120 min. po virškinimo skrandyje buvo nustatyta nuo $2,18 \pm 0,31$ % iki $1,96 \pm 1,45$ % atsipalaidavusių PAC, o pagal jų biologinis pasisavinamumas svyravo nuo 0,61 % iki 1,33 % (žr. 12 lentelę). Be to, ankstesniuose tyrimuose buvo nustatyta, kad MMM junginių ekstrakto PAC kiekis labai mažas, todėl jų ir atsipalaidavo gerokai mažiau nei iš jogurto, praturtinto SEN ar VSE.



18 pav. Virškinimo *in vitro* įtaka proantocianidinų atpalaidavimo dinamikai iš jogurto su skirtingais spanguolių ekstraktais: G0 – skrandžio fazė 0 min., G120 – skrandžio fazė 120 min., D0 – žarnyno fazė 0 min., D120 – žarnyno fazė 120 min. Vertės pateikiamos kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis; raidės rodo reikšmingus pagal Stjudento t-testą testą ($p < 0,05$) skirtumus lyginant mėginius tame pačiame virškinimo proceso taške

Toliau buvo pastebėta atsikartojanti PAC atpalaidavimo didėjanti tendencija virškinimo *in vitro* metu lyginant su fenolinių junginių išsiskyrimu iš jogurto praturtinto SEN ir VSE. Iš 18 paveikslo B grafiko galima matyti, kad nepavyko nustatyti ryšio tarp PAC išsiskyrimo į virškinimo sultis ir į jogurtą įdėto SEN kiekio po *in vitro* virškinimo skrandžio etape. Tačiau D120 fazėje iš jogurto, turinčio 0,75 % SEN, išsiskyrusių PAC dalis buvo žymiai didesnė ($p < 0,05$) palyginti su jogurtu,

kuriame buvo 0,25 % SEN. Šių mėginių BI svyravo atitinkamai nuo 18,77 % iki 12,08 % (žr. 12 lentelę).

PAC atpalaidavimas iš jogurto, praturtinto skirtingomis VSE koncentracijomis, pavaizduotas 18 paveiksle C grafike. Pastebėta, kad G120 virškinimo etape skirtinga ekstrakto koncentracija statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo neturėjo. Virškinimo pabaigoje nustatyta, kad statistiškai reikšmingo ($p > 0,05$) skirtumo PAC išsiskyrimui, didinant VSE proantocianidinių frakcijų ekstrakto kiekį nuo 0,25 iki 0,75 %, nepastebėta. Didinant VSE kiekį jogurto mėginiuose, BI nežymiai padidėjo nuo 23,36 % iki 24,99 %.

IŠVADOS

1. Spanguolių išspaudų ekstraktų, išfrakcionuotų pagal molekulinę masę, antioksidacinės ir antimikrobinės savybės skiriasi: didelės molekulinės masės junginių frakcija pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu ir stipresnėmis antimikrobinėmis savybėmis prieš jogurto raugo *Streptococcus thermophilus* ir *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* bakterijas bei didesniu bendru fenolinių junginių ir proantocianidinų kiekiu. O mažos molekulinės masės junginių frakcijų spanguolių ekstrakto nustatytas didesnis kai kurių monomerinių antocianinų kiekis.
2. Sąveika tarp pieno baltymų ir didelės molekulinės masės frakcijų junginių ir nefrakcionuoto spanguolių ekstrakto fenolinių junginių lėmė pieno baltymų dalelių stambėjimą, klampos didėjimą pieno mišiniuose ir nežymų klampos didėjimą iš jų pagamintame jogurte, baltymų rūgštinės koaguliacijos trukmės trumpėjimą bei išsiskyrusių išrūgų kiekio sumažėjimą. Mažos molekulinės masės frakcijų junginių spanguolių ekstraktas neturėjo įtakos pieno mišinių ir iš jų pagaminto jogurto baltymų dalelių dydžiui, klampai ir išsiskyrusių išrūgų kiekiui.
3. Pieno mišiniuose su didelės molekulinės masės junginių spanguolių ekstrakto frakcija nustatytas mažiausias pieno baltymų virškinimo greitis, o nefrakcionuotas ir mažos molekulinės masės junginių frakcijų spanguolių ekstraktas statistiškai reikšmingo skirtumo baltymų virškinamumui neturėjo lyginant su kontrole. Jogurto mėginiuose nefrakcionuotas spanguolių ekstraktas lėtino laisvų α -amino grupių išsiskyrimą į virškinimo sultis, o mažos molekulinės masės junginių frakcija turėjo teigiamos įtakos baltymų virškinamumui.
4. Pieno baltymai turi neigiamos įtakos spanguolių ekstraktų fenolinių junginių ir ypač proantocianidinų atpalaidavimui ir biologiniam prieinamumui virškinimo *in vitro* metu. Pieno mišiniuose su didelės molekulinės masės junginių spanguolių ekstrakto frakcija nustatytas mažiausias fenolinių junginių (17,74 %) ir proantocianidinų (4,10 %) biologinis prieinamumas bei mažiausias antioksidacinis aktyvumas ($0,49 \pm 0,02$ mg TE/100g) galutiniame virškinimo *in vitro* taške.
5. Didinant nefrakcionuoto spanguolių išspaudų ekstrakto koncentraciją, didėja fenolinių junginių ir proantocianidinų biologinis prieinamumas. Jogurtas su mažos molekulinės masės junginių frakcija pasižymėjo didžiausiu fenolinių junginių ir mažiausiu proantocianidinų biologiniu prieinamumu. Virškinimo *in vitro* metu fenolinių junginių ir proantocianidinų atpalaidavimas didėjo jogurto mėginiuose, praturtintuose nefrakcionuotu spanguolių išspaudų ekstraktu.

PUBLIKACIJŲ MAGISTRO TEZIŲ TEMA SĄRAŠAS

Zygmantaitė, Gabrielė; Surblytė, Gabrielė; Keršienė, Milda; Leskauskaitė, Daiva. Digestibility of milk proteins treated by transglutaminase // FoodBalt 2021: 14th Baltic conference on food science and technology “Sustainable food for conscious consumer”: abstract book / editor: Mari-Liis Kutti. Tallinn: Center of Food and Fermentation Technologies. 2021, p. 162.

Zygmantaitė, Gabrielė, Keršienė, Milda, Jasutienė, Ina, Šipailienė, Aušra, Venskutonis, Petras Rimantas, Leskauskaitė, Daiva. Extract isolated from cranberry pomace as functional ingredient in yoghurt production: technological properties and digestibility studies // LWT - Food Science and Technology. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111751>

Pranešimai konferencijose

Gabrielė Zygmantaitė. Skirtingos molekulinės masės proantocianidinų įtaka pieno baltymų virškinamumui. Studentų mokslinė konferencija 2021, Vilnius, LMT, 2021 m. gegužės 11 d.

Dalyvavimas mokslo projektuose

ES struktūrinių fondų projektas, finansuojamas Europos socialinio fondo lėšomis pagal 2014–2020 metų Europos Sąjungos fondų investicijų veiksmų programos priemonę Nr. 09.3.3-LMT-K-712 „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“. Skirtingos molekulinės masės proantocianidinų įtaka pieno baltymų virškinamumui. Trukmė: 2020-11-03–2021-04-30

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. WEERATHILAKE, W. A. D. V., RASIKA, D.M.D., RUWANMALI, J.K.U. ir MUNASINGHE, M. A. D. D. The Evolution, Processing, Varieties and Health Benefits of Yogurt. *International Journal of Scientific and Research Publications* [interaktyvus]. 2014, vol. 4, no. 4 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-evolution-%2C-processing-%2C-varieties-and-health-Weerathilake-Rasika/8b2c6b5dcffe3a2f3e6c8dd494d560521d62feae?p2df> ISSN 2250-3153.
2. HASHEMI GAHRUIE, H., ESKANDARI, M.H., MESBAHI, G. ir HANIFPOUR, M.A. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Fortification: A Review. *Food Science and Human Wellness* [interaktyvus]. 2015, vol. 4, no. 1. pp. 1-8 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453015000178> ISSN 2213-4530. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.03.002>.
3. SIROLI, L., et al. Sex-Dependent Effects of a Yoghurt Enriched with Proteins in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2021, vol. 114. pp. 104914 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694620302843> ISSN 0958-6946. DOI <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104914>.
4. SUKHIKH, S., et al. Functional Dairy Products Enriched with Plant Ingredients. *Foods and Raw Materials* [interaktyvus]. Oct 31, 2019, vol. 7, no. 2. pp. 428-438 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=doajarticles::80d5c6df14501d42121a8d80b4e1d3de> CrossRef. ISSN 2308-4057. DOI 10.21603/2308-4057-2019-2-428-438.
5. STAROVOJTOVA, K., TERESHCHUK, L., TARLYUN, M. ir DOLGOLYUK, I. Development of an Integrated Technology for Milk Processing with the Production of Functional Dairy Products and Biotech Products for Food and Pharmaceutical Industry. *Atlantis press* [interaktyvus]. 2019, vol. 393 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: [10.2991/assehr.k.200113.208](https://doi.org/10.2991/assehr.k.200113.208)
6. ŽEMĖS ŪKIO MINISTERIJA. *Dėl pieno supirkimo taisyklių patvirtinimo pakeitimo*. 2001 m. gegužės 9 d. Nr. 3D-241 [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-03-14]. [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/76590bc0d8cd11e49a8e8a8aa8141086>
7. MOREIRA, T.C., et al. Elaboration of Yogurt with Reduced Level of Lactose Added of Carob (*Ceratonia Siliqua* L.). *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2017, vol. 76. pp. 326-329 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816305199> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.033>.
8. PINTO, S.S., FRITZEN-FREIRE, C.B., DIAS, C.O. ir AMBONI, R.D.M.C.A Potential Technological Application of Probiotic Microcapsules in Lactose-Free Greek-Style Yoghurt. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2019, vol. 97. pp. 131-138 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694619301256> ISSN 0958-6946. DOI <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.009>.
9. MUNIANDY, P., SHORI, A.B. ir BABA, A.S. Comparison of the Effect of Green, White and Black Tea on *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus* Spp. in Yogurt during Refrigerated Storage. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences* [interaktyvus]. 2017, vol. 22. pp. 26-30 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1815385215000334> ISSN 1815-3852. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2015.11.002>.

10. NYANZI, R., JOOSTE, P.J. ir BUYS, E.M. Invited Review: Probiotic Yogurt Quality Criteria, Regulatory Framework, Clinical Evidence, and Analytical Aspects. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2021, vol. 104, no. 1. pp. 1-19 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030220309991> ISSN 0022-0302. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19116>.
11. SHORI, A.B. ir BABA, A.S. Survival of Bifidobacterium Bifidum in Cow- and Camel-Milk Yogurts Enriched with Cinnamomum Verum and Allium Sativum. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences* [interaktyvus]. 2015, vol. 18. pp. 7-11 [žiūrėta 2021-03-13]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1815385214000108> ISSN 1815-3852. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2014.02.006>.
12. KOMISIJOS REGLAMENTAS. Dėl tam tikrų leidžiamų vartoti teiginių apie maisto produktų sveikumą, išskyrus teiginius apie susirgimo rizikos mažinimą, vaikų vystymąsi ir sveikatą, sąrašo sudarymo. 2012 m. gegužės 16 d. Nr. 432/2012 [interaktyvus]. [žiūrėta 2019-03-14]. Prieiga per: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0432&from=LT>
13. TERPOU, A., et al. Novel Cheese Production by Incorporation of Sea Buckthorn Berries (Hippophae Rhamnoides L.) Supported Probiotic Cells. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2017, vol. 79. pp. 616-624 [žiūrėta 2021-03-13]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816306922> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.021>.
14. ABDEEN, E.M. Enhancement of Functional Properties of Dairy Products by Date Fruits (Review). *Egypt. J. Food* [interaktyvus]. 2018, vol. 46. pp. 197-206 [žiūrėta 2021-03-13]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/336370200_Enhancement_of_Functional_Properties_of_Dairy_Products_by_Date_Fruits_Review
15. Chung, K.T. et al. Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 1998, vol. 38, no. 6. pp. 421-464 [žiūrėta 2021-03-13]. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408699891274273?needAccess=true> MEDLINE. ISSN 1040-8398. DOI 10.1080/10408699891274273.
16. MUKHTAR, H., WANG, Z.Y., KATIYAR, S.K. ir AGARWAL, R. Tea Components: Antimutagenic and Anticarcinogenic Effects. *Preventive Medicine* [interaktyvus]. 1992, vol. 21, no. 3. pp. 351-360 [žiūrėta 2021-03-13]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009174359290042G> ISSN 0091-7435. DOI [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(92\)90042-G](https://doi.org/10.1016/0091-7435(92)90042-G).
17. O'CONNELL, J. ir FOX, P. Significance and Applications of Phenolic Compounds in the Production and Quality of Milk and Dairy Products: A Review. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2001, vol. 11, pp. 103-120 [žiūrėta 2021-03-13]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00033-4)
18. RAMOS, L. R., et al. Analytical Optimization of a Phenolic-Rich Herbal Extract and Supplementation in Fermented Milk Containing Sweet Potato Pulp. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2017, vol. 221. pp. 950-958 [žiūrėta 2021-03-13]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616319185> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.069>.

19. LIU, D. Effect of Fuzhuan brick-tea addition on the quality and antioxidant activity of skimmed set-type yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2021-03-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12395>
20. GAGLIO, R., et al. Effect of saffron addition on the microbiological, physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2021-03-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12569>
21. SUN-WATERHOUSE, D., ZHOU, J. ir WADHWA, S.S. Drinking Yoghurts with Berry Polyphenols Added before and After Fermentation. *Food Control* [interaktyvus]. 2013, vol. 32, no. 2. pp. 450-460 [žiūrėta 2021-03-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513000261> ISSN 0956-7135. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.011>.
22. CHOUCHOULI, V., et al. Fortification of Yoghurts with Grape (*Vitis Vinifera*) Seed Extracts. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2013, vol. 53, no. 2. pp. 522-529 [žiūrėta 2021-03-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381300100X> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.008>.
23. IWALOKUN, B.A., ir SHITTU, M. O. Effect of Hibiscus sabdariffa (Calyce) Extract on Biochemical and Organoleptic Properties of Yogurt. *Pakistan Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2007, vol. 6, no. 2. pp. 172-182 [žiūrėta 2021-03-17]. Prieiga per: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2007.172.182>
24. MARCHIANI, R., et al. Yogurt Enrichment with Grape Pomace: Effect of Grape Cultivar on Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties. *Journal of Food Quality* [interaktyvus]. 2015, vol. 39, no. 2. pp. 77-89 [žiūrėta 2021-03-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/jfq.12181>
25. ABDEL-HAMID, M., et al. Bioactive Properties of Probiotic Set-Yogurt Supplemented with *Siraitia Grosvenorii* Fruit Extract. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, vol. 303. pp. 125400 [žiūrėta 2021-03-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619315146> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125400>.
26. AMIRDIVANI, S., ir BABA, A. S. H. Green tea yogurt: major phenolic compounds and microbial growth. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, vol. 52. pp. 4652-4660 [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1670-6>.
27. PELAES VITAL, A.C., et al. Microbiological, Functional and Rheological Properties of Low Fat Yogurt Supplemented with *Pleurotus Ostreatus* Aqueous Extract. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, vol. 64, no. 2. pp. 1028-1035 [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815300207> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.003>.
28. Alwazeer, D., Bulut, M., & Tunçtürk, Y. (2020). Fortification of milk with plant extracts modifies the acidification and reducing capacities of yoghurt bacteria. *International Journal of Dairy Technology* [interaktyvus]. 2020, vol. 73, no. 2. pp. 117-125 [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12643>.
29. MASMOUDI, M., AMMAR, I., GHRIBI, H. ir ATTIA, H. Physicochemical, Radical Scavenging Activity and Sensory Properties of a Soft Cheese Fortified with *Arbutus Unedo* L. Extract. *Food Bioscience* [interaktyvus]. 2020, vol. 35. pp. 100579 [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga

- per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429218306710> ISSN 2212-4292.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100579>.
30. MAHAJAN, D., BHAT, Z.F. ir KUMAR, S. Pomegranate (*Punica Granatum*) Rind Extract as a Novel Preservative in Cheese. *Food Bioscience* [interaktyvus]. 2015, vol. 12. pp. 47-53 [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429215300109> ISSN 2212-4292.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.07.005>.
 31. COSTA, C.F., et al. Short Communication: Potential use of Passion Fruit (*Passiflora Cincinnata*) as a Biopreservative in the Production of Coalho Cheese, a Traditional Brazilian Cheese. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2020, vol. 103, no. 4. pp. 3082-3087 [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203022030134X> ISSN 0022-0302.
DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17791>.
 32. CZUBINSKI, J. ir DWIECKI, K. A review of methods used for investigation of protein–phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2016, vol. 52, no. 3. pp. 573-585 [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13339>
 33. VISUOTINĖ LIETUVIŲ ENCIKLOPEDIJA. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-03-19]. Prieiga per: <https://www.vle.lt/straipsnis/pieno-baltymai/>
 34. HASNI, I., et al. Interaction of Milk A- and B-Caseins with Tea Polyphenols. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011, vol. 126, no. 2. pp. 630-639 [žiūrėta 2021-02-28]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610015050> ISSN 0308-8146.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.087>.
 35. YILDIRIM-ELIKOGLU, S. ir ERDEM, Y.K. Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry. *Food Reviews International* [interaktyvus]. 2017, vol. 34, no. 7. pp. 665-697 [žiūrėta 2021-02-28]. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2017.1377225>
 36. CONSIDINE, T., et al. Interactions of Milk Proteins during Heat and High Hydrostatic Pressure Treatments — A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [interaktyvus]. 2007, vol. 8, no. 1. pp. 1-23 [žiūrėta 2021-02-28]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856406000671> ISSN 1466-8564.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.08.003>.
 37. DEAVILLE, E.R. et al. Hydrolyzable Tannin Structures Influence Relative Globular and Random Coil Protein Binding Strengths. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, vol. 55, no. 11. pp. 4554-4561 [žiūrėta 2021-02-28]. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf063770o>
 38. NAGY, K., et al. Non-Covalent Binding of Proteins to Polyphenols Correlates with their Amino Acid Sequence. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2012, vol. 132, no. 3. pp. 1333-1339 [žiūrėta 2021-02-28]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611017171> ISSN 0308-8146.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.113>.
 39. QUAN, T.H., et al. Protein–polyphenol Conjugates: Antioxidant Property, Functionalities and their Applications. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2019, vol. 91. pp. 507-517 [žiūrėta 2021-02-28]. Prieiga

- per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224419303127> ISSN 0924-2244.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.049>.
40. BOHIN, M.C. Efficacy of Food Proteins as Carriers for Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2012, vol. 60, no. 16. pp. 4136-4143 [žiūrėta 2021-02-28]. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf205292r>
 41. PU, P., et al. Six Flavonoids Inhibit the Antigenicity of B-Lactoglobulin by Noncovalent Interactions: A Spectroscopic and Molecular Docking Study. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2021, vol. 339. pp. 128106 [žiūrėta 2021-03-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620319683> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128106>.
 42. MAKORI, S.I., MU, T. ir SUN, H. Physicochemical Properties, Antioxidant Activities, and Binding Behavior of 3,5-Di-O-Caffeoylquinic Acid with Beta-Lactoglobulin Colloidal Particles. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2021, vol. 347. pp. 129084 [žiūrėta 2021-03-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621000868> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129084>.
 43. GHOLAMI, S. ir BORDBAR, A. Exploring Binding Properties of Naringenin with Bovine B-Lactoglobulin: A Fluorescence, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophysical Chemistry* [interaktyvus]. 2014, vol. 187-188. pp. 33-42 [žiūrėta 2021-03-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301462214000131> ISSN 0301-4622. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2014.01.003>.
 44. ABDOLLAHI, K., et al. Combined Spectroscopic and Molecular Docking Study on the pH Dependence of Molecular Interactions between B-Lactoglobulin and Ferulic Acid. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2020, vol. 101. pp. 105461 [žiūrėta 2021-03-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X19313888> ISSN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105461>.
 45. PESSATO, T.B., et al. Protein Structure Modification and Allergenic Properties of Whey Proteins upon Interaction with Tea and Coffee Phenolic Compounds. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2018, vol. 51. pp. 121-129 [žiūrėta 2021-03-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464618305371> ISSN 1756-4646. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.019>.
 46. PRIGENT, S.V.E., et al. Interactions between Globular Proteins and Procyanidins of Different Degrees of Polymerization. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2009, vol. 92, no. 12. pp. 5843-5853 [žiūrėta 2021-03-07]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030209713037> ISSN 0022-0302. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2261>.
 47. AL-HANISH, A., et al. Noncovalent Interactions of Bovine A-Lactalbumin with Green Tea Polyphenol, Epigallocatechin-3-Gallate. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2016, vol. 61. pp. 241-250 [žiūrėta 2021-03-07]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16302090> ISSN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.012>.
 48. LI, T., et al. Binding Mechanism and Antioxidant Capacity of Selected Phenolic Acid - B-Casein Complexes. *Food Research International* [interaktyvus]. 2020, vol. 129. pp. 108802 [žiūrėta 2021-03-08]. Prieiga

- per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691930688X> ISSN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108802>.
49. CHANPHAI, P., et al. Review on the Loading Efficacy of Dietary Tea Polyphenols with Milk Proteins. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2018, vol. 77. pp. 322-328 [žiūrėta 2021-03-08]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X17313504> ISSN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.008>.
 50. DÖNMEZ, Ö, MOGOL, B.A. ir GÖKMEN, V. Syneresis and Rheological Behaviors of Set Yogurt Containing Green Tea and Green Coffee Powders. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2017, vol. 100, no. 2. pp. 901-907 [žiūrėta 2021-03-15]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021630892X> ISSN 0022-0302. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11262>.
 51. VERMERRIS, W. ir NICHOLSON, R. Phenolic Compound Biochemistry [interaktyvus]. U.S.A. 2009 [žiūrėta 2021-03-22]. ISBN 9781402051630. Prieiga per: https://books.google.lt/books?hl=lt&lr=&id=uLzdv8fsRxYC&oi=fnd&pg=PR10&dq=Phenolic+Compound+Biochemistry&ots=1iFF1IPLJH&sig=jIpXxj4ECWcR_E6fSdhSBx67Opo&redir_esc=y#v=onepage&q=Phenolic%20Compound%20Biochemistry&f=false
 52. MUÑOZ, A.E., et al. Evaluation of Differences in the Antioxidant Capacity and Phenolic Compounds of Green and Roasted Coffee and their Relationship with Sensory Properties. *Lwt* [interaktyvus]. 2020, vol. 128. pp. 109457 [žiūrėta 2021-03-20]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820304461> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109457>.
 53. PRAZERES, E.S., et al. Use of Hexamethyldisilazane as a Silanizing Agent in Microwave-Assisted Derivatization for Determining Phenolic Compounds in Wine by Gas Chromatography. *Microchemical Journal* [interaktyvus]. 2021, vol. 161. pp. 105785 [žiūrėta 2021-03-25]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X20337255> ISSN 0026-265X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105785>.
 54. CHISTE, R.C. et al. Bioactive Amines and Phenolic Compounds in Cocoa Beans are Affected by Fermentation. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2017, vol. 228. pp. 484-490 [žiūrėta 2021-03-25]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617301930> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>.
 55. SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, S., et al. Study of the Phenolic Compound Profile and Antioxidant Activity of Human Milk from Spanish Women at Different Stages of Lactation: A Comparison with Infant Formulas. *Food Research International* [interaktyvus]. 2021, vol. 141. pp. 110149 [žiūrėta 2021-03-25]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996921000466> ISSN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110149>.
 56. CHANPHAI, P., et al. Review on the Loading Efficacy of Dietary Tea Polyphenols with Milk Proteins. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2018, vol. 77. pp. 322-328 [žiūrėta 2021-03-25]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X17313504> ISSN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.008>.
 57. MA, G., TANG, C., SUN, X. ir ZHANG, J. The Interaction Mechanism of B-Casein with Oligomeric Proanthocyanidins and its Effect on Proanthocyanidin Bioaccessibility. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2021, vol. 113. pp. 106485 [žiūrėta 2021-03-23]. Prieiga

- per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X20328599> ISSN 0268-005X.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106485>.
58. YANG, H., et al. Bioactive Procyanidins from Dietary Sources: The Relationship between Bioactivity and Polymerization Degree. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2021, vol. 111. pp. 114-127 [žiūrėta 2021-03-23]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224421001709> ISSN 0924-2244. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.063>.
 59. LUCA, S. V. et al. Preparative separation and bioactivity of oligomeric proanthocyanidins. *Phytochemistry Reviews* [interaktyvus]. 2020, vol. 19. pp. 1093-1140 [žiūrėta 2021-03-23]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-019-09611-5>
 60. SOARES, S., MATEUS, N. ir de FREITAS, V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, vol. 55, no. 16. pp. 6726-6735 [žiūrėta 2021-03-23]. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf070905x>
 61. SKRT, M., BENEDIK, E., PODLIPNIK, Č. ir ULRIH, N.P. Interactions of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin using Fluorescence Quenching and Molecular Docking. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2012, vol. 135, no. 4. pp. 2418-2424 [žiūrėta 2021-03-28]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612011156> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.114>.
 62. KANAKIS, C.D., et al. Milk B-Lactoglobulin Complexes with Tea Polyphenols. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011, vol. 127, no. 3. pp. 1046-1055 [žiūrėta 2021-03-27]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611001828> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.079>.
 63. LI, X., et al. Characterization the Non-Covalent Interactions between Beta Lactoglobulin and Selected Phenolic Acids. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2020, vol. 105. pp. 105761 [žiūrėta 2021-03-28]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X19326840> ISSN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105761>.
 64. GENG, S., et al. Interaction Mechanism of Flavonoids and Bovine B-Lactoglobulin: Experimental and Molecular Modelling Studies. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, vol. 312. pp. 126066 [žiūrėta 2021-03-29]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619322149> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126066>.
 65. ZHAO, Q., et al. Effects of Collagen and Casein with Phenolic Compounds Interactions on Protein in Vitro Digestion and Antioxidation. *Lwt* [interaktyvus]. 2020, vol. 124. pp. 109192 [žiūrėta 2021-03-30]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820301808> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109192>.
 66. XU, H., et al. Effect of Chlorogenic Acid Covalent Conjugation on the Allergenicity, Digestibility and Functional Properties of Whey Protein. *Food Chemistry* [interaktyvus], 2019, vol. 298. pp. 125024 [žiūrėta 2021-03-29]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619311264> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125024>.

67. JIANG, J., ZHANG, Z., ZHAO, J. ir LIU, Y. The Effect of Non-Covalent Interaction of Chlorogenic Acid with Whey Protein and Casein on Physicochemical and Radical-Scavenging Activity of in Vitro Protein Digests. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, vol. 268. pp. 334-341 [žiūrėta 2021-03-29]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618309713> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.015>.
68. PHAM, L.B., WANG, B., ZISU, B. ir ADHIKARI, B. Complexation between Flaxseed Protein Isolate and Phenolic Compounds: Effects on Interfacial, Emulsifying and Antioxidant Properties of Emulsions. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2019, vol. 94. pp. 20-29 [žiūrėta 2021-03-29]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X18323257> ISSN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.007>.
69. PRIGENT, S.V.E., et al. Effects of Non-Covalent Interactions with 5-O-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2003, vol. 51, no. 17. pp. 5088-5095 [žiūrėta 2021-03-31]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1021/jf021229w> ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf021229w.
70. WANG, X., HO, C. ir HUANG, Q. Investigation of Adsorption Behavior of (-)-Epigallocatechin Gallate on Bovine Serum Albumin Surface using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, vol. 55, no. 13. pp. 4987-4992 [žiūrėta 2021-03-31]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1021/jf070590l> ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf070590l.
71. SHPIGELMAN, A., ISRAELI, G. ir LIVNEY, Y.D. Thermally-Induced Protein–polyphenol Co-Assemblies: Beta Lactoglobulin-Based Nanocomplexes as Protective Nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids* [interaktyvus]. 2010, vol. 24, no. 8. pp. 735-743 [žiūrėta 2021-03-31]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X10000615> ISSN 0268-005X. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.015>.
72. YILDIRIM-ELIKOGLU, S. Encyclopedia of Food Chemistry L. MELTON, F. SHAHIDI ir P. VARELIS eds., Oxford: Academic Press, 2019 *Interactions between Milk Proteins and Polyphenols in Model Systems Or Complex Dairy Matrices* [interaktyvus]. 2019, pp. 554-559 [žiūrėta 2021-04-03]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965218581> ISBN 9780128140451. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21858-1>.
73. WANG, X., et al. Covalent Complexation and Functional Evaluation of (-)-Epigallocatechin Gallate and A-Lactalbumin. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, vol. 150. pp. 341-347 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613013927> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.127>.
74. STOJADINOVIC, M., et al. Binding Affinity between Dietary Polyphenols and B-Lactoglobulin Negatively Correlates with the Protein Susceptibility to Digestion and Total Antioxidant Activity of Complexes Formed. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2013, vol. 136, no. 3. pp. 1263-1271 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612014434> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.040>.
75. FRAZIER, R.A., PAPADOPOULOU, A. ir GREEN, R.J. Isothermal Titration Calorimetry Study of Epicatechin Binding to Serum Albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

- [interaktyvus]. 2006, vol. 41, no. 5. pp. 1602-1605 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506001713> ISSN 0731-7085. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.004>.
76. LE BOURVELLEC, C. ir RENARD, C.M.G.C. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2012, vol. 52, no. 3. pp. 213-248 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.499808> ISSN 1040-8398. DOI 10.1080/10408398.2010.499808.
 77. RAWEL, H.M., MEIDTNER, K. ir KROLL, J. Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, vol. 53, no. 10. pp. 4228-4235 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0480290> ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf0480290.
 78. PELAES VITAL, A.C., et al. Microbiological, Functional and Rheological Properties of Low Fat Yogurt Supplemented with Pleurotus Ostreatus Aqueous Extract. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, vol. 64, no. 2. pp. 1028-1035 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815300207> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.003>.
 79. MOHAMED AHMED, I.A., et al. Physicochemical Quality Attributes and Antioxidant Properties of Set-Type Yogurt Fortified with Argel (Solenostemma Argel Hayne) Leaf Extract. *Lwt* [interaktyvus]. 2021, vol. 137. pp. 110389 [žiūrėta 2021-04-06]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820313785> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110389>.
 80. BERTOLINO, M., et al. Influence of the Addition of Different Hazelnut Skins on the Physicochemical, Antioxidant, Polyphenol and Sensory Properties of Yogurt. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2015, vol. 63, no. 2. pp. 1145-1154 [žiūrėta 2021-04-06]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815002674> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.113>.
 81. LI, Y., et al. Engineering Polyphenols with Biological Functions Via Polyphenol-Protein Interactions as Additives for Functional Foods. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2021, vol. 110. pp. 470-482 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224421001102> ISSN 0924-2244. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.009>.
 82. YANG, C.S., LEE, M. ir CHEN, L. Human Salivary Tea Catechin Levels and Catechin Esterase Activities: Implication in Human Cancer Prevention Studies. *American Association for Cancer Research* [interaktyvus]. 1999, vol. 8. pp. 83-89 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: <https://cebp.aacrjournals.org/content/8/1/83.short> ISSN 1055-9965.
 83. GINSBURG, I., et al. Saliva Increases the Availability of Lipophilic Polyphenols as Antioxidants and Enhances their Retention in the Oral Cavity. *Archives of Oral Biology* [interaktyvus]. 2012, vol. 57, no. 10. pp. 1327-1334 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996912001434> ISSN 0003-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.04.019>.
 84. KONISHI, Y., ZHAO, Z. ir SHIMIZU, M. Phenolic Acids are Absorbed from the Rat Stomach with Different Absorption Rates. *American Chemical Society (ACS)* [interaktyvus]. 2006, vol. 54,

- pp. 7549-7543 [žiūrēta 2021-04-07]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17002419/> ISBN 0021-8561. DOI 10.1021/jf061554+.
85. Farrell T. L., Dew T. P., Poquet L., Hanson P. ir Williamson G. Absorption and Metabolism of Chlorogenic Acids in Cultured Gastric Epithelial Monolayers [interaktyvus]. 2011, vol. 39 no. 12. pp. 2338-2346, [žiūrēta 2021-04-07]. Prieiga per: <https://dmd.aspetjournals.org/content/39/12/2338.short> ISSN 0090-9556. DOI <https://doi.org/10.1124/dmd.111.040147>
 86. SIROTA, R., et al. Coffee Polyphenols Protect Human Plasma from Postprandial Carbonyl Modifications. *Molecular Nutrition & Food Research* [interaktyvus]. 2013, vol. 57, no. 5. pp. 916-919 [žiūrēta 2021-04-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200557> ISSN 1613-4125. DOI <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200557>.
 87. BETZ, M., et al. Antioxidant Capacity of Bilberry Extract Microencapsulated in Whey Protein Hydrogels. *Food Research International* [interaktyvus]. 2012, vol. 47, no. 1. pp. 51-57 [žiūrēta 2021-04-10] Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912000452> ISSN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.010>.
 88. DANG, Y.J. ir ZHU, C.Y. Genomic Study of the Absorption Mechanism of P-Coumaric Acid and Caffeic Acid of Extract of Ananas Comosus L. Leaves. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2015, vol. 80, no. 3. pp. 504 [žiūrēta 2021-04-10]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25678210/> ISSN 1750-3841. DOI 10.1111/1750-3841.12774
 89. TENG, Z., et al. Intestinal Absorption and First-Pass Metabolism of Polyphenol Compounds in Rat and their Transport Dynamics in Caco-2 Cells. *PloS One* [interaktyvus]. 2012, vol. 7, no. 1. pp. 29647 [žiūrēta 2021-04-11]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22253753/> ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0029647
 90. MULLEN, W., EDWARDS, C.A. ir CROZIER, A. Absorption, Excretion and Metabolite Profiling of Methyl-, Glucuronyl-, Glucosyl- and Sulpho-Conjugates of Quercetin in Human Plasma and Urine After Ingestion of Onions. *British Journal of Nutrition* [interaktyvus]. 2006, vol. 96, no. 1 pp. 107-116 [žiūrēta 2021-04-11]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16869998/> ISSN 0007-1145. DOI 10.1079/BJN20061809.
 91. WU, X., et al. Dietary Polyphenols for Managing Cancers: What have we Ignored?. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2020, vol. 101. pp. 150-164 [žiūrēta 2021-04-13]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224420304787> ISSN 0924-2244. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.017>.
 92. XIE, M., et al. Hydrolysis of Dicafeoylquinic Acids from Ilex Kudingcha Happens in the Colon by Intestinal Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2016, vol. 64, no. 51. pp. 9624-9630 [žiūrēta 2021-04-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04710> ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/acs.jafc.6b04710.
 93. GROSS, G., et al. In Vitro Bioconversion of Polyphenols from Black Tea and Red Wine/Grape Juice by Human Intestinal Microbiota Displays Strong Interindividual Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2010, vol. 58, no. 18. pp 10236-10246 [žiūrēta 2021-04-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf101475m> ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf101475m.
 94. LAMOTHE, S., et al. Interaction of Green Tea Polyphenols with Dairy Matrices in a Simulated Gastrointestinal Environment. *Food & Function* [interaktyvus]. 2014, vol. 5, no. 1. pp. 2621-

- 2631 [žiūrēta 2021-04-15]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25154916> MEDLINE. ISSN 2042-6496. DOI 10.1039/c4fo00203b.
95. HELAL, A. ir TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in-Vitro Gastro-Pancreatic Digestion on Polyphenols and Cinnamaldehyde Bioaccessibility and Antioxidant Activity in Stirred Cinnamon-Fortified Yogurt. *Lwt* [interaktyvus]. 2018, vol. 89. pp. 164-170 [žiūrēta 2021-04-16]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817308009> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.047>.
96. PAN, L., LIU, F., LUO, S. ir LUO, J. Pomegranate Juice Powder as Sugar Replacer Enhanced Quality and Function of Set Yogurts: Structure, Rheological Property, Antioxidant Activity and in Vitro Bioaccessibility. *Lwt* [interaktyvus]. 2019, vol. 115. pp. 108479 [žiūrēta 2021-04-16]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819308217> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108479>.
97. ARIMBOOR, R. ir ARUMUGHAN, C. Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) Proanthocyanidins Inhibit In Vitro Enzymatic Hydrolysis of Protein. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2011, vol. 76, no. 6. pp. 130-137 [žiūrēta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2011.02238.x> MEDLINE. ISSN 0022-1147. DOI 10.1111/j.1750-3841.2011.02238.x.
98. CAO, Y. XIONG, Y.L. Interaction of Whey Proteins with Phenolic Derivatives Under Neutral and Acidic pH Conditions. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2017, vol. 82, no. 2. pp. 409-419 [žiūrēta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13607> ISSN 0022-1147. DOI <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13607>.
99. ZHOU, S., et al. Effect of Non-Covalent and Covalent Complexation of (-)-Epigallocatechin Gallate with Soybean Protein Isolate on Protein Structure and in Vitro Digestion Characteristics. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, vol. 309. pp. 125718 [žiūrēta 2021-04-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619318473> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125718>.
100. BRESCIANI, L., et al. In Vitro (Poly)Phenol Catabolism of Unformulated- and Phytosome-Formulated Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) Extracts. *Food Research International* [interaktyvus]. 2021, vol. 141. pp. 110137 [žiūrēta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399692100034X> ISSN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110137>.
101. ČESONIENĖ, L. ir DAUBARAS, R. Nutritional Composition of Fruit Cultivars M.S.J. SIMMONDS and V.R. PREEDY eds., San Diego: Academic Press, 2016 *Chapter 8 - Phytochemical Composition of the Large Cranberry (Vaccinium Macrocarpon) and the Small Cranberry (Vaccinium Oxycoccos)* [interaktyvus]. 2016, pp. 173-194 [žiūrēta 2021-04-18]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124081178000088> ISBN 9780124081178. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00008-8>.
102. TAMKUTĖ, L., LIEPUONIŪTĖ, R., PUKALSKIENĖ, M. ir VENSKUTONIS, P.R. Recovery of Valuable Lipophilic and Polyphenolic Fractions from Cranberry Pomace by Consecutive Supercritical CO₂ and Pressurized Liquid Extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* [interaktyvus]. 2020, vol. 159. pp. 104755 [žiūrēta 2021-04-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844620300061> ISSN 0896-8446. DOI <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104755>.

103. DIARRA, M.S., et al. Antibacterial Activities of a Polyphenolic-Rich Extract Prepared from American Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) Fruit Pomace Against *Listeria* Spp. *Lwt* [interaktyvus]. 2020, vol. 123. pp. 109056 [žiūrėta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382030044X> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109056>.
104. CÔTÉ, J., et al. Antimicrobial Effect of Cranberry Juice and Extracts. *Food Control* [interaktyvus]. 2011, vol. 22, no. 8. pp. 1413-1418 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511000831> ISSN 0956-7135. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.024>.
105. BLUMBERG, J.B., et al. Impact of Cranberries on Gut Microbiota and Cardiometabolic Health: Proceedings of the Cranberry Health Research Conference 2015. *Advances in Nutrition* [interaktyvus]. 2016, vol. 7, no. 4 pp. 759S-770S [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3945/an.116.012583> ISSN 2161-8313. DOI 10.3945/an.116.012583.
106. JIAO, J., et al. Anti-Aging and Redox State Regulation Effects of A-Type Proanthocyanidins-Rich Cranberry Concentrate and its Comparison with Grape Seed Extract in Mice. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2017, vol. 30. pp. 63-73 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616304376> ISSN 1756-4646. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.039>.
107. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. *Safety of cranberry extract powder as a novel food ingredient pursuant to Regulation*. 2017, May 12. No 258/97 [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-04-25]. Prieiga per: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4777>
108. SLINKARD, K, ir SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* [interaktyvus]. 1977, vol. 28, pp. 49–55 [žiūrėta 2021-03-15].
109. WATERMAN, P.G. ir Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Methods in Ecology. Oxford. ISBN 0632029692
110. BAI, M., et al. Probiotic *Lactobacillus Casei* Zhang Improved the Properties of Stirred Yogurt. *Food Bioscience* [interaktyvus], 2020, vol. 37. pp. 100718 [žiūrėta 2021-03-18]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429220310567> ISSN 2212-4292. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100718>.
111. LST ISO 15214:2009. *Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis mezofilinių pieno rūgšties bakterijų skaičiavimo metodas. Kolonijų skaičiavimas 30 °C temperatūroje būdas (tapatus ISO 15214:1998)*. Vilnius: Lietuvos standartizacijos departamentas, 2009.
112. MINEKUS, M., et al. A Standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food—an International Consensus. *Food & Function*, 2014, vol. 5, no. 6. pp. 1113-1124 [žiūrėta 2021-03-18].
113. UDENFRIEND, S., S. STEIN, P. BÖHLEN, W. DAIRMAN, W. LEIMGRUBER ir M.WEIGELE. Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *American Association for the Advancement of Science* [interaktyvus]. 1972, 178(4063), 871-872 [žiūrėta 2021-03-19]. ISSN 0036-8075. Prieiga per: doi: [10.1126/science.178.4063.871](https://doi.org/10.1126/science.178.4063.871)
114. LIU, J., et al. Improving the Color Stability and Antioxidation Activity of Blueberry Anthocyanins by Enzymatic Acylation with P-Coumaric Acid and Caffeic Acid. *Lwt* [interaktyvus]. 2020, vol. 130. pp. 109673 [žiūrėta 2021-04-04]. Prieiga

- per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820306629> ISSN 0023-6438.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109673>.
115. DENEV, P., ČÍŽ, M., KRATCHANOVA, M. ir BLAZHEVA, D. Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Polyphenols Reveal Different Antioxidant, Antimicrobial and Neutrophil-Modulating Activities. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2019, vol. 284. pp. 108-117 [žiūrėta 2021-04-11]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619301761> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.108>.
116. TABASCO, R., et al. Effect of Grape Polyphenols on Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Growth: Resistance and Metabolism. *Food Microbiology* [interaktyvus]. 2011, vol. 28, no. 7. pp. 1345-1352 [žiūrėta 2021-04-11]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002011001420> ISSN 0740-0020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.005>.
117. DURMUS, N., CAPANOGLU, E. ir KILIC-AKYILMAZ, M. Activity and Bioaccessibility of Antioxidants in Yoghurt Enriched with Black Mulberry as Affected by Fermentation and Stage of Fruit Addition. *International Dairy Journal* [interaktyvus]. 2021, vol. 117. pp. 105018 [žiūrėta 2021-04-13]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694621000467> ISSN 0958-6946. DOI <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105018>.
118. SILVA, D., F., et al. Physical, microbiological and rheological properties of probiotic yogurt supplemented with grape extract. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2017, pp. 1608-1615 [žiūrėta 2021-04-13]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-017-2592-x#citeas>
119. KWON, H.C., BAE, H., SEO, H.G. ir HAN, S.G. Short Communication: Chia Seed Extract Enhances Physicochemical and Antioxidant Properties of Yogurt. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2019, vol. 102, no. 6. pp. 4870-4876 [žiūrėta 2021-04-13]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219303662> ISSN 0022-0302. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16129>.
120. NING, X., et al. Fortification of Set Yogurt with Passion Fruit Juice: Effects on Fermentation Kinetics, Physicochemical Properties, and Functionality. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2021, vol. 104, no. 4. pp. 4084-4093 [žiūrėta 2021-04-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022030221001272> ISSN 0022-0302. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19261>.
121. LUCEY, J.A. Milk Proteins (Second Edition) H. SINGH, M. BOLAND and A. THOMPSON eds., San Diego: Academic Press, 2014 *Chapter 17 - Milk Protein Gels* [interaktyvus]. 2009, pp. 493-523 [žiūrėta 2021-04-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124051713000179> ISBN 9780124051713. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3.00017-9>.
122. WALSTRA, P., WOULTERS, J. T. M., ir GEURTS, T. J. Dairy science and technology (2nd ed.). Taylor & Francis, 2005. ISBN 9780824727635
123. LUCEY, J.A. ir SINGH, H. Formation and Physical Properties of Acid Milk Gels: A Review. *Food Research International* [interaktyvus]. 1997, vol. 30, no. 7. pp. 529-542 [žiūrėta 2021-04-12]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996998000155> ISSN 0963-9969. DOI [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5).

124. CALABRESE A., C. GIBBY, B. MEINKE, M. K. F. REVILLA ir A. TITCHENAL. Human nutrition. [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per: <http://pressbooks-dev.oer.hawaii.edu/humannutrition/>
125. OZDAL, T., CAPANOGLU, E. ir ALTAY, F. A Review on Protein–phenolic Interactions and Associated Changes. *Food Research International* [interaktyvus]. 2013, vol. 51, no. 2. pp. 954-970 [žiūrėta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001026?via%3Dihub> ISSN 0963-9969. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>.
126. LAMOTHE, S., et al. Interaction of Green Tea Polyphenols with Dairy Matrices in a Simulated Gastrointestinal Environment. *Food & Function* [interaktyvus]. 2014, vol. 5, no. 1. pp. 2621-2631 [žiūrėta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25154916> MEDLINE. ISSN 2042-6496. DOI 10.1039/c4fo00203b.
127. LUCAS-GONZALEZ, R., et al. Assessment of Polyphenolic Profile Stability and Changes in the Antioxidant Potential of Maqui Berry (*Aristotelia Chilensis* (Molina) Stuntz) during in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2016, vol. 94. pp. 774-782 [žiūrėta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016306550> ISSN 0926-6690. DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.057>.
128. HELAL, A. ir TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in-Vitro Gastro-Pancreatic Digestion on Polyphenols and Cinnamaldehyde Bioaccessibility and Antioxidant Activity in Stirred Cinnamon-Fortified Yogurt. *Lwt* [interaktyvus]. 2018, vol. 89. pp. 164-170 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817308009> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.047>.
129. OLIVEIRA, A. and PINTADO, M. Stability of Polyphenols and Carotenoids in Strawberry and Peach Yoghurt Throughout in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Food & Function* [interaktyvus]. 2015, vol. 6, no. 5. pp. 1611-1619 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: <https://search.proquest.com/docview/1683349039> AIDS and Cancer Research Abstracts. ISSN 2042-6496. DOI 10.1039/c5fo00198f.
130. PAN, L., LIU, F., LUO, S. ir LUO, J. Pomegranate Juice Powder as Sugar Replacer Enhanced Quality and Function of Set Yogurts: Structure, Rheological Property, Antioxidant Activity and in Vitro Bioaccessibility. *Lwt* [interaktyvus]. 2019, vol. 115. pp. 108479 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819308217> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108479>.
131. CHEN, F., LI, B. ir TANG, C. Nanocomplexation between Curcumin and Soy Protein Isolate: Influence on Curcumin Stability/Bioaccessibility and in Vitro Protein Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2015, vol. 63, no. 13. pp. 3559-3569 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00448> MEDLINE. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/acs.jafc.5b00448.
132. XIONG, J., et al. Enhanced Stability of Berry Pomace Polyphenols Delivered in Protein-Polyphenol Aggregate Particles to an in Vitro Gastrointestinal Digestion Model. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2020, vol. 331. pp. 127279 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620311419> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127279>.

133. CATALKAYA, G., et al. Interaction of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota: Microbial Metabolism of Polyphenols, Influence on the Gut Microbiota, and Implications on Host Health. *Food Frontiers* [interaktyvus]. 2020, pp. 109-133 [žiūrėta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fft2.25> ISBN 2643-8429. DOI 10.1002/fft2.25.
134. KOSTIĆ, A.Ž., et al. Polyphenol Bioaccessibility and Antioxidant Properties of in Vitro Digested Spray-Dried Thermally-Treated Skimmed Goat Milk Enriched with Pollen. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2021, vol. 351. pp. 129310 [žiūrėta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621003162> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129310>.
135. DEMIRKOL, M. ir TARAKCI, Z. Effect of Grape (*Vitis Labrusca L.*) Pomace Dried by Different Methods on Physicochemical, Microbiological and Bioactive Properties of Yoghurt. *Lwt* [interaktyvus]. 2018, vol. 97. pp. 770-777 [žiūrėta 2021-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643818306418> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.058>.
136. HASNEEN, D.F., et al. Comparative Evaluation of some Herbs and their Suitability for Skimmed Milk Yoghurt and Cast Kariesh Cheese Fortification as Functional Foods. *Annals of Agricultural Sciences* [interaktyvus]. 2020, vol. 65, no. 1. pp. 6-12 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0570178320300191> ISSN 0570-1783. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.05.001>.
137. LIU, D. and LV, X.X. Effect of Blueberry Flower Pulp on Sensory, Physicochemical Properties, Lactic Acid Bacteria, and Antioxidant Activity of Set-type Yogurt during Refrigeration. *Journal of Food Processing and Preservation* [interaktyvus]. 2019, vol. 43, no. 1. pp. e13856-n/a. [žiūrėta 2021-04-23]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13856> CrossRef. ISSN 0145-8892. DOI 10.1111/jfpp.13856.
138. ANUYAHONG, T., CHUSAK, C. ir ADISAKWATTANA, S. Incorporation of Anthocyanin-Rich Riceberry Rice in Yogurts: Effect on Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Lwt* [interaktyvus]. 2020, vol. 129. pp. 109571 [žiūrėta 2021-04-23]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820305600> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109571>.
139. DÖNMEZ, Ö, MOGOL, B.A. ir GÖKMEN, V. Syneresis and Rheological Behaviors of Set Yogurt Containing Green Tea and Green Coffee Powders. *Journal of Dairy Science* [interaktyvus]. 2017, vol. 100, no. 2. pp. 901-907 [žiūrėta 2021-04-23]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021630892X> ISSN 0022-0302. DOI <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11262>.
140. CHOUCHOULI, V., et al. Fortification of Yoghurts with Grape (*Vitis Vinifera*) Seed Extracts. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2013, vol. 53, no. 2. pp. 522-529 [žiūrėta 2021-04-23]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381300100X> ISSN 0023-6438. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.008>.
141. MARCHIANI, R., et al. Yogurt Enrichment with Grape Pomace: Effect of Grape Cultivar on Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties. *Journal of Food Quality* [interaktyvus]. 2016, vol. 39, no. 2. pp. 77-89 [žiūrėta 2021-04-23]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfq.12181> ISSN 0146-9428. DOI 10.1111/jfq.12181.

142. FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Codex alimentarius: standard for fermented milks*. 2018, CXS 243-2003 [interaktyvus]. [žiūrėta 2021-04-28]. Prieiga per: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en>.
143. TRIPATHI, M.K. ir GIRI, S.K. Probiotic Functional Foods: Survival of Probiotics during Processing and Storage. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2014, vol. 9. pp. 225-241 [žiūrėta 2021-05-03]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001716> ISSN 1756-4646. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>.
144. CAO, Y. and XIONG, Y.L. Interaction of Whey Proteins with Phenolic Derivatives Under Neutral and Acidic pH Conditions. *Journal of Food Science* [interaktyvus]. 2017, vol. 82, no. 2. pp. 409-419 [žiūrėta 2021-05-07]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1750-3841.13607> MEDLINE. ISSN 0022-1147. DOI 10.1111/1750-3841.13607.
145. JIANG, J., ZHANG, Z., ZHAO, J. ir LIU, Y. The Effect of Non-Covalent Interaction of Chlorogenic Acid with Whey Protein and Casein on Physicochemical and Radical-Scavenging Activity of in Vitro Protein Digests. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2018, vol. 268. pp. 334-341. [žiūrėta 2021-05-07]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618309713> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.015>.
146. BOUAYED, J., DEUSSER, H., HOFFMANN, L. ir BOHN, T. Bioaccessible and Dialysable Polyphenols in Selected Apple Varieties Following in Vitro Digestion Vs. their Native Patterns. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2012, vol. 131, no. 4. pp. 1466-1472 [žiūrėta 2021-05-07]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611014804> ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.030>.
147. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. and BERSSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 1995, vol. 28, no. 1. pp. 25-30 [žiūrėta 2021-05-21]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085> ISSN 0023-6438. DOI [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).