



L A U R A T A M K U T Ė

**SPANGUOLIŲ IŠSPAUDŲ
VERTĖS DIDINIMAS JAS
BIORAFINUOJANT Į VERTINGAS
FUNKCIONALIAŠIAS
MAISTO MEDŽIAGAS DIDELIO
SLĖGIO EKSTRAKCIJOS IR
FRAKCIONAVIMO METODAIS**

D A K T A R O D I S E R T A C I J O S
S A N T R A U K A

T E C H N O L O G I J O S
M O K S L A I , C H E M I J O S
I N Ž I N E R I J A (T 0 0 5)

K a u n a s
2 0 2 0

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

LAURA TAMKUTĖ

**SPANGUOLIŲ IŠSPAUDŲ VERTĖS DIDINIMAS JAS
BIORAFINUOJANT Į VERTINGAS FUNKCIONALIAŠIAS
MAISTO MEDŽIAGAS DIDELIO SLĖGIO EKSTRAKCIJOS IR
FRAKCIONAVIMO METODAIS**

Daktaro disertacijos santrauka
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (T 005)

2020, Kaunas

Disertacija rengta 2016–2020 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedroje. Dalis disertacijoje pateiktų rezultatų gauti atliekant praktikas Reunjono salos universiteto Reunjono ir Indijos vandenyno institute bei Burgoso universiteto Biotechnologijos ir maisto mokslo katedroje.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Redagavo: Inga Nanartonytė

Chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

Prof. dr. Virgilijus VALEIKA (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005) – **pirmininkas**;

Doc. dr. Ina JASUTIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005);

Doc. dr. Vilma KAŠKONIENĖ (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003);

Dr. Dalija SEGLINA (Latvijos gyvybės mokslų ir technologijų universiteto Sodininkystės institutas, gamtos mokslai, chemija, N 003);

Doc. dr. Antanas ŠARKINAS (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Disertacija bus ginama viešame chemijos inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2020 m. sausio 8 d. 11 val. Kauno technologijos universiteto centrinių rūmų Disertacijų gynimo salėje.

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

Tel. +370 37 300 042; faks. +370 37 324 144; el. paštas doktorantura@ktu.lt.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2020 m. gruodžio 8 d.

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

SIMBOLIAI IR SANTRUMPOS

AA – antioksidacinis aktyvumas

ABTS⁺ – 2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfonrūgšties katijono laisvasis radikalas

AMB – aerobinės mezofilinės bakterijos

BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis

CKCP – centriškai kompozicinis centrinis planas

CKP – centriškai kompozicinis planas

DC – dujų chromatografija

DRAG – deguonies radikalo absorbcijos geba

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija

EtOH – etanolis

ETPS – ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje

GRE – galo rūgšties ekvivalentai

KSV – kolonijas sudarantys vienetai

LF – lengvesnioji frakcija

LLLn – dilinoil-linolenoilglicerolis

LLnLn – linoil-dilinenoilglicerolis

LnLnLn – trilinolenoilglicerolis

MS – masių spektrometrija

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas

OLnL – oleinoil-linolenoil-linoilglicerolis

PAM – paviršiaus atsako metodologija

PFV – plokštelių formavimo vienetai

PRB – pieno rūgšties bakterijos

QUENCHER – antioksidacinio aktyvumo nustatymo sausojoje medžiagoje metodika

RR – riebalų rūgštys

SF – sunkesnioji frakcija

SK-CO₂ – superkritinis anglies dioksidas

SKE-CO₂ – superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu

SM – sausoji medžiaga

SN – standartinis nuokrypis

TBARS – tiobarbitūrinės rūgšties reaktyviosios medžiagos

TE – trolokso ekvivalentai

UESC-K-SL-MA – ultraefektyvioji skysčių chromatografija, susieta su kvadrupoliniu ir skriejimo laiko masių analizatoriais

ZIKV – Zikos virusas

ZIKV_{GFP} – afrikinio Zikos viruso molekulinis klonas, išreiškiantis žalio fluorescencinio baltymo (GFP) geną

IVADAS

Dauguma uogų pasižymi puikiu skoniu, tačiau kai kurios iš jų yra karčios, todėl šviežios vartojamos retai. Uogos labai greitai genda, todėl yra perdirbamos į sultis, uogienes ar džemus. Spaudžiant sultis gaunamos išspaudos, kurios sudaro 20–30 % pradinio uogų svorio. Dažniausiai išspaudos yra išmetamos, kompostuojamos, rečiau naudojamos gyvuliams šerti. Jose gausu įvairių bioaktyviųjų junginių, tokių kaip tokoferoliai, fitosteroliai, polifenoliai. Norint neprarasti šių vertingų komponentų ir sumažinti neigiamą atliekų poveikį aplinkai, pritaikius įvairius ekstrakcijos būdus galima juos išskirti.

Visuomenė vis daugiau dėmesio skiria sveikiems, saugiems maisto produktams be sintetinių maisto priedų. Dėl šios priežasties atliekama vis daugiau tyrimų ieškant natūralių, saugių ir vertingų bioaktyviųjų komponentų, išskirtų iš uogų, daržovių ar vaisių, kuriuos būtų galima panaudoti kaip natūralius konservantus ar antioksidantus. Įvairūs tyrimai parodė, kad maisto pramonės šalutiniuose produktuose (atliekose), tarp jų ir išspaudose, lieka didelis kiekis bioaktyviųjų junginių, kurie gali būti panaudoti maisto, farmacijos ir kosmetikos pramonėje. Nuolat augant maisto pramonei, kasmet susidaro vis daugiau atliekų, todėl tolesnis jų perdirbimas tampa labai svarbiu uždaviniu. Siekiant sukurti efektyvias šalutinių maisto produktų perdirbimo technologijas, pirmenybė teikiama ekologiškiems procesams, kurių metu siekiama išvengti kenksmingų organinių tirpiklių, mažinti energijos ir kitų išteklių naudojimą. Todėl pritaikius daugiapakopę biorafinavimo technologiją, apimančią tokius metodus kaip superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu bei ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje, galima išskirti didelės pridėtinės vertės sudedamąsias dalis. Norint pasiekti geresnių rezultatų, šiuos ekstrahavimo metodus galima papildyti įvairiais matematiniais optimizavimo metodais.

Stambiauogės spanguolės yra Šiaurės šalyse paplitusios rūgštaus skonio uogos, kurios dažniausiai perdirbamos į įvairius produktus, tarp jų ir sultis. Dėl bioaktyviųjų junginių gausos jos naudojamos ne tik maistui, bet ir liaudies medicinoje. Pavyzdžiui, spanguolėse esantys polifenoliniai junginiai pasižymi antimikrobinio poveikiu kai kurioms patogeninėms bakterijoms (*Staphylococcus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*), sukeliančioms per maistą plintančias ligas. Uogose esančios fitocheminės medžiagos gali būti išskirtos taikant įvairius ekstrakcijos būdus ir panaudojamos daugybės maisto produktų funkcionalumui pagerinti. Kadangi anksčiau nebuvo atlikta sisteminių spanguolių išspaudų perdirbimo tyrimų, todėl šiame darbe tiriama spanguolių išspaudų valorizacija taikant daugiapakopę biorafinavimo technologiją, skirtą išgauti kokybiškiems funkcionaliesiems komponentams ir jiems pritaikyti mėsos produktuose.

Darbo tikslas

Šio darbo tikslas – įvertinti spanguolių išspaudų valorizaciją taikant efektyvią daugiapakopę biorafinavimo technologiją, skirtą išgauti vertingiems funkcionaliesiems komponentams, pasitelkus didelio slėgio ekstrakcijos / frakcionavimo metodus ir įvertinti jų fitocheminę sudėtį, biologines bei technologines savybes.

Darbo tikslui pasiekti buvo išsikelti šie uždaviniai:

1. Taikant centriškai kompozicinį planą kartu su paviršiaus atsako metodologija nustatyti optimalius superkritinės ekstrakcijos anglies dioksidu parametrus (temperatūrą, ekstrahavimo trukmę ir slėgį), siekiant gauti didžiausią spanguolių išspaudų lipofilinės frakcijos išeigą ir nustatyti jos riebalų rūgščių sudėtį; ištirti ekstrahavimo kinetiką esant optimaliam slėgiui bei temperatūrai.

2. Įvertinti spanguolių išspaudų lipofilinės frakcijos frakcionavimo galimybes taikant superkritinę ekstrakciją anglies dioksidu, naudojant gryną anglies dioksidą arba papildomai įterpiant etanolio. Atlikti frakcionavimą naudojant du ekstrahavimo separatorius ir juose keičiant temperatūrą subkritinio CO₂ lygio intervale esant pastoviam slėgiui; apibūdinti gautų frakcijų sudėtį.

3. Įvertinti didesnio poliškumo superkritiniame CO₂ netirpių komponentų frakcionavimo iš spanguolių išspaudų, iš kurių pašalinti riebalai, galimybes taikant ekstrakciją tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje su etanolio bei vandeniu. Optimizuoti ekstrakcijos padidinto slėgio aplinkoje su etanolio sąlygas, taikant centriškai kompozicinį planą kartu su paviršiaus atsako metodologija, ir charakterizuoti gautus ekstraktus.

4. Apibūdinti polinių ekstraktų, gautų taikant ekstrakciją tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje, fitocheminę sudėtį, antivėžines, antivirusines bei antimikrobines savybes ir kiekybiškai įvertinti atskirus antocianinus.

5. Įvairiais *in vitro* metodais įvertinti lipofilinio, etanolinio ir vandeninio ekstraktų bei ekstrakcijos liekanų antioksidacinį potencialą.

6. Įvertinti etanolinio ekstrakto priedo pritaikomumą kiaulienos produktuose tiriant jo poveikį pasirinktų maisto patogeninių mikroorganizmų, pieno rūgšties bakterijų bei aerobinių mezofilinių bakterijų augimui ir nustatyti antioksidacinę gebą, fizikochemines bei juslines savybes.

Mokslinio darbo naujumas

1. Pirmą kartą pritaikyta spanguolių išspaudų biorafinavimo į lipofilines ir hidrofilines frakcijas taikant didelio slėgio technologijas, tokias kaip superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu (SKE-CO₂) ir ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje (ETPS), koncepcija. Ji visapusiškai įvertinta siekiant išskirti didelės pridėtinės vertės funkcionaliuosius komponentus. Padidinto slėgio ekstrakcijų parametrai optimizuoti siekiant gauti didžiausią išeigą.

2. Šiame darbe pirmą kartą pritaikytas tiesioginis uogų išspaudų lipofilinių medžiagų frakcionavimas superkritinės ekstrakcijos anglies dioksidu metodu (naudojant gryną anglies dioksidą arba papildomai įterpiant etanolio). Pirmajame separatoriuje, nustačius žemesnę nei 0 °C temperatūrą, išskirstyti ir sukonzentruoti skirtingų klasių lipofiliniai junginiai.

3. Pirmą kartą išbandyta ir įvertinta, kokį poveikį spanguolių išspaudų poliniai ekstraktai turi Zikos viruso infekcijai.

4. Pirmą kartą ištirtas spanguolių išspaudų ekstraktų (etanolio ir vandens), iš eilės išskirtų suslėgtais tirpikliais, poveikis patogeninių ir gedimą sukeliančių bakterijų augimui jų kultūrose bei mėsos produktuose (ištraukoje, mėsainiuose ir kumpiuose), įvertinta įtaka jų stabilumui ir juslinėms savybėms.

Praktinė darbo vertė

Spaudžiant sultis susidaro didelis kiekis atliekų (išspaudų), kurios paprastai yra išmetamos. Taikant didelio slėgio ekstrakcijų sistemas (SKE-CO₂ ir ETPS) kartu su matematiniais modeliavimo metodais, buvo efektyviai išskirti spanguolių išspaudose esantys bioaktyvieji junginiai. Ekstrakto frakcionavimas taikant SKE-CO₂ leidžia paskirstyti skirtingas lipidų klases (tokoferolius, fitosterolius ir kt.) separatoriuose ir gauti tikslinės (geresnės) sudėties frakcijas. Etanolinis ekstraktas, išskirtas taikant ekstrakciją tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje, panaudotas siekiant užtikrinti mėsos gaminių saugą ir kokybę.

Darbo rezultatų publikavimas

Disertacijos tema paskelbti 3 straipsniai „Clarivate analytics WOS“ pagrindinio sąrašo leidiniuose. Darbo rezultatai pristatyti 6 tarptautinėse ir 2 nacionalinėse konferencijose.

Disertacijos struktūra

Disertacija yra parašyta anglų kalba. Ją sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektų ir metodų aprašymas, rezultatų aptarimas, išvados, naudotos literatūros sąrašas (275 šaltiniai) bei disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas. Disertacijos medžiaga išdėstyta 145 puslapiuose. Darbe pateiktos 25 lentelės ir 33 paveikslai.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Taikant nuoseklų spanguolių išspaudų ekstrahavimą superkritiniu CO₂ ir didesnio poliškumo tirpikliais padidintame slėgyje, galima išskirti vertingas frakcijas, pasižyminčias stipriu antioksidaciniu, antimikrobiniu bei antivirusiniu poveikiu ir didele bioaktyviųjų medžiagų koncentracija; kadangi SKE-CO₂ ir ETPS ekstrakcijų modeliavimas taikant paviršiaus atsako metodologiją pagal centrinę centriškai kompozicinį planą (CKCP) yra efektyvus būdas nustatyti optimalius ekstrakcijos parametrus.

2. Ekstrahavimas esant superkritinei tirpiklio būsenai ir frakcionavimas esant subkritiniams CO₂ parametrų yra efektyvus būdas gauti didesnio specifiškumo spanguolių išspaudų frakcijas su didesne įvairių klasių lipofilinių junginių koncentracija.

3. Poliniai spanguolių išspaudų, iš kurių pašalinti riebalai, ekstraktai, išskirti naudojant tirpiklius padidinto slėgio aplinkoje, gali pagerinti mėsos produktų saugą ir kokybę.

2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

2.1. Tyrimų objektai

Šaldytų spanguolių (*Vaccinium macrocarpon*) 2016 m. padovanojo UAB „Fudo“. Atitirpinus uogas, išspausdus jų sultys, o gautos išspausdus išdžiovintos ir sumaltos rotoriniu smulkintuvu naudojant sietelį su 0,2 mm skersmens akutėmis. Paruošti išspaudų milteliai buvo laikomi hermetiškuose stikliniuose induose, vėsioje ir sausoje vietoje. Šviežios kiaulienos gauta iš įmonės „Campofrio“, ji laikyta šaldytuve (<5 °C).

2.2. Tyrimų metodai

Spanguolių išspaudų biorafinavimo schema pateikta **1 pav.** Lipofilinė frakcija iš spanguolių išspaudų išgauta taikant superkritinę ekstrakciją anglies dioksidu (SKE-CO₂) arba tradicinę Soksleto ekstrakciją AOAC (920,39) metodu. Pirmiausia taikant centriškai kompozicinį planą (CKP) kartu su paviršiaus atsako metodologija (PAM) optimizuota SKE-CO₂: nustatytos optimalios temperatūros, ekstrakcijos trukmės ir slėgio vertės siekiant gauti didžiausią išeigą. Optimaliomis sąlygomis atliktas lipofilinių junginių frakcionavimas su SKE-CO₂. Naudoti du separatoriai: viename (pirmajame) temperatūra sumažinta nuo 0 iki –30 °C ir buvo palaikomas 7 MPa slėgis (sunkesnioji frakcija, SF), o antrajame – palaikoma kambario temperatūra ir atmosferinis slėgis (lengvesnioji frakcija, LF). Ekstrakcija atlikta naudojant gryną anglies dioksidą ar papildomai įterpiančią 5 % etanolio. Spanguolių išspaudų lipofilinių frakcijų riebalų rūgščių ir lakiųjų junginių sudėtis nustatyta dujų chromatografijos (DC) metodu atitinkamai su liepsnos jonizacijos ir masių spektrometrijos detektoriais. Tokoferoliai, fitosteroliai, triacilgliceroliai identifikuoti taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją, susietą su kvadropoliniu ir skriejimo laiko masių analizatoriais (UESC-K-SL-MA). β-karoteno kiekis nustatytas taikant efektyviąją skysčių chromatografiją (ESC) su ultravioletinio ir regimojo spektro detektoriumi, o bendras karotenoidų kiekis nustatytas spektrofotometriškai pagal β-karoteno kalibracinę kreivę.

1 pav. Spanguolių išpaudų biorafinavimo schema. SKE-CO₂ – superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu; ETPS – ekstrakcija tirpikliais; padidinto slėgio aplinkoje; RR – riebalų rūgštys; TAG – triacilgliceroliai; a_w – vandens aktyvumas; MetMb – metmioglobinas

Atlikus SKE-CO₂ ir taip pašalinus riebalus liekana toliau ekstrahuota pakopinės ekstrakcijos būdu padidinto slėgio aplinkoje (ETPS), pirmiausia etanolio, o tada vandeniui. Etanolis buvo pašalintas rotaciniu garintuvu, o vanduo – taikant liofilizacijos metodą. Ekstrakcijos trukmė ir temperatūra optimizuoti taikant CKP kartu su PAM, siekiant gauti didžiausią etanolinio ekstrakto išėigą. ETPS ekstrakcija su vandeniu atlikta naudojant anksčiau optimizuotus parametrus. Visos ETPS ekstrakcijos atliktos trimis ciklais: tris kartus buvo tiekiamas šviežias tirpiklis. Kokybinė ir kiekybinė antocianinų ir fenolinių junginių analizė atlikta taikant UESC-K-SL-MA. Citotoksiškumo tyrimai *in vitro* atlikti naudojant plaučių (A549) ląsteles ir taikant MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-)-2,5-difeniltetrazolio bromido) metodą, o *in vivo* tyrimai atlikti naudojant zebrines danijas (*Danio rerio*). Ektrakto *in vitro* antivirusinis poveikis Zikos viruso infekcijai bei slopinamasis jo poveikis skirtingais Zikos viruso gyvavimo ciklo etapais nustatytas tėkmės citometrijos metodu. Virusų augimas ir jo baltymų gamyba tirta taikant plokštelių sudarymo bei imunofluorescencijos metodus.

Visų gautų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas (AA) įvertintas įvairiais *in vitro* tyrimų metodais. Ekstraktai įvertinti ABTS^{•+} katijono radikalo blukinimo metodu, deguonies radikalų surišimo geba nustatyta DRAG metodu (lipofiliniams ekstraktams L-DRAG), bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) nustatytas Folin-Ciocalteu metodu. Susmulkintų išspaudų bei liekanų po atliktų ekstrakcijų antioksidacinis aktyvumas nustatytas pritaikius QUENCHER procedūrą. Šis metodas rodo taikytų ekstrakcijų efektyvumą iš sausosios medžiagos išgaunant bioaktyviuosius junginius.

Norint įvertinti ekstraktų, gautų taikant ETPS ekstrakciją, įtaką mėšos produktų saugai ir kokybei, pirmiausia buvo nustatytas jų antimikrobinis poveikis kelioms pasirinktoms patogeninėms ir mėšos gedimą sukeliančioms bakterijoms (*Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella viridescens*, *Pseudomonas putida*, *Brochothrix thermosphacta*). Etanolinio ekstrakto įtaka nepageidaujamų bakterijų augimui buvo įvertinta kiaulienos mėšosiniuose ir virtuose kumpiuose. Pastaruosiuose gaminiuose nustatyti fizikocheminių (pH, vandens aktyvumo, spalvos, metmioglobino kiekio) savybių pokyčiai laikymo metu. Mėšosiniuose papildomai įvertintas antioksidacinis aktyvumas naudojant tiobarbitūrinės rūgšties reaktyviasias medžiagas (TBARS). Statistinis rezultatų patikimumas įvertintas naudojant „Statgraphics 18-X64“ programą, Fišerio LSD testu ($p < 0,05$).

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Spanguolių išspaudų SKE-CO₂ optimizavimas taikant paviršiaus atsako metodologiją su centriniu centriškai kompoziciniu planu

Norint gauti didžiausią spanguolių išspaudų ekstrakto išėigą, taikant paviršiaus atsako metodologiją (PAM) su centriniu centriškai kompoziciniu planu

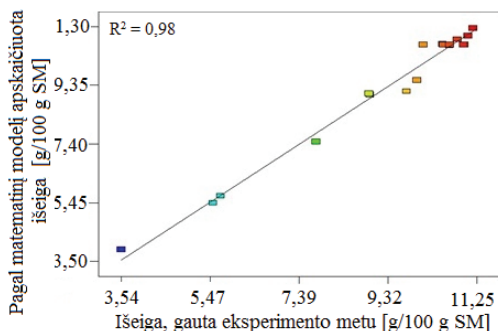
(CKCP) optimizuoti trys svarbiausi superkritinės ekstrakcijos nepriklausomieji kintamieji: slėgis (P), temperatūra (T) ir ekstrakcijos trukmė (τ). Eksperimento metu gautos išeigos kito plačiame intervale nuo 3,54 iki 11,16 % (**1 lentelė**).

1 lentelė. CKCP parametrų vertės ir spanguolių išspaudų SKE-CO₂ rezultatai: 1–14 eksperimentiniai bandymai, 15–20 bandymai plano centre

Eil. nr.	Ekstrakcijos slėgis, MPa	Ekstrakcijos trukmė, min	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Išeiga (g/100 g SM)	
				Eksperimentinė	Pagal matematinį modelį
1	25	60	50	5,53±0,08 ^b	5,61
2	55	60	50	8,93±0,28 ^d	9,68
3	25	180	50	10,65±0,12 ^{fg}	10,67
4	55	180	50	10,98±0,13 ^{gh}	10,89
5	25	60	80	3,54±0,08 ^a	3,78
6	55	60	80	10,82±0,25 ^{figh}	11,48
7	25	180	80	5,69±0,31 ^b	5,10
8	55	180	80	8,91±0,08 ^d	8,96
9	25	120	65	7,76±0,11 ^c	7,31
10	55	120	65	11,05±0,10 ^h	11,28
11	40	60	65	9,95±0,11 ^e	9,71
12	40	180	65	11,16±0,17 ^h	10,98
13	40	120	50	10,50±0,14 ^f	10,74
14	40	120	80	9,72±0,31 ^e	8,86
15	40	120	65	10,65±0,07 ^{fg}	10,59
16	40	120	65	10,95±0,16 ^{gh}	10,59
17	40	120	65	10,08±0,23 ^e	10,59
18	40	120	65	10,61±0,06 ^{fg}	10,59
19	40	120	65	10,52±0,07 ^f	10,59
20	40	120	65	10,66±0,03 ^f	10,59

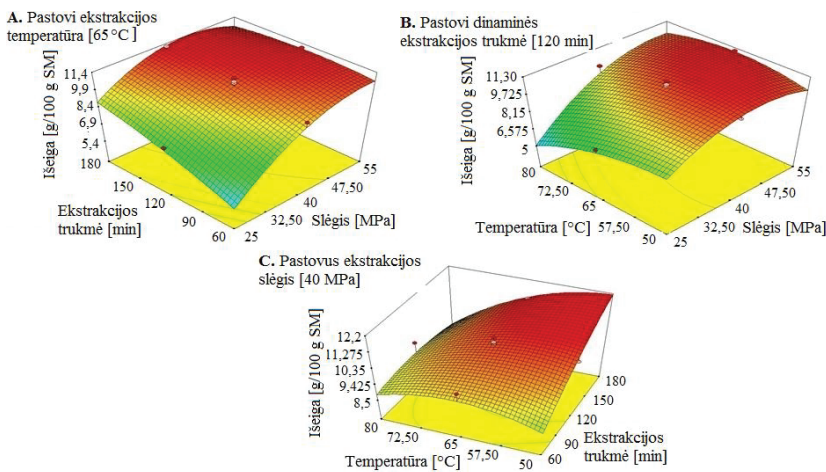
^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp gautų ekstrakcijų išeigų (ANOVA, $p < 0,05$); pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės $\pm$ SN.

Visų kintamųjų įtaka atsakui (išeigai) buvo įvertinta taikant dispersinę analizę (ANOVA). Studento kriterijus ($p < 0,05$) parodė, kad modelis yra adekvatus, o determinacijos koeficientas – 0,98. Išeigos, gautos atlikus eksperimentą ir apskaičiuotas pritaikius matematinį modelį, pateiktos **2 pav.** Matematinis modelis, sudarytas pagal gautus eksperimentinius duomenis, gali būti taikomas siekiant įvertinti sudaryto eksperimento plano erdvę. Visi parametrai, turintys reikšmingos įtakos ekstrakto išeigai, surašyti mažėjimo tvarka: slėgis > temperatūra > ekstrakcijos trukmė.



2 pav. Ekstrakto išeigos, gautos eksperimento metu ir apskaičiuotos taikant sudarytą matematinį modelį

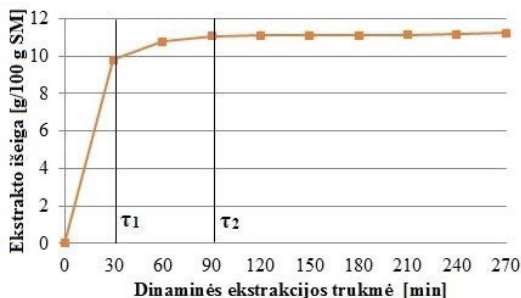
Kintamieji parametrai buvo optimizuoti trimis lygiais, gautos atsako paviršiaus kreivės pateiktos **3 pav.** Šios kreivės rodo, kokią įtaką atskiri kintamieji ar jų sąveika turi tiriamajam atsakui (išeigai). Trimačiai grafikai gauti, kai vienas iš kintamųjų buvo fiksuojamas eksperimento plano centre, o kiti du keičiami eksperimento plano erdvėje taip numatant galimą išeigą.



3 pav. Spanguolių išspaudų SKE-CO₂ atsako paviršiaus kreivės, parodančios ekstrakto išeigos priklausomybę nuo optimizuojamų parametru: A – nuo ekstrakcijos trukmės ir slėgio; B – nuo temperatūros ir slėgio; C – nuo ekstrakcijos trukmės ir temperatūros

Rezultatai parodė, kad svarbiausias parametras išeigai yra slėgis. Jo pokytis nuo 25 iki 40 MPa lėmė ekstrakto išeigos padidėjimą iki 11,16 %. O temperatūra bei ekstrakcijos trukmė buvo mažiau reikšmingi parametrai. **3 pav.** (A ir B) galima matyti stiprų nepriklausomųjų kintamųjų (P ir T) poveikį ekstrakto išeigai. Gerai

žinoma, kad CO₂ tirpinimo galimybės stipriai priklauso nuo jo tankio ir difuziškumo, todėl didėjant slėgiui didėja tirpiklio tankis ir kartu didėja jo difuzija į tiriamosios medžiagos matricą. **3 pav. (C)** galima matyti temperatūros ir ekstrakcijos trukmės sąveiką; lipofilinio ekstrakto išeigos pokyčiai buvo gana nedideli (nuo 9,72 iki 11,16 %), o tai parodo silpnesnę ekstrakcijos trukmės ir temperatūros poveikį pasirinktame šių kintamųjų intervale. Šis eksperimentas parodė, jog pritaikius PAM kartu su CKCP galima efektyviai padidinti lipofiliškos frakcijos išeigą iš spanguolių išspaudų naudojant gryną CO₂. Nustatytos optimalios sąlygos (42,4 MPa, 53 °C ir 158 min), kuriomis galima gauti didžiausią ekstrakto išeigą – 11,10±0,15 %. Eksperimento pabaigoje buvo gauta ekstrakcijos kinetinė kreivė, kuri suteikia daug naudingos informacijos apie vykstančius termodinaminius procesus, priklausomus nuo ekstrakcijos trukmės esant teoriškai nustatytoms optimalioms sąlygoms (**4 pav.**). Iš gautų rezultatų matyti, kad praktiniams tikslams superkritinės ekstrakcijos laikas galėtų būti gerokai sutrumpintas (iki 60 min), palyginti su PAM sukurtu modeliu ir teoriškai pasiūlytu optimaliu laiku.



4 pav. Ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo dinaminės ekstrakcijos trukmės optimaliomis sąlygomis (42,4 MPa, 53 °C). Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN

Atsižvelgiant į tai, jog taikant SKE optimaliomis sąlygomis (42,4 MPa, 53 °C ir 158 min) visiškai išekstrahuojamos lipofilinės medžiagos (gaunama išeiga labai panaši į tą, kuri buvo gauta taikant tradicinę ekstrakciją su heksanu (11,00±0,59 %)), nenaudojant toksiškų organinių tirpiklių ir esant žemai temperatūrai, tai gali būti laikoma perspektyvia nepolinės frakcijos išskyrimo iš uogų išspaudų technologija.

3.2. Spanguolių išspaudų lipofilinių junginių frakcionavimas taikant SKE-CO₂

3.2.1. Lipofilinių ekstraktų bei frakcijų išeigos ir jų antioksidacinis aktyvumas

Superkritinė ekstrakcija taikoma įvairiems kokybiškiems aliejams išgauti, šiuo būdu taip pat gali būti frakcionuojami junginiai ar junginių grupės. Atlikta

SKE-CO₂ su dviem separatoriais. Pirmajame jų buvo palaikomas 7 MPa slėgis, o temperatūra keičiama nuo 0 iki –30 °C. Antrajame separatoriuje buvo palaikomas atmosferinis slėgis ir kambario temperatūra. Ekstrakcija atlikta naudojant gryną superkritinį anglies dioksidą (SK-CO₂) arba įterpiant į SK-CO₂ 5 % etanolio. Taip įvertinta temperatūros ir polinio tirpiklio įtaka lipofilinių ekstraktų išeigai ir funkcionaliųjų komponentų sudėčiai.

Atlikus Soksleto ekstrakciją, išeiga siekė 11 %, su grynų SK-CO₂ – 8,71 %, o įterpus 5 % etanolio (EtOH) padidėjo iki 10,88 % (**2 lentelė**). Taikant SKE su grynų CO₂, 61–74 % bendro ekstrakto kiekio buvo surinkta pirmajame separatoriuje (sunkiojoje frakcijoje, SF), o 26–39 % – antrajame separatoriuje (lengvojoje frakcijoje, LF). Reikšmingų skirtumų buvo nustatyta tik esant –30 °C (abiejose frakcijose) ir 0 °C temperatūrai sunkiojoje frakcijoje. Atliekant SKE su SK-CO₂ + 5 % EtOH, separatoriaus šaldymo temperatūra turėjo didesnę įtaką išeigai. Išeiga, nustatyta LF-oje esant 0 °C ir –10 °C temperatūrai, buvo 67–68 % didesnė nei ta, kuri gauta naudojant gryną SK-CO₂, nors esant –20 °C ir –30 °C temperatūrai išeiga buvo didesnė atitinkamai 2,9 ir 3,5 karto. Sunkiosios frakcijos išeigos abiem atvejais (SKE-CO₂ ir SKE-CO₂ + 5 % EtOH) buvo labai panašios, nors esant –20 °C ir –30 °C temperatūrai etanolio pridėjimas ją sumažino 2,2 karto.

Frakcijų antioksidacinis aktyvumas (AA) įvertintas L-DRAG metodu (**2 lentelė**). Pirmiausia reikėtų pažymėti, kad taikant SKE-CO₂ gautų ekstraktų AA buvo kur kas didesnis nei ekstrakto, gauto Soksleto metodu. Be to, pridėjus modifikatorių L-DRAG vertės padidėjo 70 %, palyginti su vertėmis, gautomis naudojant gryną SK-CO₂. Taip yra todėl, kad polinis tirpiklis gali išekstrahuoti polinius antioksidantus, pvz., polifenolinius junginius. Nustatyta, kad LF-os pasižymėjo kelis kartus stipresniu AA nei SF-os tiek naudojant gryną SK-CO₂, tiek papildomai įterpiant 5 % etanolio, nors abu ekstrakcijos metodus lyginant tarpusavyje galima matyti, jog frakcijų, išskirtų papildomai įterpiant etanolio, AA buvo gerokai didesnis nei tų, kurios išskirtos naudojant vien gryną SK-CO₂.

2 lentelė. Spanguolių išspaudų ekstraktų frakcijų išeigos, gautos taikant SKE-CO₂, ir jų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas L-Drag metodu

Frakcija	EtOH, %	Separatoriaus temperatūra, °C	Išeiga, %	DRAG, mg TE/g	DRAG, mg TE/g SM
Sokseto ekstrakcija heksanu					
			11,00±0,59 ⁱ	11,84±0,71 ^{bc}	1,30±0,08 ^c
SKE-CO₂					
Bendra	0	—	8,71±0,01 ^h	19,96±1,04 ^d	1,74±0,09 ^d
Bendra	5	—	10,88±0,02 ⁱ	33,84±1,65 ^{ef}	3,68±0,18 ^h
LF	0	0	2,90±0,46 ^a	37,68±1,66 ^{fg}	1,09±0,05 ^{bc}
		-10	2,78±0,11 ^{bc}	33,17±1,54 ^e	0,92±0,04 ^b
		-20	2,79±0,02 ^{bc}	31,33±1,19 ^c	0,87±0,03 ^b
		-30	2,23±0,01 ^{ab}	39,21±0,94 ^g	0,87±0,02 ^b
LF	5	0	4,83±0,02 ^d	79,69±3,74 ⁱ	3,85±0,18 ^h
		-10	4,67±0,13 ^d	51,84±4,14 ^h	2,42±0,19 ^c
		-20	8,18±0,03 ^{gh}	42,16±2,71 ^c	3,45±0,22 ^f
		-30	7,91±0,02 ^g	40,15±2,49 ^g	3,18±0,20 ^g
SF	0	0	6,86±0,46 ^f	5,68±0,37 ^a	0,39±0,03 ^a
		-10	5,94±0,11 ^c	6,02±0,61 ^a	0,36±0,04 ^a
		-20	5,93±0,02 ^c	5,94±0,32 ^a	0,35±0,02 ^a
		-30	6,48±0,01 ^{ef}	8,34±0,64 ^{ab}	0,54±0,04 ^a
SF	5	0	6,05±0,02 ^e	8,40±0,68 ^{ab}	0,51±0,04 ^a
		-10	6,21±0,13 ^e	14,51±0,90 ^c	0,90±0,06 ^b
		-20	2,69±0,03 ^{bc}	14,22±0,60 ^c	0,38±0,02 ^a
		-30	2,96±0,02 ^c	13,36±0,59 ^c	0,40±0,02 ^a

SF – sunkesnioji frakcija; LF – lengvesnioji frakcija; ^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus (ANOVA, $p < 0,05$). Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN.

3.2.2. Triacilglicerolių (TAG) ir riebalų rūgščių sudėtis

Uogų sėklų, kurios įeina į išspaudų sudėtį, aliejinė frakcija yra sudaryta daugiausia iš triacilglicerolių (TAG). Tiek ekstraktuose, tiek frakcijose didžiausią dalį visų TAG sudarė nesotieji TAG: LLLn – 22,14–23,46 %, OLnL – 21,26–22,23 %, LLnLn – 13,00–14,93 %, OLL – 13,69–15,59 %. Nustatyta, kad nesočiųjų LLLn ir LnLnLn kiekis lengvosiose frakcijose buvo didesnis nei sunkiosiose tiek naudojant gryną SK-CO₂, tiek papildomai įterpiant etanolio.

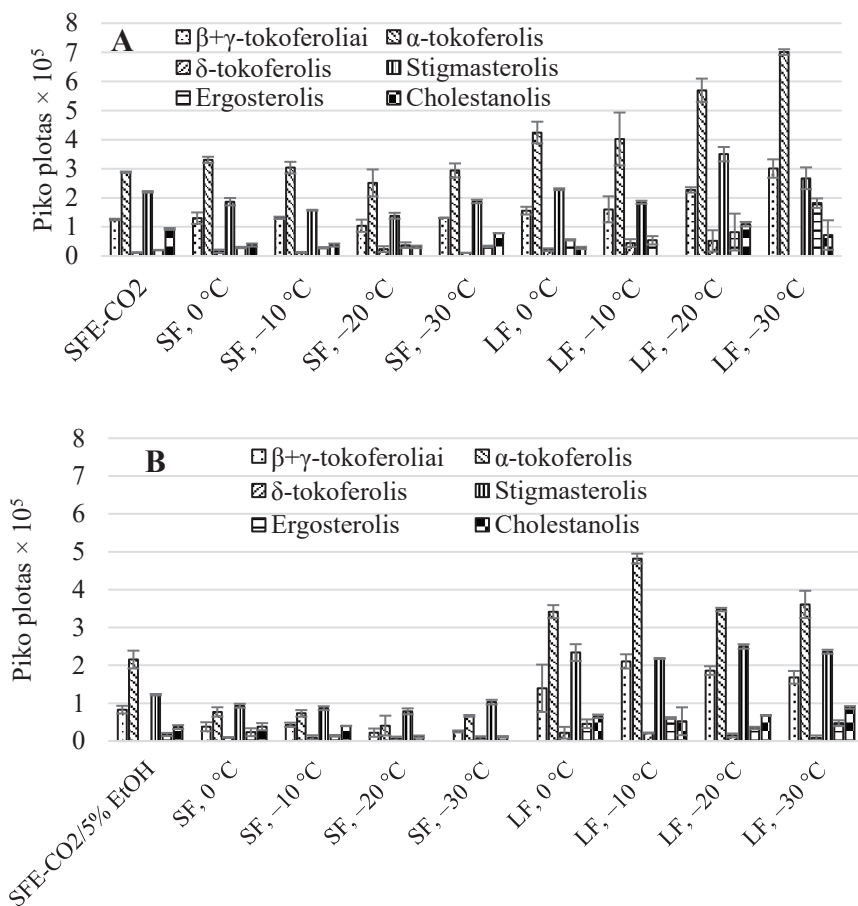
Spanguolių ekstrakto bei frakcijose daugiausia rasta oleino (13,44–23,12 %), linolo (25–36,70 %) ir linoleno (20,62–33,17 %) riebalų rūgščių. Nustatyta, kad naudojant gryną SK-CO₂ palmitino rūgšties kiekis LF-ose buvo 1,5 karto didesnis. Reikšmingas ($p < 0,05$), nors ir nežymiai mažesnis linolo rūgšties kiekis nustatytas LF-ose, o antrosios pagal kiekį riebalų rūgšties (linoleno) daugiau rasta LF-ose. SKE-CO₂ metu įterpus etanolio nustatyta, kad visose LF-ose palmitino, linolo, linoleno riebalų rūgščių kiekiai buvo reikšmingai ($p < 0,05$) didesni. Nustatyta, kad etanolio įterpimas gerokai padidino skvaleno kiekį ekstraktuose bei frakcijose; jo kiekis SF-ose buvo iki 16 kartų didesnis nei LF-ose.

3.2.3. Bendras karotenoidų ir β -karoteno kiekis ekstraktuose bei frakcijose

Karotenoidai yra ne tik svarbūs augalų pigmentai, bet ir vertingi bioaktyvieji junginiai, tačiau juos išskirti taikant SKE vis dar sudėtinga. Nustatyta, kad mažiau nei pusė karotenoidų, palyginti su heksaniniu ekstraktu, buvo išskirta naudojant gryną SK-CO₂ (45,39 % β -karoteno ir 39,97 % bendro karotenoidų kiekio (BKK)), tačiau etanolio įterpimas gerokai padidino karotenoidų ekstrakcijos efektyvumą iki 65,56 % (β -karoteno) ir 66,25 % (BKK) netaikant frakcionavimo. Naudojant gryną SK-CO₂ SF-ose nustatytas didesnis β -karoteno ir bendras karotenoidų kiekis nei LF-ose. Be to, SF-ose esant 0 (7,48 mg/100 g), –20 (7,07 mg/100 g) ir –30 °C (7,01 mg/100 g) temperatūrai nustatyta didesnė β -karoteno koncentracija nei heksaniniame ekstrakte (6,07 mg/100 g). Į sistemą įterpus etanolio, β -karoteno koncentracija buvo labai panaši abiejose frakcijose, išskyrus esant –10 °C temperatūrai, kai LF-oje šių junginių buvo 3 kartus mažiau. Paaiškinti, kas lėmė tokius rezultatus, yra gana sudėtinga, tačiau įtakos tam galėjo turėti junginių termodinaminis tirpumas, molekulinės sąveikos tarp jų, fazių pusiausvyra ir net sudėties pokyčiai, vykstantys atliekant analizę.

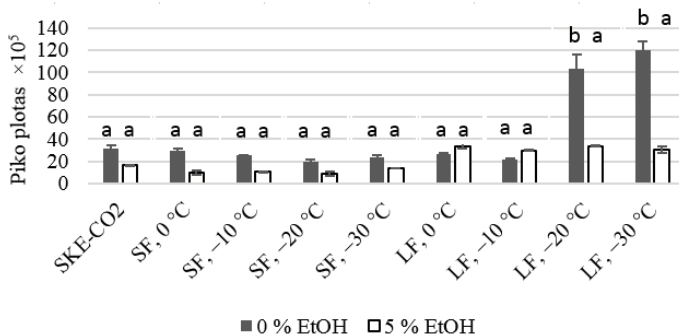
3.2.4. Tokoferolių ir fitosterolių sudėtis

Tokoferoliai yra vertingi lipofiliniai antioksidantai, pasižymintys didele nauda sveikatai. Fitosteroliai pasižymi antioksidaciniu, uždegimo slopinamuoju, antimikrobinu, antivėžiniu poveikiu, mažina cholesterolį. Todėl natūralūs produktai, turintys didelį kiekį šių bioaktyviųjų sudedamųjų dalių, yra svarbūs kuriant funkcionalųjį maistą. Keturi tokoferoliai (kartais vadinami E vitamerais) ir 4 fitosteroliai buvo preliminariai įvertinti pagal smailių plotus ekstraktuose ir frakcijose (**5 pav.**). Spanguolių išspaudų aliejuje daugiausia nustatyta α -tokoferolio, kiek mažiau – β + γ -vitamerų, kurie nebuvo chromatografiškai atskirti, ir mažiausiai – δ -tokoferolio. Atsižvelgiant į chromatografinius smailių plotus, β -sitosterolio kiekis (**6 pav.**) buvo daug kartų didesnis nei kitų aptiktų fitosterolių: stigmasterolio, ergosterolio ir cholestanolio.



5 pav. Tokoferolių ir fitosterolių kiekio pokyčiai frakcionuojant spanguolių išspaudas grynu SK-CO₂ (A) ir SK-CO₂ / 5 % EtOH (B). SF – sunkesnioji frakcija; LF – lengvesnioji frakcija. Pateiktos vidutinės dviejų matavimų vertės $\pm$ SN

Nustatyta, kad naudojant gryną SK-CO₂ didesnė tokoferolių koncentracija buvo LF-ose, tačiau kiek daugiau fitosterolių rasta SF-ose. Į SK-CO₂ įterpus 5 % etanolio, šių junginių pasiskirstymas separatoriuose buvo skirtingas: LF-ose nustatytas gerokai didesnis tokoferolių ir fitosterolių kiekis. Pavyzdžiui, α -tokoferolio koncentracija LF-oje buvo 7 kartus didesnė nei SF-oje esant –10 °C temperatūrai, o β -sitosterolio kiekis, priklausomai nuo separatoriaus temperatūros, buvo 2,2–3,8 karto didesnis.



6 pav. β -sistosterolio kiekio pokyčiai frakcionuojant spanguolių išspaudas taikant SKE-CO₂ su tirpikliu arba be jo (5 % EtOH). SF – sunkesnioji frakcija; LF – lengvesnioji frakcija. ^{a, b} raidės tarp tos pačios spalvos stulpelių nurodo reikšmingus skirtumus (ANOVA, $p < 0,05$). Pateiktos vidutinės dviejų matavimų vertės $\pm$ SN

3.2.5. Lakiųjų junginių sudėtis

Spanguolių išspaudų ekstraktai, ypač LF-os, turėjo stiprų ir malonų spanguolėms būdingą aromatą. Todėl buvo naudinga įvertinti lakiųjų aromato junginių pasiskirstymą separatoriuose. Taikant SKE-CO₂ spanguolių išspaudų ekstraktuose ir frakcijose identifikuoti 34 lakieji junginiai ir nustatytas jų pasiskirstymas. Sumažinus pirmojo separatoriaus temperatūrą, iš esmės keitėsi lakiųjų medžiagų kokybinė ir ypač kiekybinė sudėtis. Tik nedidelė dalis aromato junginių buvo nustatyta SF-ose, o LF-ose rasta įvairių būdingųjų aromato junginių esant didesnėms smailėms, kurios parodo, kad šių junginių koncentracija LF-ose yra didesnė. Aromato junginių profilis visose LF-ose buvo gana panašus esant nedideliams kiekybiniais skirtumams, taikant skirtingas separatoriaus šaldymo temperatūras. Didžiausios buvo 2,3-butandiolio, benzaldehido, benzilo alkoholio, benzoinės rūgšties, 2,4-dekadienolio, valinino, humuleno, kalameneno ir oktadeceno smailės.

3.3. Spanguolių išspaudų, iš kurių pašalinti riebalai, ekstrakcijos optimizavimas taikant ekstrakciją tirpikliais papildinto slėgio aplinkoje

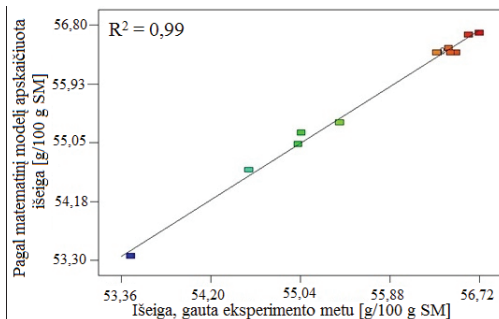
Uogų išspaudos yra nevienalytė žaliava: sėklose gausu lipidų, o odelėse, minkštyme yra daugiau polinių (hidrofilinių) komponentų. Siekiant iš SKE liekanų išgauti didesnio poliškumo junginius, pasitelkta pakopinė ekstrakcija tirpikliais papildinto slėgio aplinkoje (ETPS): pirmiausia ekstrahuota etanolium, vėliau liekana paveikta vandeniu. Norint gauti didžiausią spanguolių išspaudų etanolinio ekstrakto išėigą, temperatūra ir ekstrakcijos trukmė optimizuotos taikant PAM su CKCP. Buvo atlikta 13 eksperimentinių bandymų, išėiga svyravo nuo 53,45 iki 56,72 g/100 g SM (**3 lentelė**).

3 lentelė. Spanguolių išspaudų (pašalinus riebalus) optimizavimo taikant ETPS-EtOH ir vykdant tris ekstrahavimo ciklus iš eilės eksperimento planas ir gautos išeigos

Eil. nr.	Ekstrakcijos trukmė, min	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Išeiga, g/100 g SM	
			Ekspirimentinė	Pagal matematinį modelį
1	5	50	53,45±0,46 ^{a, A}	53,58
2	15	50	55,02±0,60 ^{a, B}	54,79
3	5	90	55,41±0,32 ^{b, A}	55,69
4	15	90	56,62±0,63 ^{b, B}	57,44
5	5	70	55,05±0,01 ^{b, A}	55,65
6	15	70	56,72±0,01 ^{b, C}	57,14
7	10	50	54,56±0,02 ^{a, AB}	54,34
8	10	90	56,43±0,60 ^{b, B}	56,74
9	10	70	56,45±0,06 ^{b, B}	56,58
10	10	70	56,50±0,04 ^{b, B}	56,58
11	10	70	56,33±0,05 ^{b, B}	56,58
12	10	70	56,32±0,13 ^{b, B}	56,58
13	10	70	56,45±0,40 ^{b, B}	56,58

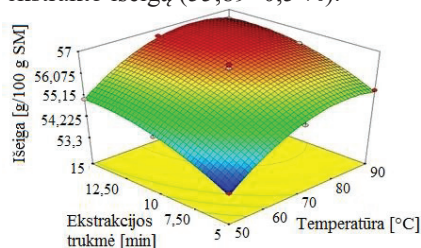
Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN; ^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstrakcijų trukmės (ANOVA, $p < 0,05$); ^{A, B} raidės tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstrakcijų temperatūrų, $p < 0,05$.

Dispersinė analizė parodė, kad sudarytas modelis reikšmingas, o determinacijos koeficientas siekė 0,99. Abu nepriklausomieji kintamieji parametrai (ekstrakcijos trukmė ir temperatūra) buvo reikšmingi tirtame modelyje, o jų sąveika neturėjo įtakos ekstrakcijos išeigai. Prognozuojamos išeigos, kurios buvo apskaičiuotos naudojant antrosios eilės polinomines lygtis, gerai atitiko eksperimento rezultatus (**7 pav.**), o tai rodo, kad šis matematinis modelis gali būti naudojamas sudaryto eksperimento plano erdvei įvertinti.



7 pav. Ekstrakto išėigos, gautos eksperimento metu ir apskaičiuotos taikant sudarytą matematinį modelį

Trimatis grafikas (3D) leidžia aiškiai pamatyti, kaip kinta tiriamasis atsakas keičiant nepriklausomuosius kintamuosius: ekstrakcijos trukmę ir temperatūrą, esant pastoviam (10,3 MPa) slėgiui (**8 pav.**). Atliekant optimizavimą nustatytos optimalios sąlygos (83 °C temperatūra, 3 ciklai po 15 min), užtikrinančios didžiausią etanolinio ekstrakto išėigą ($55,89 \pm 0,5$ %).

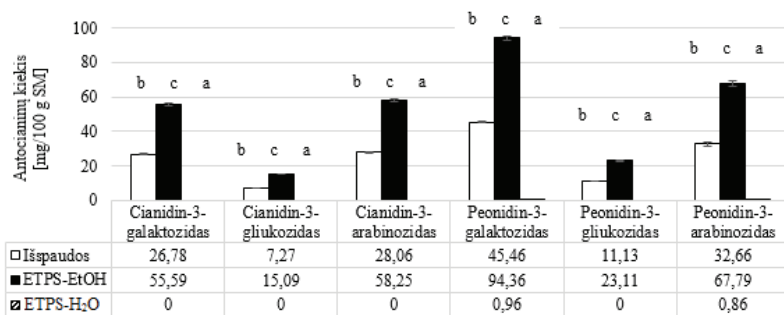


8 pav. Spanguolių išspaudų ETPS ekstrakcijos su etanoliumi vykdant tris ekstrahavimo ciklus iš eilės atsako paviršiaus kreivė

Liekana po spanguolių išspaudų SKE-CO₂ bei ETPS-EtOH ekstrakcijų toliau buvo ekstrahuojama vandeniu (130 °C temperatūra, 3 ciklai po 10 min), gauta išėiga siekė $6,50 \pm 0,07$ %. Kadangi ETPS su etanoliumi buvo labai efektyvi, nuspręsta netaikyti PAM ekstrakcijai vandeniu. Galutinė liekana sudarė apie 25 % pradinio spanguolių išspaudų svorio ir gali būti laikoma puikiu skaidulinių medžiagų šaltiniu.

3.3.1. Kiekybinis antocianinų etanoliniame ir vandeniniame ekstraktuose įvertinimas

Antocianinai – natūralūs uogų pigmentai, suteikiantys joms raudoną spalvą. Taikant UESC-K-SL-MA spanguolių išspaudose, etanoliniame ir vandeniniame ekstraktuose identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti 6 antocianinų glikozidai (**9 pav.**), cianidino ir peonidino galaktozidai, arabinozidai ir gliukozidai.



9 pav. Antocianinų kiekis spanguolių išspaudose, etanoliniame bei vandeniniame ekstraktuose, nustatytas taikant UESC-K-SL-MA. ^{a, b} raidės nurodo reikšmingus skirtumus tarp koncentracijų (ANOVA, $p < 0,05$)

Antocianinų identifikavimas pagrįstas jų masės spektrais ir eliuavimo iš chromatografinės kolonėlės tvarka. Peonidin-3-galaktozidas ir peonidin-3-arabinozidas – pagrindiniai kiekybiškai įvertinti antocianinai, identifikuoti visuose mėginiuose. Atsižvelgiant į mažą šių junginių kiekį vandeniniame ekstrakte, galima manyti, jog ekstrakcija etanolio buvo pakankamai efektyvi ir iš spanguolių išspaudų leido išgauti didelį kiekį antocianinų.

3.3.2. Spanguolių išspaudų, iš kurių pašalinti riebalai, ekstraktų fitocheminė sudėtis

Flavonoidai ir organinės rūgštys nustatytos taikant efektyviąją skysčių chromatografiją su MS detektoriumi ir lyginant gautų junginių molekulinės masės, jų formules bei sulaikymo laikus su standartinių junginių spektriniais duomenimis. Junginiams, kurių nepavyko identifikuoti pagal turimus standartus, papildomai atliktas MS/MS fragmentavimas. Šie junginiai identifikuoti preliminariai lyginant gautus MS/MS fragmentus su duomenų bazėse bei literatūroje pateiktais duomenimis. Iš viso ekstraktuose aptikta 15 junginių (**4 lentelė**).

Organinės rūgštys **1**, **2**, **3** ir **8** nustatytos abiejuose ekstraktuose. Junginio **1** molekulinis jonas $[M-H]^-$ m/z 133,0144 atitiko $C_4H_5O_5$ molekulinę formulę. Šis junginys buvo identifikuotas kaip obuolių rūgštis. Citrinų (**2**) bei chino (**3**) rūgštys identifikuotos remiantis jų molekuliniais jonais $[M-H]^-$ m/z 191,0564 ir 191,0199 bei literatūroje pateiktais duomenimis. Chlorogeno rūgštis (**8**) identifikuota pagal standartą ir MS/MS fragmentus. Atliekant kiekybinę junginių analizę nustatyta, kad katechino ir chlorogeno rūgšties ETPS-EtOH ekstrakte buvo atitinkamai 60,3 ir 88,6 mg/100 g SM, tačiau šių junginių neaptikta ETPS-H₂O ekstrakte. O chino rūgštis buvo pagrindinis junginys tirtuose ekstraktuose ir sudarė 869,4 mg/100 g (ETPS-H₂O) ir 572,9 mg/100 g (ETPS-EtOH). Šiuos skirtumus galėjo lemti chino rūgšties tirpumas skirtingo poliškumo tirpikliuose.

4 lentelė. Spanguolių išspaudų etanoliniame ir vandeniniame ekstraktuose esančių fenolinių junginių charakteristikos, gautos UESC-K-SL-MA metodu

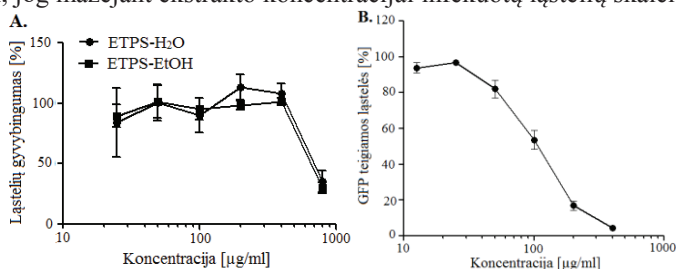
Junginio nr.	Sulaikymo trukmė (min)	Pirmtako [M-H] ⁺	Jonas	Jono formulė	MS fragmentai	Junginys	ETPS-EtOH ekstraktas		ETPS-H ₂ O ekstraktas
							mg/100 g SM ^a		
1	0,6	133,0144 ^a		C ₄ H ₅ O ₅	-	Obuolių rūgštis	+		+
2	0,7	191,0562 ^a		C ₇ H ₁₁ O ₆	-	Chino rūgštis	572,9		869,4
3	0,9	191,0197 ^a		C ₆ H ₇ O ₇	-	Citrinų rūgštis	+		+
4	1,9	161,0455		C ₆ H ₉ O ₅	143,0217 115,0247	Nežinomas junginys	+		+
5	2,0	219,0512		C ₈ H ₄ O ₇	157,1020 109,1032	Nežinomas junginys	+		+
6	2,05	577,1371 ^a		C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	407,0768 289,0709 245,0815	Procianidinas B3	+		+
7	2,1	417,0839		C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	-	Nežinomas junginys	+		nd
8	2,2	353,0875 ^a		C ₁₆ H ₁₇ O ₉	191,0559 179,0342 135,0446	Chlorogeno rūgštis	88,6		nd
9	2,28	289,0706 ^a		C ₁₃ H ₁₃ O ₆	221,0819 151,0405 123,0453	Katechinas	60,3		nd
10	2,32	479,0833 ^{b,c}		C ₂₀ H ₂₉ O ₁₃	316,0219	Miricetino galaktozidas	+		nd
11	2,90	433,0785 ^{b,c}		C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	301,0350	Kvercetino pentozidas	+		nd
12	2,75	359,1352		C ₁₆ H ₁₇ O ₉	313,0154 197,0822	Nežinomas junginys	+		+
13	2,9	463,0886 ^{b,c}		C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	301,0350	Kvercetino heksozidas	+		+
14	3,15	447,0946		C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-	Nežinomas junginys	+		nd
15	3,21	431,2290 ^{b,c}		C ₂₁ H ₃₅ O ₉	165,0924	Kumaroilheksozidas	+		nd

^a – identifiukuota naudojant standartą; ^b – identifiukuota naudojant literatūros duomenis; ^c – identifiukuota remiantis duomenimis, esančiais duomenų bazėje („ChemSpider“); nd – neaptikta.

Junginiai **11** ir **13** preliminariai įvertinti kaip kvercicino pentozidas ir kvercicino heksozidas, jų molekuliniai jonai $[M-H]^-$ m/z buvo 433,0406 (atitiko $C_{20}H_{17}O_{11}$ molekulinę formulę) ir 463,0886 (atitiko $C_{21}H_{19}O_{12}$ molekulinę formulę). Lyginant MS/MS fragmentus matyti, kad šie abu junginiai davė panašų m/z fragmentą 301,0350 (atitinkantį $C_{15}H_5O_8$ molekulinę formulę), kuris atitinka flavonolio kvercetino aglikoną, o liekanos $[M-162]$ ir $[M-132]$ atitinka heksilo ir pentilo vienetus. Junginys **10** buvo preliminariai identifikuotas kaip miricetino galaktozidas. Atlikus MS/MS fragmentavimą gautas jonas m/z 316,0219, kuris rodo, kad iš pirmtako jono (m/z 479,0833) buvo prarastas galaktozido fragmentas. Keletas aptiktų smailių (**4**, **5**, **7**, **12**, **14**) nebuvo identifikuotos dėl informacijos trūkumo, net atlikus MS/MS fragmentaciją.

3.3.3. Antivirusinis ekstraktų poveikis Zikos viruso infekcijai

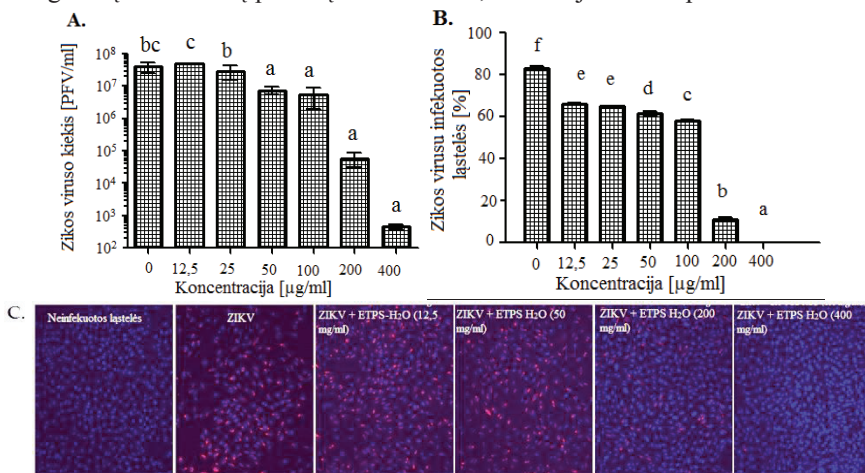
Taikant MTT metodą įvertintas etanolinio ir vandeninio ekstraktų citotoksiškumas plaučių epitelio (A549) ląstelėse (**10 pav., A**). Nustatyta, kad ląstelių gyvybingumą 50 % slopina 766,6 $\mu\text{g/ml}$ (ETPS-EtOH) ir 797,5 $\mu\text{g/ml}$ (ETPS- H_2O) koncentracija. Esant didžiausiai necitotoksiškai koncentracijai (400 $\mu\text{g/ml}$), nustatytas ekstraktų antivirusinis poveikis afrikinio Zikos viruso (ZIKV) padermės molekuliniam klonui, išreiškiančiam žalio fluorescencinio baltymo (GFP) geną (ZIKV_{GFP}). Tyrimas parodė, kad etanolinis ekstraktas neturėjo poveikio šiam Zikos virusui, o panaudojus vandeninį ekstraktą infekuotų ląstelių nustatyta mažiau nei 5 %. Todėl tolesniems tyrimams buvo naudojamas tik vandeninis ekstraktas. Šio ekstrakto skirtingų koncentracijų antivirusinis poveikis ZIKV_{GFP} nustatytas A549 ląstelėse (**10 pav., B**). Iš **10 pav. B** dalies matyti, jog mažėjant ekstrakto koncentracijai infekuotų ląstelių skaičius didėjo.



10 pav. Spanguolių išspaudų vandeninis ekstraktas pasižymi antivirusiniu poveikiu Zikos virusui. A – ląstelių (A549) gyvybingumas, nustatytas taikant MTT metodą; B – spanguolių išspaudų vandeninio ekstrakto antivirusinis poveikis ZIKV_{GFP}

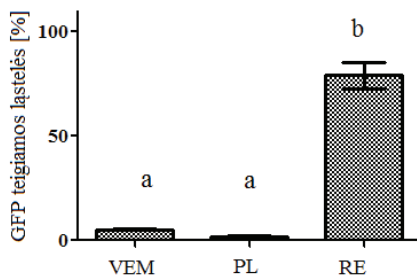
Skirtingų koncentracijų ekstrakto įtaka Azijos epidemijos padermės PF-25013-18 (PF13) augimui įvertinta plokštelių formavimo metodu. Paaiškėjo, kad ZIKV-PF13 jautrus skirtingoms ekstrakto koncentracijoms (**11 pav., A**), ypač 400 $\mu\text{g/ml}$ – tada viruso kiekis sumažėjo net 6 log PFV/ml. Zikos viruso padermės

ZIKV-MR766 proteinų gamyba įvertinta imunofluorescencijos metodu, naudojant antikūnus, kurie atpažįsta viruso baltymą E (**11 pav., B, C**). Kaip matyti iš **11 pav. B** ir **C** dalių, spanguolių išspaudų ETPS-H₂O ekstraktas slopino ZIKV infekciją A549 ląstelėse. Atsižvelgiant į gautus rezultatus, galima teigti, kad šis ekstraktas turi galimą antivirusinį poveikį tiek afrikinei, tiek Azijos ZIKV padermei.



11 pav. Spanguolių išspaudų vandeninis ekstraktas apsaugo A549 ląsteles nuo Zikos viruso (ZIKV) epideminių padermių. A – kiekybinis ZIKV-PF13 viruso augimo įvertinimas plokštelių formavimo metodu; B – kiekybinis užkrėstų A549 ląstelių įvertinimas imunofluorescencijos metodu; C – viruso baltymo raiškos imunofluorescencinė analizė ZIKV-MR766 infekuotose A549 ląstelėse. Zikos viruso baltymas pažymėtas raudonai, o ląstelių branduoliai – mėlynai. ^{a, b} raidės nurodo reikšmingus skirtumus tarp koncentracijų (ANOVA, $p < 0,05$)

Kinetikos eksperimentas leido nustatyti, kuriame viruso gyvavimo ciklo etape ETPS-H₂O ekstraktas stabdo infekciją (**12 pav.**). Ekstraktas turėjo įtakos viso viruso gyvavimo ciklo metu ir neleido jam patekti į šeimininko ląstelę, tačiau neturėjo jokios įtakos viruso replikacijai. Siekiant išsiaiškinti, kuriame tiksliai etape ekstraktas veikia: ar jis suardo viruso dalelę (veikia virucidiškai), ar padengia virusą papildomu sluoksniu ir dėl to virusas negali prisijungti prie ląstelės receptorių ir patekti į ją (virosstatinis efektas), buvo taikomi viruso inaktyvacijos ir surišimo metodai. Tyrimas parodė, kad negalima tiksliai pasakyti, ar ekstraktas pasižymi virucidiniu, ar virosstatiniu poveikiu, nes taikant inaktyvacijos ir viruso surišimo metodus infekuotų ląstelių nustatyta atitinkamai 2,8 ir 0,5 %.



12 pav. Spanguolių išspaudų ETPS-H₂O ekstrakto įtaka ankstyvosioms ZIKV infekcijos stadijoms. VEM – viruso gyvavimo ciklo metu, PL – viruso patekimas į ląstelę, RE – viruso replikacija. ^{a, b} raidės nurodo reikšmingus skirtumus (ANOVA, $p < 0,05$)

Galimas ūmus spanguolių išspaudų vandeninio ekstrakto toksiškumas įvertintas naudojant suaugusias zebrines danijas – joms atlikta injekcija parinkus 400 µg/g kūno svorio koncentraciją. Eksperimentas buvo vykdomas 5 dienas. Visos 11 žuvų, kurioms atlikta spanguolių ekstrakto injekcija, išgyveno ir viso eksperimento metu nebuvo pastebėta jokių kančios, streso ar neįprasto elgesio požymių.

3.4. Spanguolių išspaudų ekstraktų, gautų skirtingais metodais, ir ekstrakcijų liekanų antioksidacinis aktyvumas

Biorafinavimo procesas buvo įvertintas įvairiais antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodais nustatant skirtingais ekstrakcijos būdais išskirtų ekstraktų, išspaudų bei liekanų antioksidacinį potencialą (**5 lentelė**).

Lipofilinių frakcijų antioksidacinis aktyvumas (AA) buvo gana mažas. Kita vertus, ekstraktas, gautas Soksleto metodu, turėjo didesnę bendrąją fenolinių junginių kiekį (BFJK) ir didesnes vertes matuojant ABTS⁺ radikalo surišimo metodu, o DRAG metodu gautos vertės buvo gana panašios, palyginti su ekstraktu, gautu taikant SKE-CO₂. AA visose liekanose, pašalinus lipofilines medžiagas, įskaitant riebaluose tirpius antioksidantus, sumažėjo apytiksliai 6–23 %. Panaudojus didesnio poliškumo tirpiklius (etanolį bei vandenį) buvo išskirta didžioji dalis polifenolinių junginių, pasižyminčių antioksidaciniu aktyvumu. Vandeninis ekstraktas pasižymėjo kur kas didesniu AA nei etanolinis ekstraktas, įvertinus visais *in vitro* metodais, tačiau dėl didesnės išeigos ETPS-EtOH ekstrakto išskirta didžioji dalis antioksidantų, kai rezultatai buvo perskaičiuoti sausajai medžiagai. Pavyzdžiui, BFJK liekanose po ETPS-EtOH buvo 3,4 karto mažesnis nei spanguolių išspaudose ir 11 kartų mažesnis, kai buvo perskaičiuota sausajai medžiagai. Gauti rezultatai įrodo pritaikytos daugiapakopės biorafinavimo technologijos efektyvumą.

5 lentelė. Bendras fenolinių junginių kiekis ir antioksidacinis aktyvumas spanguolių išspaudų ekstraktuose ir kietosiose frakcijose

Mėginys	TPC, mg GRE/g		ABTS ⁺ , mg TE/g		ORAC, mg TE/g	
	Ekstrakte liekanoje	SM	Ekstrakte liekanoje	SM	Ekstrakte liekanoje	SM
Uogų išspaudos ir liekanos po ekstrakcijos						
Spanguolių išspaudos	19,23±1,61 ^d	20,42±1,71 ^e	84,12±4,91 ^d	89,32±5,21 ^e	40,55±0,52 ^e	43,06±0,55 ^e
Po SKE-CO ₂ (0,2 mm)	18,06±0,60 ^c	16,05±0,53 ^d	76,47±5,19 ^c	67,98±4,61 ^d	46,09±3,69 ^d	40,97±3,28 ^d
Po Soksleto ekstrakcijos	15,80±1,07 ^b	14,06±0,95 ^c	74,71±0,45 ^c	66,49±0,40 ^c	32,92±1,95 ^c	29,30±1,74 ^c
Po ETPS-EtOH	5,60±0,52 ^a	1,85±0,17 ^b	39,91±2,09 ^b	13,21±0,69 ^b	10,44±0,65 ^b	3,45±0,21 ^b
Po ETPS-EtOH-H ₂ O	4,24±0,99 ^a	1,12±0,26 ^a	11,52±0,63 ^a	3,81±0,20 ^a	4,33±0,15 ^a	1,15±0,04 ^a
Ekstraktai, išgauti naudojant skirtingus tirpiklius ir taikant skirtingus metodus						
SKE-CO ₂ (0,2 mm)	6,21±0,52 ^a	0,69±0,06 ^a	11,43±0,50 ^a	1,27±0,06 ^a	14,42±1,26 ^a	1,60±0,14 ^a
Soksleto ekstrakcija	12,06±0,61 ^b	1,33±0,07 ^b	27,77±2,26 ^b	3,05±0,25 ^b	11,85±0,71 ^a	1,30±0,08 ^a
ETPS-EtOH	52,98±0,31 ^c	26,32±0,28 ^c	130,40±3,3 ^c	60,16±1,52 ^d	345,0±16,4 ^b	159,2±7,6 ^c
ETPS-EtOH-H ₂ O	188,90±5,3 ^d	5,25±0,15 ^d	362,6±13,8 ^d	10,08±0,39 ^c	1084±78 ^c	30,14±2,17 ^b

Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN; ^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp uogų išspaudų liekanų arba ekstraktų (ANOVA, $p < 0,05$).

3.5. Spanguolių išspaudų ekstraktų, išskirtų taikant ekstrakciją tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje, poveikis patogeninėms bei gedimą sukeliančioms bakterijoms ir kiaulienos produktų kokybei

3.5.1. Spanguolių išspaudų, iš kurių pašalinti riebalai, ekstraktų antimikrobinis aktyvumas

Ekstraktų antimikrobinis aktyvumas priklauso nuo ekstrakcijai panaudoto tirpiklio (etanolis ar vanduo), jų koncentracijos ir mikroorganizmų kiekio. Įvertintas ekstraktų slopinamasis poveikis gramteigiamosioms (*W. viridescens*, *L. mesenteroides*, *L. monocytogenes*, *B. thermosphacta*) ir gramneigiamosioms (*P. putida* ir *C. jejuni*) bakterijoms (6 lentelė).

6 lentelė. Spanguolių išspaudų, iš kurių pašalinti riebalai, etanolinio ir vandeninio ekstraktų poveikis skirtingų bakterijų augimui

Mėginys	<i>L. monocytogenes</i>		<i>C. jejuni</i>		<i>P. putida</i>		<i>B. thermosphacta</i>		<i>L. mesenteroides</i>		<i>W. viridescens</i>	
	Inokuliacija (log KSV/mL)											
	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
	log KSV/mL											
Kontrolinis	c ^{9,20} _B	c ^{8,77} _A	a ^{8,22} _A	a ^{8,11} _A	a ^{8,75} _B	b ^{8,98} _A	c ^{8,10} _A	a ^{8,44} _A	abc ^{8,13} _A	a ^{8,01} _A	c ^{9,06} _B	c ^{7,93} _A
EtOH, 6,6 %	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	bcd ^{8,47} _A	a ^{9,03} _B	ab ^{8,63} _A	a ^{8,98} _B
EtOH, 3,3 %	a ⁰ _A	c ^{8,61} _B	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	cd ^{8,60} _A	f ^{8,49} _A	a ^{8,56} _A	d ^{8,53} _A
EtOH, 1,65 %	b ^c _{8,56} _B	b ^c _{8,22} _A	b ^{1,93} _A	b ^{1,93} _A	a ^{3,15} _A	c ^{7,46} _B	a ⁰ _A	b ^{5,48} _B	d ^{8,81} _B	a ^{8,25} _A	ab ^{8,71} _B	d ^{8,50} _A
EtOH, 0,83 %	b ^c _{8,53} _A	c ^{8,88} _A	d ^{6,81} _B	c ^{5,68} _A	a ^{8,44} _A	a ^{9,00} _B	c ^{7,82} _A	c ^{7,54} _A	ab ^{8,05} _B	cd ^{7,22} _A	abc ^{8,83} _B	b ^c _{7,69} _A
EtOH, 0,42 %	b ^{8,09} _A	c ^{8,85} _A	a ^{8,32} _B	a ^{8,00} _A	a ^{8,37} _A	f ^{9,01} _B	c ^{7,83} _A	cd ^{7,67} _A	ab ^{8,10} _B	b ^{6,45} _A	abc ^{8,78} _B	c ^{7,78} _A
H ₂ O, 6,6 %	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ⁰	a ^{9,31} _B	g ^{8,59} _A	ab ^{8,61} _A	d ^{8,68} _A
H ₂ O, 3,3 %	a ⁰	a ⁰	a ⁰ _A	b ^{1,83} _B	c ^{7,13} _A	d ^{8,31} _B	a ⁰	a ⁰	abc ^{8,11} _A	de ^{7,76} _A	ab ^{8,72} _A	d ^{8,75} _A
H ₂ O, 1,65 %	a ⁰	a ⁰	c ^{2,96} _A	c ^{5,39} _B	cd ^{7,46} _A	d ^{8,22} _B	b ^{3,15} _B	a ⁰ _A	ab ^{8,00} _B	cd ^{7,29} _A	ab ^{8,74} _B	a ^{7,40} _A
H ₂ O, 0,83 %	b ^c _{8,57} _A	b ^{7,85} _A	a ^{7,88} _B	d ^{7,54} _A	d ^{7,98} _A	d ^{8,26} _A	c ^{8,27} _B	cde ^{7,82} _A	a ^{7,60} _B	bc ^{6,91} _A	bc ^{8,89} _B	ab ^{7,49} _A
H ₂ O, 0,42 %	b ^c _{8,68} _A	c ^{8,64} _A	a ^{8,22} _A	a ^{8,23} _A	f ^{8,75} _A	a ^{8,98} _A	c ^{8,43} _A	d ^{8,35} _A	abc ^{8,23} _B	a ^{4,44} _A	ab ^{8,70} _B	b ^c _{7,34} _A

Pateiktos vidutinės trijų matavimų vertės ± SN; ^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus (ANOVA, p < 0,05); _{A, B} raidės prie skaičių toje pačioje eilutėje nurodo reikšmingus skirtumus tarp skirtingo kiekvieno mikroorganizmo skaičiaus (ANOVA, p < 0,05). Gauti rezultatai išreikšti log KSV/ml.

Ekstraktai turėjo didžiausią poveikį dviem gramteigiamosioms (*L. monocytogenes* ir *B. thermosphacta*) ir dviem gramneigiamosioms (*P. putida* ir *C. jejuni*) bakterijoms; beveik visais atvejais didesnė koncentracija (6,6 ir 3,3 %), nepriklausomai nuo tirpiklių ir mikroorganizmų skaičiaus, visiškai (100 %) slopino šių bakterijų augimą. Kita vertus, šiame tyrime naudotos kitos dvi gramteigiamosios bakterijos *W. viridescens* ir *L. mesenteroides* buvo atsparios ekstraktams, nepriklausomai nuo panaudotos koncentracijos, ir šie netgi paskatino jų augimą. Lyginant etanolinį ir vandeninį ekstraktus nustatyta, kad pirmasis

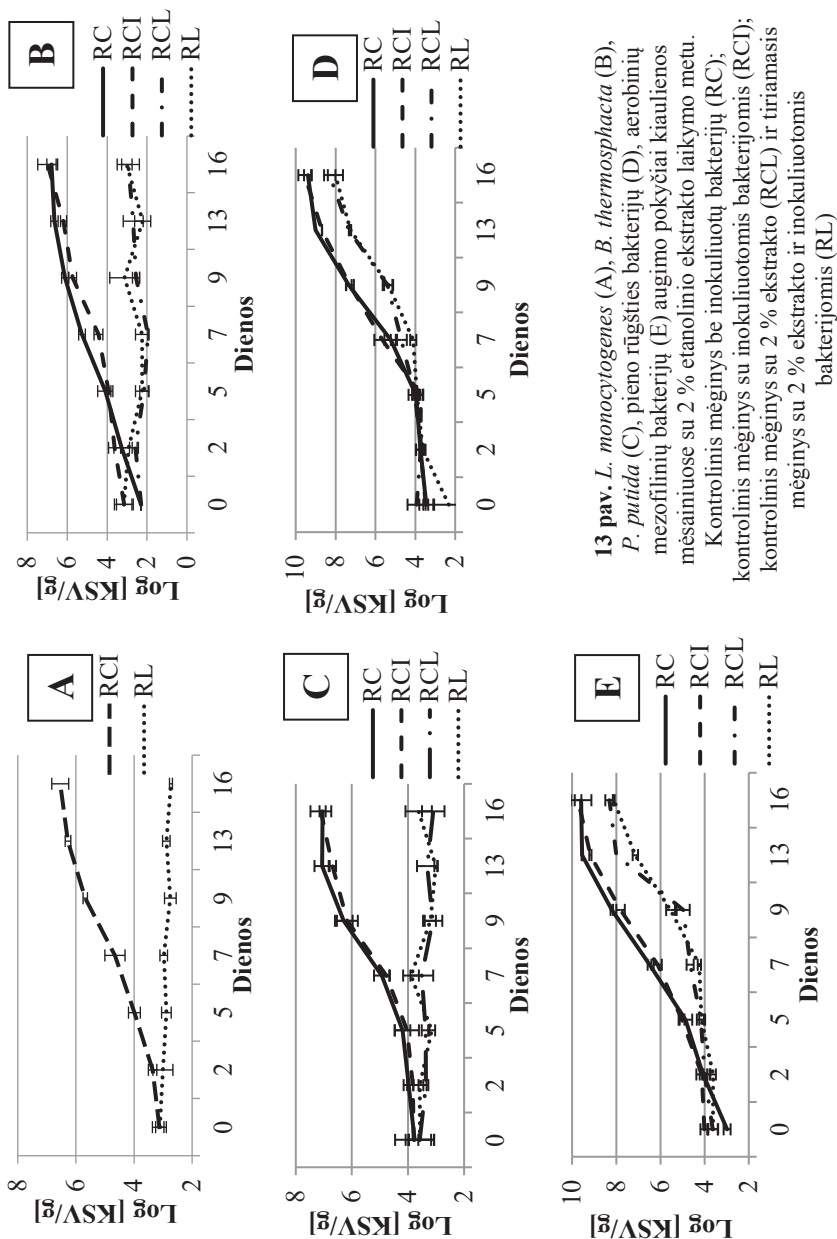
pasižymėjo stipresniu antibakteriniu poveikiu, ypač naudojant mažesnę kolonijas sudarančių vienetų (KSV) skaičių (4 log KSV/ml). Atsižvelgiant į tai, kad šio ekstrakto išėiga buvo kur kas didesnė ir kai kuriais atvejais antibakterinis poveikis tiriamoms kultūroms buvo šiek tiek stipresnis, tolesniems tyrimams pasirinktas būtent šis ekstraktas.

3.5.2. Antimikrobinis etanolinio ekstrakto poveikis mėsiniams jų laikymo metu

Mėsa yra puiki terpė daugintis mikroorganizmams, ypač malta mėsa, kuri yra jautresnė oksidacijai ir mikroorganizmų dauginimuisi, todėl labai svarbu ją apsaugoti. Per 16 eksperimento dienų *L. monocytogenes* bakterijų kiekis kontroliniame mėginyje su inokuliuotomis bakterijomis (RCI) išaugo nuo 3 iki 6,5 log KSV/g (**13 pav., A**). O tiriamajame mėginyje su inokuliuotomis bakterijomis bei ekstrakto priedu (RL) šios patogeninės bakterijos buvo slopinamos viso eksperimento metu ir praėjus 16-ai dienų jų nustatyta 2,72 log KSV/g. Žinoma, jog polifenoliai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis ir jų efektyvumas padidėja, kai pH sumažėja nuo 6,5 iki 4,5.

B. thermosphacta buvo aptikta visuose mėginiuose (nuo 2,3 iki 3,1 log KSV/g) (**13 pav., B**), vadinasi, mėginiai be inokuliuotų bakterijų buvo natūraliai jomis užteršti. Eksperimento metu kontroliniuose mėginiuose be ekstrakto (RC ir RCI) *B. thermosphacta* kiekis išaugo iki 7 log KSV/g, o mėginiuose su ekstraktu – apytiksliai iki 3 log KSV/g. Etanolinis ekstraktas buvo efektyvus ir slopinant *P. putida* augimą (**13 pav., C**). *Pseudomonas* genties bakterijų kiekis mėginiuose be ekstrakto (RC ir RCI) išaugo iki 7,1 log KSV/g (praėjus 16-ai dienų), o ekstrakto priedas slopino *P. putida* augimą iki 3,62 log KSV/g.

Ektrakto poveikis pieno rūgšties bakterijoms (PRB) bei aerobinėms mezofilinėms bakterijoms (AMB) nebuvo toks didelis kaip kitoms bakterijoms (**13 pav., D, E**), nors buvo nustatyta reikšmingų skirtumų tarp mėginių su ekstraktu ir be ekstrakto. Eksperimento pabaigoje kontroliniuose mėginiuose PRB ir AMB kiekis siekė beveik 10 log KSV/g, o mėginiuose su ekstraktu jis buvo apytiksliai 8 log KSV/g. Šiuo atveju taip pat nebuvo nustatyta reikšmingų skirtumų tarp mėginių su inokuliuotomis bakterijomis ir be jų.



3.5.2.1. Ekstrakto įtaka mėšainių fizikocheminėms savybėms

Spalva yra vienas svarbiausių veiksnių, lemiančių mėsos ir jos produktų priimtinumą vartotojams. Spanguolių išspaudų etanolinio ekstrakto įtaka mėsos spalvai bei jos pokyčiams laikymo metu buvo įvertinta naudojant „CIELab“ sistemą (**7 lentelė**). L^* koordinatės pokyčiai laikymo metu buvo nereikšmingi, nors etanolinio ekstrakto priedas gerokai padidino šių mėšainių a^* koordinatės vertes ir šie mėginiai tapo raudonesni bei geltonesni (b^*) už kontrolinius. Nepageidaujamus spalvos pokyčius gali lemti ir metmioglobino (MetMb) susidarymas. Pradinės MetMb vertės tiek mėginyje be ekstrakto (RC), tiek mėginyje su ekstraktu (RCL) buvo labai panašios ir siekė apie 45 %, o RC mėginyje tolesni MetMb kiekio pokyčiai nebuvo reikšmingi (**7 lentelė**). Mėšainyje su ekstraktu (RCL) MetMb kiekis augo ir eksperimento pabaigoje pasiekė 65 %. Šiuos rezultatus galėjo lemti mažesnis RCL nei RC mėšainių pH, nes kai pH yra 5,5, paspartėja MetMb susidarymas.

Mėsos produktų pH yra siejamas su jų sauga, juslinėmis savybėmis ir tekstūra. Kiaulienos mėšainiai su 2 % etanolinio ekstrakto viso eksperimento metu turėjo mažesnį pH nei kontroliniai mėginiai (**7 lentelė**). Tai gali būti siejama su mažu paties ekstrakto pH (2,5). Per 16 dienų pH pokyčiai RCL mėginyje buvo nedideli, bet reikšmingi ($p < 0,05$). Vandens aktyvumas (a_w) yra svarbus veiksnys mikrobiniam augimui. Apskritai, lyginant a_w vertes, skirtumai buvo gana nedideli (0,988–0,997), o išspaudų ekstraktas neturėjo reikšmingos įtakos neapdorotų mėšainių a_w ($p > 0,05$) (**7 lentelė**).

Etanolinis ekstraktas pasižymėjo dideliu AA (**5 lentelė**), todėl buvo nuspręsta nustatyti AA mėsos produktuose. Malondialdehidas (MDA), kuris, reaguodamas su tiobarbitūriniu rūgštimi, sudaro spalvotus produktus, yra nepageidautinas mėsos produktuose, nes tai yra antrinis lipidų peroksidacijos produktas. Ekstrakto priedo įtaka MDA susidarymui mėšainiuose buvo akivaizdi (**7 lentelė**). Kontroliniame mėšainyje MDA kiekis laikymo metu išaugo nuo 0,351 (0 diena) iki 1,394 mg MDA/kg (16 diena), o mėšainyje su 2 % etanolinio ekstrakto MDA padaugėjo nuo 0,063 iki 0,206 mg MDA/kg. Šie rezultatai rodo stiprų junginių, išsekstrahuotų iš spanguolių išspaudų, antioksidacinį poveikį.

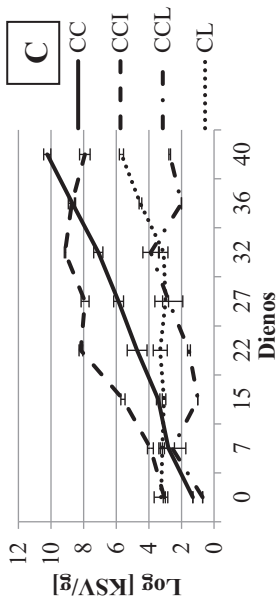
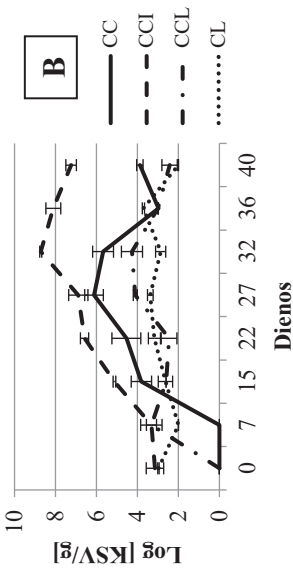
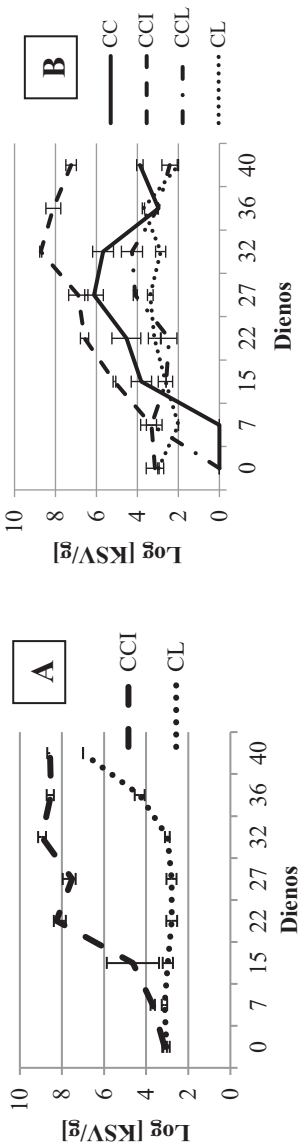
3.5.3. Ekstrakto įtaka virto kumpio mikrobiologinei kokybei

Etanolinio ekstrakto antimikrobinis poveikis įvertintas virtame kumpyje, kuris buvo inokuliuotas keturiomis *L. monocytogenes* padermėmis ir 40 dienų laikomas 4 °C temperatūroje. Kontroliniame mėginyje su inokuliuotomis bakterijomis (CCI) nustatytas staigus bakterijų augimas per pirmąsias 22 dienas nuo 3,04 iki 8,26 log KSV/g, vėliau jis buvo lėtesnis (**14 pav., A**). Spanguolių išspaudų ekstraktas labai efektyviai slopino *L. monocytogenes* virtame kumpyje, todėl per pirmąsias 32 eksperimento dienas šių bakterijų kiekis buvo labai panašus (2,78–3,13 log KSV/g), tačiau vėliau jis pradėjo augti ir pasiekė 7 log KSV/g.

7 lentelė. Kiaulienos mėsainių fizikocheminių parametų pokyčiai laikymo metu

Diena	Mėginys	pH	a _w	L*	a*	b*	MetMb, %	Malondialdehid., mg/kg
0	RC	6,04±0,02 ^{bc}	0,997±0,002 ^d	57,03±5,80 ^b	5,02±1,91 ^{ab}	15,31±1,35 ^{abc}	45,00±1,44 ^{ab}	0,351±0,152 ^a
	RCL	4,96±0,02 ^b	0,995±0,001 ^b	46,06±4,03 ^{ab}	10,59±1,40 ^d	3,86±0,46 ^b	45,86±0,89 ^d	0,063±0,063 ^a
2	RC	6,13±0,04 ^d	0,992±0,003 ^{bc}	53,77±3,48 ^{ab}	7,49±1,38 ^d	16,91±1,42 ^d	52,61±2,82 ^d	0,397±0,034 ^a
	RCL	5,02±0,02 ^{cd}	0,993±0,002 ^{ab}	44,76±4,79 ^a	8,31±1,78 ^c	2,33±0,35 ^a	64,09±0,77 ^a	0,098±0,045 ^a
5	RC	6,07±0,03 ^c	0,994±0,001 ^{bcd}	55,86±4,84 ^{ab}	6,80±2,13 ^{cd}	16,51±1,90 ^{cd}	45,96±1,53 ^{cd}	0,403±0,013 ^a
	RCL	5,06±0,03 ^d	0,995±0,001 ^b	49,28±5,33 ^{bc}	7,53±0,60 ^{bc}	4,79±0,64 ^{bc}	60,60±2,64 ^c	0,117±0,090 ^{ab}
7	RC	6,09±0,04 ^{cd}	0,988±0,003 ^a	55,97±4,74 ^{ab}	6,50±1,25 ^{bcd}	14,39±3,37 ^{ab}	48,13±1,81 ^{bc}	0,479±0,055 ^a
	RCL	5,04±0,04 ^d	0,991±0,002 ^a	46,56±2,46 ^{ab}	7,40±0,74 ^{cd}	4,62±0,56 ^{bc}	56,19±2,96 ^b	0,129±0,030 ^{ab}
9	RC	5,99±0,05 ^b	0,991±0,003 ^{ab}	51,40±5,52 ^a	6,56±0,82 ^{cd}	13,70±1,15 ^a	47,67±2,62 ^{bc}	0,814±0,178 ^b
	RCL	5,06±0,01 ^d	0,993±0,001 ^{ab}	47,27±2,51 ^{abc}	7,18±1,14 ^{cd}	5,12±0,98 ^c	57,64±2,12 ^{bc}	0,200±0,047 ^b
13	RC	5,50±0,03 ^a	0,995±0,001 ^{cd}	53,84±2,62 ^{ab}	5,23±0,47 ^{bc}	13,69±1,58 ^a	43,68±0,70 ^a	0,944±0,011 ^b
	RCL	4,99±0,03 ^{bc}	0,991±0,002 ^a	53,71±2,39 ^d	5,38±0,47 ^a	6,37±1,12 ^d	65,12±2,60 ^d	0,152±0,025 ^{ab}
16	RC	5,51±0,05 ^a	0,993±0,003 ^{bc}	53,64±2,56 ^{ab}	4,51±0,33 ^a	13,57±2,42 ^a	49,90±2,06 ^{cd}	1,394±0,097 ^c
	RCL	4,78±0,03 ^a	0,991±0,002 ^a	50,88±2,86 ^{cd}	6,70±0,49 ^b	6,35±1,17 ^d	65,00±1,43 ^d	0,206±0,030 ^b

a, b raidės prie skaitčių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus vieno mėginio skirtumus laikymo metu (ANOVA, p < 0,05); Kontrolinis mėginys be inokuliuotų bakterijų (RC); kontrolinis mėginys su 2 % ekstrakto (RCL).



14 pav. *L. monocytogenes* (A), pieno rūgšties bakterijų (B), aerobinių mezofilinių bakterijų (C) augimo pokyčiai virtame kumpyje su 2 % etanolinio ekstrakto laikymo metu. Kontrolinis mėginys be inokuliuotų bakterijų (CC); kontrolinis mėginys su inokuliuotomis bakterijomis (CCI); kontrolinis mėginys su 2 % ekstrakto (CCL) ir tiriamasis mėginys su 2 % ekstrakto ir inokuliuotomis bakterijomis (CL)

PRB taip pat yra nepageidaujamos termiškai apdorotuose produktuose, nes tai pagrindinė bakterijų grupė, susijusi su produktų gedimu. *Leuconostocaceae* šeimos bakterijos, tokios kaip *W. viridescens*, gali sukelti mėsos gaminių žalumą. PRB (**14 pav., B**) ir AMB (**14 pav., C**) kiekis greitai padidėjo kontroliniuose mėginiuose su inokuliuotomis bakterijomis (CCI) ir mėginiuose be (CC) inokuliuotų bakterijų. Didesnis šių bakterijų kiekis nustatytas kontroliniame mėginyje su inokuliuotomis bakterijomis. Nustatyta, kad ekstraktas (CCL ir CL mėginiuose) slopino PRB bei AMB augimą laikymo metu.

3.5.3.1. Verto kumpio fizikocheminės savybės

Kumpių tinkamumo vartoti terminas, tekstūra bei spalva taip pat priklauso nuo pH. Mėginyje su 2 % spanguolių išspaudų ekstrakto (5,56) nustatytos mažesnės pH vertės nei kontroliniame mėginyje (be ekstrakto). Verto kumpio su ekstraktu pH vertės galėjo būti mažesnės dėl jame esančių organinių rūgščių, tokių kaip chlorogeno ir benzoinės rūgšties, kurios yra išekstrahuojamos iš spanguolių išspaudų naudojant 96 % etanolį. Laikymo metu pH padidėjo visuose mėginiuose, vis dėlto viso eksperimento metu didesnės pH vertės buvo nustatytos kontroliniame mėginyje be ekstrakto.

Vandens aktyvumas virtuose kumpiuose be ekstrakto ir virtuose kumpiuose su 2 % ekstrakto buvo labai panašus: atitinkamai 0,980 ir 0,977. Viso eksperimento metu vandens aktyvumas abiejuose mėginiuose išliko gana panašus. Tai rodo, kad gamybos metu pridėtas ekstraktas neturėjo įtakos produkto vandens aktyvumui.

Pirmąją dieną L^* koordinatės vertės buvo mažesnės virtame kumpyje su ekstraktu, šie mėginiai buvo tamsesni nei kontroliniai (**8 lentelė**). Laikymo metu (7, 15, 22, 27, 32, 36, 40) ši vertė sumažėjo 29 % CC mėginyje ir 23 % CCL mėginyje. Etanolinio ekstrakto priedas padidino mėginių raudonumą (a^*). Vis dėlto a^* koordinatės vertės sumažėjo abiejuose mėginiuose, ypač per pirmąsias 15 dienų, ir eksperimento pabaigoje buvo 32 % mažesnės už pradines vertes. Virtuose kumpiuose su ekstrakto priedu nustatytos mažesnės geltonumo (b^*) vertės nei kontroliniuose mėginiuose. Tai gali būti siejama su tuo, kad ekstraktas turi intensyvią raudoną spalvą, bet mažesnę įtaką b^* vertei. b^* koordinatės vertės laikymo metu sumažėjo kontroliniuose mėginiuose, o mėginiuose su ekstrakto priedu pokyčiai nebuvo reikšmingi.

8 lentelė. Virto kumpio (su ekstraktu ir be ekstrakto) fizikocheminių parametų pokyčiai laikymo metu

Diena	Mėginys	pH	a_w	L*	a*	b*
0	CC	5,95±0,20 ^a	0,980±0,001 ^a	91,87±5,74 ^b	6,41±1,17 ^c	9,53±0,77 ^{cd}
	CCL	5,56±0,01 ^a	0,977±0,002 ^{bc}	70,05±3,43 ^c	10,43±0,47 ^d	7,47±1,13 ^a
7	CC	6,10±0,03 ^b	0,981±0,002 ^{ab}	62,93±3,00 ^a	5,01±0,82 ^b	9,09±0,63 ^{cd}
	CCL	5,66±0,05 ^{cd}	0,978±0,002 ^c	54,52±2,83 ^{ab}	8,02±0,72 ^c	7,98±0,71 ^a
15	CC	6,08±0,05 ^b	0,981±0,001 ^{ab}	64,95±3,21 ^a	3,16±0,77 ^a	9,12±0,67 ^{cd}
	CCL	5,65±0,01 ^{bcd}	0,978±0,001 ^c	51,65±2,32 ^a	7,01±0,52 ^{ab}	7,22±0,53 ^a
22	CC	6,06±0,01 ^{ab}	0,980±0,000 ^a	63,28±2,45 ^a	5,33±0,63 ^b	8,74±0,91 ^{bc}
	CCL	5,69±0,04 ^d	0,975±0,001 ^a	55,41±2,20 ^b	6,78±0,55 ^a	7,63±0,51 ^a
27	CC	6,03±0,01 ^{ab}	0,981±0,003 ^{ab}	64,82±2,66 ^a	4,33±1,05 ^b	9,96±0,96 ^d
	CCL	5,60±0,01 ^{ab}	0,980±0,001 ^d	54,44±3,54 ^{ab}	6,65±0,73 ^a	7,60±0,92 ^a
32	CC	6,01±0,03 ^{ab}	0,983±0,001 ^b	63,65±2,39 ^a	5,15±0,81 ^b	8,03±0,63 ^{ab}
	CCL	5,60±0,01 ^{ab}	0,978±0,001 ^c	54,66±2,72 ^{ab}	6,95±0,59 ^{ab}	7,58±0,67 ^a
36	CC	6,04±0,02 ^{ab}	0,981±0,001 ^{ab}	63,13±2,69 ^a	5,04±1,30 ^b	8,07±0,87 ^{ab}
	CCL	5,62±0,01 ^{bc}	0,975±0,001 ^{ab}	53,79±2,91 ^{ab}	7,60±0,47 ^{bc}	8,08±0,58 ^a
40	CC	6,06±0,01 ^{ab}	0,981±0,001 ^{ab}	63,99±2,83 ^a	4,40±0,42 ^b	7,77±0,60 ^a
	CCL	5,64±0,02 ^{cd}	0,977±0,001 ^c	54,29±3,03 ^{ab}	7,18±0,51 ^{ab}	7,82±0,79 ^a

^{a, b} raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus vieno mėginio skirtumus laikymo metu (ANOVA, $p < 0,05$). Kontrolinis mėginys be inokuliuotų bakterijų (CC); kontrolinis mėginys su 2 % ekstrakto (CCL).

IŠVADOS

1. Optimizavus spanguolių išspaudų ekstrakcijos superkritiniu anglies dioksidu parametrus, atsako paviršiaus metodu nustatyta, kad didžiausia ekstrakto išeiga – 11,10 % (m/m SM) – gaunama esant 42,4 MPa slėgiui, 53 °C temperatūrai ir 158 min ekstrakcijos trukmei. Ekstrahuojant standartiniu Soksleto ekstrakcijos metodu heksanu per 6 h išekstrahuojama 11 g/100 g lipidų. Sveikatai naudingos mononesočiosios ir polinesočiosios riebalų rūgštys išekstrahuotų triacilglicerolių sudėtyje sudarė atitinkamai 21,79 ir 69,58 %.

2. Nustatyta, kad, modifikuojant virškritinės ekstrakcijos tirpiklį ir keičiant sistemos separatorių parametrus, galima pagaminti skirtingos sudėties lipofilinių medžiagų frakcijas. Naudojant gryną CO₂ ir šaldant I separatorių 0 ir –10 °C temperatūroje, jame susikauptė didesnė ekstrakto dalis (lengvesnioji frakcija) – 5,93 ir 6,86 %; į tirpiklio srautą įterpus 5 % etanolio, daugiau ekstrakto (sunkesnioji frakcija) susikauptė II separatoriuje – 6,05 ir 6,21 %. Sumažinus I separatoriaus temperatūrą iki –20 ir –30 °C, lengvesniosios frakcijos išeiga gerokai padidėjo – iki 7,91 ir 8,18 %. Lengvoji frakcija pasižymėjo kur kas stipresne (ypač įterpus etanolio) deguonies radikalo absorbcijos geba (DRAG). Triacilglicerolių ir riebalų rūgščių sudėties skirtumai frakcijose buvo nereikšmingi, tačiau daugiausia skvaleno (4,51–12,09 %) visais atvejais buvo sunkesniojoje frakcijoje. Mikrokomponentų – fitosterolių, tokoferolių ir lakiųjų junginių – koncentracija lengvosiose frakcijose buvo iki 8 kartų didesnė, ypač naudojant tirpiklio modifikatorių – etanolį.

3. Ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje (ETPS) buvo išbandyta siekiant iš spanguolių išspaudų (pašalinus riebalus) išskirti didesnio poliškumo junginius. Optimizavus pasirinktus parametrus, didžiausia bendroji išeiga (55,89 %) buvo gauta ekstrahuojant etanolio 3 kartus po 15 min 83 °C temperatūroje. Optimizavus ETPS-EtOH ekstrakcijos temperatūrą 50–90 °C intervale ir ciklą trukmę 5–15 min intervale, didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) 1 g ekstrakto buvo 43,43 mg galo rūgšties ekvivalentų (GRE), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonrūgšties) (ABTS⁺) sujungimo geba – 179,0 mg trolokso ekvivalentų (TE), DRAG – 270,2 mg TE ekstrahuojant 90 °C temperatūroje. Didžiausias proantocianidinų kiekis – 225,2 ir 220,2 mg/g ekstrakto – gautas ekstrahuojant 3 kartus po 15 min 70 ir 90 °C temperatūroje. Ekstrakcijos ciklo trukmė buvo svarbus antocianinų išgavos faktorius: ekstrahuojant 50 °C temperatūroje ir prailginus ciklo trukmę nuo 5 iki 10 min išgautas šių junginių kiekis padidėjo nuo 97,10 iki 183,6 mg/100 g SM. ETPS-EtOH ekstrakcijos liekaną ekstrahavus vandeniu 3 kartus po 10 min 130 °C temperatūroje, išeiga siekė 6,50 %.

4. Peonidin-3-galaktozidas ir peonidin-3-arabinozidas buvo ekstraktuose vyraujantys antocianinai: ETPS-EtOH ekstrakte jų nustatyta atitinkamai 94,36 ir 67,79 mg/100 g, o ETPS-H₂O – 0,96 ir 0,86 mg/100 g. Obuolių, chino ir citrinų rūgštys, procianidinas B3 bei kvercetino heksozidas buvo identifikuoti abiejuose

ekstraktuose. Spanguolių išspaudų vandeninis ekstraktas slopino tiek afrikinę, tiek azijinę Zikos viruso padermę žmogaus plaučių epitelio (A549) ląstelėse, tačiau nebuvo citotoksiškas *in vitro* ir *in vivo* sistemose. Etanolinis ekstraktas nepasižymėjo antivirusinėmis savybėmis.

5. DRAG, BFJK ir ABTS⁺⁺ metodais nustatyta, kad poliškais tirpikliais iš spanguolių išspaudų (pašalinus riebalus) išskirti ekstraktai buvo daug stipresni antioksidantai negu CO₂ ar heksanu išskirtos lipofiliškos medžiagos. Be to, vandeninis ekstraktas buvo gerokai stipresnis antioksidantas negu etanolinis: vandeninio ekstrakto BFJK, DRAG ir ABTS⁺⁺ sujungimo gebos vertės buvo 188,9 mg GRE/g, 1084 ir 362,6 mg TE/g, o etanolinio – 52,98 mg GRE/g, 130,4 ir 345 mg TE/g. Siekiant įvertinti antioksidantų išskyrimo efektyvumą, spanguolių išspaudų bei ekstraktų liekanų antioksidacinė geba buvo įvertinta taikant QUENCHER procedūrą (matuojama tiesiogiai sausojoje medžiagoje). Išekstrahavus lipofilinę frakciją antioksidacinė geba beveik nepasikeitė, tačiau užbaigus ekstrakcijas poliškais tirpikliais liekamoji antioksidacinė geba sudarė tik 3–5 % nuo pradinės. Akivaizdu, kad poliškais tirpikliais iš spanguolių išspaudų buvo efektyviai išskirta didžioji dalis antioksidantų.

6. Etanolinis ir vandeninis spanguolių išspaudų ekstraktai efektyviai slopino patogenines bei mėsos gedimą sukeliančias bakterijas; 6,6 ir 3,3 % ekstraktų priedai visiškai sunaikino tirtas bakterijas. Etanolinis ekstraktas pasižymėjo stipriu antibakteriniu poveikiu mėsos ištraukoje, mėsainiuose ir virtuose kumpiuose. Ektrakto priedas 5–7 kartus sumažino mėsainių laikymo metu susidarančio lipidų oksidacijos produkto – malondialdehido kiekį ir turėjo didžiausią įtaką gaminių spalvai. Mėsos produktų su ekstraktu raudonos / žalios spalvos koordinatė a^* buvo 2 kartus didesnė nei kontrolinių mėginių be priedo. Tačiau svarbu pažymėti, kad ekstraktas neturėjo reikšmingos įtakos kitoms juslinėms mėsainių ir virtų kumpių savybėms.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

STRAIPSNIAI

Mokslinės publikacijos disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos duomenų bazės „Clarivate Analytics WOS“ sąrašo leidiniuose:

1. **Tamkutė, Laura**; Pukalskas, Audrius; Syrpas, Michail; Urbonavičienė, Dalia; Viškelis, Pranas; Venskutonis, Petras Rimantas. Fractionation of cranberry pomace lipids by supercritical carbon dioxide extraction and on-line separation of extracts at low temperatures // Journal of Supercritical Fluids. Amsterdam: Elsevier, 2020. (I. F. 3,744 (2019)).

2. **Tamkutė, Laura**; Liepuoniūtė, Rūta; Pukalskienė, Milda; Venskutonis, Petras Rimantas. Recovery of valuable lipophilic and polyphenolic fractions from cranberry pomace by consecutive supercritical CO₂ and pressurized liquid extraction // Journal of Supercritical Fluids. Amsterdam: Elsevier, 2020, vol. 159, p. 1–11. ISSN: 0896-8446. (I. F. 3,744 (2019)).

3. **Tamkutė, Laura**; Melero Gil, Beatriz; Rovira Carballido, Jord; Pukalskienė, Milda; Venskutonis, Petras Rimantas. Effect of cranberry pomace extracts isolated by pressurized ethanol and water on the inhibition of food pathogenic / spoilage bacteria and the quality of pork products // Food Research International. Amsterdam: Elsevier. 2019, vol. 120, p. 38–51. ISSN: 0963-9969. (I. F. 4,972 (2019)).

Kitos mokslinės publikacijos ne disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos duomenų bazės „Clarivate Analytics WOS“ sąrašo leidiniuose:

1. Eisinaitė, Viktorija; **Tamkutė, Laura**; Vinauskienė, Rimantė; Leskauskaitė, Daiva. Freeze-dried celery as an indirect source of nitrate in cold-smoked sausages: effect on safety and color formation // LWT – Food Science and Technology. Amsterdam: Elsevier. 2020, vol. 00, p. 1–10. ISSN: 0023-6438. (I. F. 4,006 (2019)).

2. Kitrytė, Vaida; Kavaliauskaitė, Asta; **Tamkutė, Laura**; Pukalskienė, Milda; Syrpas, Michail; Venskutonis, Petras Rimantas. Zero waste biorefining of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) pomace into functional ingredients by consecutive high pressure and enzyme assisted extractions with green solvents // Food Chemistry. Oxford: Elsevier. 2020, vol. 322, p. 1–8. ISSN: 0308-8146. (I. F. 6,306 (2019)).

3. Bobinaitė, Ramunė; Kraujalis, Paulius; **Tamkutė, Laura**; Urbonavičienė, Dalia; Viškelis, Pranas; Venskutonis, Petras Rimantas. Recovery of bioactive substances from rowanberry pomace by consecutive extraction with supercritical carbon dioxide and pressurized solvents // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. New York: Elsevier. 2020, vol. 85, p. 152–160. ISSN: 1226-086X. (I. F. 5,278 (2019)).

4. Kitrytė, Vaida; Narkevičiūtė, Aistė; **Tamkutė, Laura**; Syrpas, Michail; Pukalskienė, Milda; Venskutonis, Petras Rimantas. Consecutive high-pressure and enzyme assisted fractionation of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) pomace into functional ingredients: process optimization and product characterization // Food Chemistry. Oxford: Elsevier. 2020, vol. 312, p. 1–11. ISSN: 0308-8146. (I. F. 6,306 (2019)).

5. Raudienė, Edita; Gailius, Darius; Vinauskienė, Rimantė; Eisinaitė, Viktorija; Balčiūnas, Gintautas; Dobilienė, Justina; **Tamkutė, Laura**. Rapid evaluation of fresh chicken meat quality by electronic nose // Czech journal of food sciences. Prague: Czech Academy of Agricultural Sciences. 2018, vol. 36, iss. 5, p. 420–426. ISSN: 1212-1800. (I. F. 0,932 (2019)).

Pranešimai disertacijos tema, išspausdinti užsienio konferencijų pranešimų medžiagoje:

1. **Tamkutė, Laura**; Melero Gil, Beatriz; Rovira Carballido, Jord; Pukalskienė, Milda; Venskutonis, Petras Rimantas. Defatted cranberries pomace extract improves the quality of pork burgers // 13th Baltic conference on food science and technology “Food. Nutrition. Well-being” and NEEFOOD 2019 5th North and East European congress on food, May 2–3, 2019, Jelgava, Latvia. Abstract book / Faculty of Food Technology. Jelgava: Latvia University of Life Sciences and Technologies, 2019, p. 132. ISBN: 978-998-44-8317-7.

2. Venskutonis, Petras Rimantas; **Tamkutė, Laura**; Liepuoniūtė, Rūta. Biorefining of cranberry pomace into valuable fractions by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction // 17th European meeting on supercritical fluids. 7th European meeting high pressure technology, April 8–11, 2019, Ciudad Real, Spain. Abstract book / Institute of Chemical and Environmental Technology (ITQUIMA). Ciudad Real: Universidad de Castilla-La Mancha, 2019. p. 260–261. ISBN: 978-840-91-0484-0.

3. **Tamkutė, Laura**; Melero Gil, Beatriz; Rovira Carballido, Jord; Venskutonis, Petras Rimantas. Recovery of bioactive fractions from cranberry pomace and their use for increasing functional properties of meat products // International conference and exhibition on nutraceutical and functional foods (ISNFF-2018), October 14–17, 2018, Vancouver, BC, Canada. Vancouver: ISNFF, 2018, p. 43.

4. **Tamkutė, Laura**; Melero Gil, Beatriz; Rovira Carballido, Jord; Venskutonis, Petras Rimantas. Effect of ethanolic extracts of cranberry pomace isolated by higher pressure extraction on the quality and shelf life of pork hamburgers // 5th international ISEKI Food conference “The food system approach: new challenges for education, research and industry”, July 3–5, 2018, Stuttgart, Germany. Abstract book / University of Hohenheim. Vienna: ISEKI Food Association, 2018, p. 347. ISBN: 978-390-09-3234-3.

5. **Tamkutė, Laura**; Melero Gil, Beatriz; Rovira Carballido, Jord; Venskutonis, Petras Rimantas. Effect of ethanolic extracts of cranberry pomace on pork hamburgers // 12th Baltic conference on food science and technology “Food R&D in the Baltics and beyond” (FoodBalt-2018), May 17–18, 2018, Kaunas, Lithuania. Abstract book / Department of Food Science and Technology. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2018, p. 51. eISBN: 978-609-02-1462-6.

6. **Tamkutė, Laura**; Liepuoniūtė, Rūta; Venskutonis, Petras Rimantas. Optimization of supercritical fluid and pressurized liquid extraction of cranberries pomace using response surface methodology // 12th Baltic conference on food science and technology “Food R&D in the Baltics and beyond” (FoodBalt-2018), May 17–18, 2018, Kaunas, Lithuania. Abstract book / Department of Food Science and Technology. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2018, p. 61. eISBN: 978-609-02-1462-6.

7. **Tamkutė, Laura**; Venskutonis, Petras Rimantas. Optimization of supercritical fluid extraction of cranberries pomaces using response surface methodology // 4th North and East European congress on food (NEEFood 2017), September 10–13, 2017, Kaunas, Lithuania. Abstract book / Department of Food Science and Technology. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2017, p. 52. ISBN: 978-609-02-1373-5.

Kitos konferencijos

1. **Tamkutė, Laura**; Venskutonis, Petras Rimantas; Liepuoniūtė, Rūta. Can cranberry pomace extract mitigate the carcinogenicity of processed meat? // “Technorama 2019”: from vision to innovation!, May 9, 2019. Kaunas, Lithuania. Innovation catalogue / “Santaka” Valley. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2019, p. 6.

2. **Tamkutė, Laura**; Melero Gil, Beatriz; Rovira Carballido, Jord; Venskutonis, Petras Rimantas. Defatted cranberry pomace extract increases safety and antioxidant potential of pork burgers during *in vitro* gastrointestinal digestion // Chemistry and chemical technology: Lithuanian chemists conference, May 16, 2019, Vilnius, Lithuania. Conference book / Lithuanian Academy of Sciences. Vilnius: Vilnius University, 2019, p. 127. eISBN: 978-609-07-0167-6.

Trumpa informacija apie autorę

Laura Tamkutė gimė 1991 m. sausio 12 d. Kaune.

Išsilavinimas:

- | | |
|--------------|---|
| 2010 m. | Baigė Kėdainių „Šviesiąją“ gimnaziją. |
| 2010–2014 m. | Studijavo Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete, baigė Maisto mokslo ir technologijos studijų programą ir įgijo bakalauro kvalifikacinį laipsnį. |
| 2014–2016 m. | Studijavo Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete, baigė maisto technologijų krypties Maisto mokslo ir saugos studijų programą ir įgijo maisto technologijų magistro kvalifikacinį laipsnį. |
| 2016–2020 m. | Studijavo Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete chemijos inžinerijos krypties doktorantūroje. |

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovui prof. dr. Petrui Rimantui Venskutoniui už disertacijos temos idėją, vertingas mokslines konsultacijas rengiant publikacijas bei disertaciją, nuolatinę paramą, skatinimą tobulėti ir įvairiapusę pagalbą. Esu dėkinga prof. dr. Jordi'ui Rovira'ai Carballido'ui, doc. Beatriz Melero Gil (Burgoso universitetas, Ispanija) bei doc. Chaker'ui El Kalamouni'ui ir dr. Juliano'ui Haddad'ui (Reunjono salos universitetas) už suteiktą galimybę stažuotis jų mokslinėse grupėse ir sudarytą draugišką atmosferą. Noriu padėkoti visiems Maisto mokslo ir technologijos katedros kolegoms, ypač doc. dr. Audriui Pukalskui, dr. Mildai Pukalskienei ir doc. Michail'ui Syrpas'ui už svarų indėlį atliekant šį darbą. Labai dėkoju kolegoms už patarimus, pagalbą, kūrybišką ir jaukią atmosferą per visus mano studijų metus.

Nuoširdžiai dėkoju tėvams, broliams, artimiesiems ir draugams už meilę, kantrybę, rūpinimąsi, moralinę paramą ir supratimą per visą mano studijų laikotarpį.

Ačiū visiems už palaikymą ir padrąšinimą!

Laura Tamkutė

VALORIZATION OF CRANBERRY POMACE BY BIOREFINING INTO VALUABLE FUNCTIONAL FOOD-GRADE INGREDIENTS USING HIGH PRESSURE EXTRACTIONS AND FRACTIONATION

SUMMARY

INTRODUCTION

Berries are nutritionally valuable fruits containing various compounds beneficial to health. Many berry species also possess excellent flavor properties and may be consumed both as fresh foods and raw materials for a variety of processed products. Yet, some berry species are not consumed as fresh fruits due to unacceptable taste; however, they also accumulate large amounts of valuable phytochemicals, particularly phenolic antioxidants. So far as fresh berries are highly perishable fruits, major part of their harvest is processed into various longer shelf-life products such as jam, juice, confiture, etc. The processing of fruits into juice generates large amounts of by-products which may reach 20–30% of the initial dry weight. These by-products are called pomace, press-cake, or marc. Berry pomace is composed of seeds, skin, pulp residues, and, sometimes, stems. It is sometimes discarded as waste or used inefficiently for composting and animal feeding. Pomace still contains a considerable fraction of beneficial bioactive phytochemicals, such as tocopherols, phytosterols, polyphenols which have been shown to possess numerous health benefits. Consequently, there is urgent need of valorization of berry pomace for reducing the losses of valuable nutrients and negative environmental impact of biowaste.

One of the main goals is recovery of valuable phytochemicals from fruit by-products, and it is in line with the increasing interest of the consumers who have been paying more attention to healthy, safe, nutritious foods without chemical additives which may have potential toxicological effects on human health. During the last decade, researchers have been focusing on search for new, natural and valuable bioactive compounds originating from natural sources (berries, vegetables, fruits) which are safe, effective and acceptable as natural preservatives or antioxidants. These bioactives may be used to control the microbial and chemical mechanisms responsible for spoilage of food products. A lot of studies showed that, in the food industry, by-products (waste) (including pomace) retain a huge amount of bioactive compounds which may still be recovered as functional components for food, pharmaceutical and cosmetic industries. Furthermore, the constantly growing food industry produces higher amounts of waste, which has a devastating negative effect on the environment. The modern industry is focused on reducing the environmental impact of industrial by-products and creating added value products. Therefore, the combination of various novel techniques allows reducing the amount of by-products and recovering bioactive compounds.

Environmental aspects represent other important issues in developing efficient technologies for the valorization of food processing by-products and

waste. From this point of view, the so-called green processes are preferred in the development of new technologies in food and other industries. Numerous studies apply green chemistry principles for the recovery of valuable phytochemicals from fruit processing by-products. For instance, among various extraction techniques, preference is given to green chemistry-based techniques which do not use harmful organic solvents, and which reduce the use of energy and other resources. Therefore, the development of complex multistep processing methods including novel techniques, such as supercritical CO₂ and pressurized liquid extraction for the recovery of high added value constituents, may be considered as a highly promising trend in biorefining the by-products. To achieve better results, these extraction methods can be accompanied with various mathematical optimization techniques.

Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) are popular berries, particularly in the Northern countries. Due to their strong sour taste, cranberries are processed into various products, including juice. Cranberries contain various health-beneficial substances and have been used not only for foods but also as a natural remedy. For instance, cranberry polyphenols show antimicrobial activity against some pathogenic bacteria (*Staphylococcus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*) which are responsible for foodborne diseases. The bioactive components of berry pomace may be obtained by using various by-product processing techniques which are applied to enhance the functionality of various food products. Furthermore, every year, the number of natural food products with various bioactive components from berries and their pomace has been increasing. So far as systematic studies on the processing of cranberry pomace have not been performed previously, this study investigates the valorization of cranberry pomace when using multistep processes for biorefining the biomass into high value food-grade functional ingredients with the objective to define their application in meat products. Firstly, supercritical carbon dioxide extraction and pressurized liquid extraction were optimized by using the response surface methodology with the face-centered central composite design for effective isolation of the lipophilic fraction and higher polarity substances. Then, supercritical fluid extraction with carbon dioxide was used to fractionate the cranberry pomace extract under optimal conditions and evaluate the efficiency of fractionation for various bioactive compounds at a low temperature and reduced pressure in separators. Finally, the ethanol extract of cranberry pomace, which is rich in polyphenols, was applied to improve the safety and quality of meat products. Various assays (antioxidant activity, antiviral, antimicrobial) were applied to determine the best polar extract for the value-added ingredient production and their application in food products.

The aim and tasks of the work

The aim of the thesis is to valorize cranberry pomace by applying effective multistep biorefining technologies based on high pressure extraction/fractionation

techniques for the production of valuable functional ingredients and evaluation of their phytochemical composition, biological and technological properties.

The following objectives were raised for achieving this aim:

1. By using the Central Composite Design (CCD) based on Response Surface methodology (RSM) to determine the optimal supercritical carbon dioxide extraction (SFE-CO₂) parameters (temperature, extraction time and pressure) so that to obtain the highest possible yield of the lipophilic fraction from cranberry pomace; to investigate extraction kinetics under optimal conditions and to determine the fatty acid composition of the recovered triacylglycerols.

2. To evaluate the possibilities of fractionation of the cranberry pomace lipophilic fraction during SFE-CO₂ with or without co-solvent ethanol in two post-extraction separators by changing the temperature in the range of subcritical CO₂ level at a constant pressure; to characterize the composition of the obtained fractions.

3. To evaluate the possibilities of fractionation of higher polarity non soluble in supercritical CO₂ constituents from defatted cranberry pomace by pressurized liquid extraction with the green solvents ethanol and water. To optimize the process of pressurized liquid extraction with ethanol by using CCD-RSM and to characterize the obtained extracts.

4. To characterize the phytochemical composition, anticancer, antiviral and antimicrobial properties of the polar extracts obtained by pressurized liquid extraction and to quantify individual anthocyanins.

5. To evaluate the antioxidant potential of lipophilic, ethanol and water extracts and extraction residues by various *in vitro* methods.

6. To test the applicability of the ethanol extract additive in pork meat products by investigating its effect on the growth of selected food pathogenic microorganisms, lactic acid bacteria (LAB) and aerobic mesophilic bacteria (AMB) and determine the effect on the antioxidant capacity, physico-chemical and sensory characteristics.

Scientific novelty

1. The concept of the biorefining of cranberry pomace into lipophilic and hydrophilic fractions by using high pressure technologies with green solvents such as supercritical fluid extraction with carbon dioxide (SFE-CO₂) and pressurized liquid extraction (PLE) has been applied for the first time; it was comprehensively evaluated for the isolation of high added value functional ingredients. The parameters of multistep high pressure separation scheme (SFE-CO₂ and PLE) were optimized for obtaining the highest yields.

2. This study has reported for the first time the fractionation of berry pomace lipophilic substances by the on-line SFE-CO₂ (with and without co-solvent ethanol), which resulted in the separation of the different classes of lipids by

applying low ($< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatures in the 1st separator for precipitating heavier lipophilic fractions. Moreover, it was shown that different classes of lipophilic compounds which are present in cranberry pomace may be pre-concentrated by using fractionation at freezing temperatures.

3. The polar extracts of cranberry pomace have been tested and evaluated against the Zika virus infection for the first time.

4. The effect of defatted cranberry pomace extracts (ethanol and water), consecutively isolated by pressurized solvents has been tested for the first time on the growth of selected pathogenic and spoilage bacteria in their cultures or in meat products (slurry, burgers and ham) for controlling their stability and for the evaluation of their sensory properties.

Practical significance of the thesis

In the process of juice production, a large amount of by-products including berry pomace is accumulated and usually discarded as waste. The application of high pressure extraction techniques (SFE-CO₂ and PLE) with mathematical modeling tools for cranberry pomace process optimization helped to achieve high efficiency of the recovery of bioactives. The fractionation of cranberry pomace extract by online SFE-CO₂ allows redistributing different classes of lipids (tocopherols, phytosterols, etc.) between separators and thus achieving fractions with superior composition. The extracts obtained by using innovative high pressure extraction methods were used for meat products. This method may be considered as a promising way of increasing the oxidative and microbiological stability of a product.

Publication of the research results

The results of this research have been presented in 3 publications included in the list of the Clarivate Analytics Web of Science database and reported at 6 international conferences and 2 national conferences.

Structure and content of the dissertation

The dissertation is written in English. It involves of a list of abbreviations, an introduction, a review of the most relevant literature, materials and methods, a chapter covering the results and discussion, a conclusion, a list of references (in total, 275 references were used), and a list of publications on the topic of the dissertation. The final work contains 145 pages including 25 tables and 33 figures.

Key points of the thesis

1. The application of consecutive extraction with supercritical CO₂ and pressurized liquid extraction with higher polarity solvents allows isolating valuable fractions which possess strong antioxidant, antimicrobial and antiviral activity and a high concentration of bioactives from cranberry pomace; whereas,

modeling of SFE-CO₂ and PLE extraction by applying the response surface methodology when using the face-centered central composite design is an effective method to determine the optimal extractions parameters.

2. The application extraction at the supercritical solvent state and fractionation at subcritical CO₂ parameters is an effective method for obtaining higher specificity cranberry pomace fractions with higher concentrations of various classes of lipophilic compounds.

3. Polar extracts of defatted cranberry pomace isolated by pressurized liquid extraction may contain a promising additive for the improvement of the safety and quality of meat products as well as a bioactive ingredient with antiviral potential.

CONCLUSIONS

1. The conditions for supercritical fluid extraction with carbon dioxide have been optimized, and the highest cranberry pomace oil yield (11.10 g oil/100 g DW) was obtained at 42.4 MPa pressure and 53 °C temperature in 158 min of extraction. The extraction rate was 4 times faster comparing with the traditional extraction (Soxhlet). The extract of cranberry pomace is rich in monosaturated (21.79 g/100g oil) and polyunsaturated (69.58 g/100g oil) fatty acids.

2. It has been found that, by modifying the supercritical extraction solvent and changing the parameters of the system separators, it is possible to produce fractions of lipophilic substances of various compositions. Fractionation of cranberry pomace with pure supercritical CO₂ determined a higher yield in the 1st separator (5.93–6.86%), while the addition of ethanol increased the content of the extract in the heavier fraction (6.05% and 6.21%) at 0 and -10 °C, but, at -20 and -30 °C, it remarkably increased in the lighter fraction (7.91–8.18%). Lighter fractions (especially with EtOH) possessed a significantly ($p < 0.05$) higher antioxidant capacity measured by the L-ORAC assay. There are no remarkable differences between the fractions in TAGs and the composition of fatty acids. The highest amount of squalene (4.51–12.09%) from cranberry pomace was achieved in the heavier fraction at all the test temperatures and after adding 5% of ethanol. The concentration of microcomponents, including phytosterols, tocopherols and volatile aroma compounds, was remarkably higher in the lighter fractions, especially in the case of SC-CO₂/EtOH.

3. Pressurized liquid extraction (PLE) may be applied for the isolation of polyphenols from defatted cranberry pomace. The optimal conditions to obtain the highest yield (55.89%) were 3 extraction cycles, 15 min each, at the temperature of 83 °C with EtOH. The results of the PLE-EtOH process in the range of 50–90 °C (temperature) and 5–15 min (extraction time) during 3 cycles showed the highest TPC (43.43 mg GAE/g E), ABTS•+ (179.0 mg TE/g E) and ORAC (270.2 mg TE/g E) values of extracts at the highest temperature (90 °C). The highest PAC values were obtained when each cycle time was 15 min at 70 °C and 90 °C, 225.2 and 220.2 mg/g E, respectively. Higher anthocyanin recovery was at 50 °C, when

increasing the extraction cycle time from 5 to 10 min, 97.10 vs 183.6 mg/100g DW, respectively. The remaining residue after PLE with EtOH was further extracted with water at 130 °C (3 extraction cycles, 10 min each) and yielded 6.50%.

4. Peonidin-3-galactoside and peonidin-3-arabinoside were quantitatively the major anthocyanins in PLE-EtOH (94.36 and 67.79 mg/100g, respectively) and PLE-H₂O (0.96 and 0.86 mg/100g, respectively) extracts. Phytochemical analysis showed that mallic, quinic and citric acids, procyanidin B3 and quercetin-hexoside were identified in both extracts. The ethanol extract did not possess strong anticancer properties against human colon cancer cells (HCT-116 and DLD-1) and antiviral properties against the Zika virus. The water extract efficiently inhibited Zika virus infection on human lung A549 cells and was not cytotoxic *in vitro* and *in vivo*.

5. The extracts isolated from defatted cranberry pomace were remarkably stronger antioxidants when using ORAC, TPC and ABTS^{•+} assays comparing to the lipophilic extracts obtained by SFE-CO₂ and Soxhlet extraction. The extract isolated with water had a stronger antioxidant capacity by all *in vitro* assays than the extract obtained with ethanol. TPC, ORAC and ABTS^{•+} values obtained in the water extract were 188.9 mg GAE/g of extract, 1084 and 362.6 mg TE/g of extract, while, in the ethanol extract, the values were 52.98 mg GAE/g of extract, 130.4, 345 mg TE/g of extract, respectively. The antioxidant potential of the cranberry pomace evaluated by the QUENCHER method was approximately the same after removing the lipophilic fraction, but remarkably decreased (by 95–97% comparing with the initial values) after the application of polar solvents (ethanol and water); it suggests that a considerable amount of antioxidants was efficiently recovered from cranberry pomace after extractions.

6. Cranberry pomace extracts (ethanol and water) effectively inhibited the growth of undesirable microorganisms (foodborne pathogens and meat spoilage causing bacteria). When higher concentrations (6.6% and 3.3%) were used, these bacteria were not detected at all. The ethanol extract was also very effective in pork slurry, burgers and ham against all the tested bacteria. The addition of the extract inhibited from 5 to 7 times the formation of malondialdehyde (a lipid oxidation product) comparing with the control sample without the extract during prolonged storage of pork burgers. The effect of the ethanol extract on other quality characteristics of meat products was not as significant as the effect on the color characteristics. The values of the redness (a*) of meat products with the extract were 2 times higher than the control sample without the extract. In addition, the extract affected the sensory evaluation of burgers and cooked ham only negligibly.

UDK 542.61 + 582.688.3](043.3)

SL344. 2020-11-24, 3 leidyb. apsk. l. Tiražas 50 egz. Užsakymas 255.

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

