



VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

BIOLOGIJOS KATEDRA

Goda Vaškevičiūtė

**FERMENTINĖS HIDROLIZĖS ĮTAKOS AUGALINIŲ PRODUKTŲ
BIOLOGINIAM AKTYVUMUI ĮVERTINIMAS**

Bakalauro baigiamasis darbas

Biotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6121FX008

Biotechnologijų studijų kryptis

Vadovas (-ė) – doc. dr. Vilma Kaškonienė _____

(Moksl. Laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Apginta: prof. dr. Saulius Mickevičius _____

(Fakulteto/studijų instituto dekanas/direktorius)

(Parašas)

(Data)

Kaunas, 2021

Darbas atliktas: 2020-2021m. Vytauto Didžiojo universitete, GMF Instrumentinės analizės atviros prieigos centre.

Recenzentas: Vaida Tubelytė

Darbas ginamas: nuotoliniame viešame bakalauro darbų gynimo komisijos posėdyje 2021 metų birželio 11 dieną.

Protokolo Nr.

Darbo vykdytojas: Goda Vaškevičiūtė _____ (Parašas)

Mokslinio darbo vadovas (-ė): doc. dr. Vilma Kaškonienė _____ (Parašas)

Biologijos katedros vedėjas: prof. habil. dr. Algimantas Paulauskas _____ (Parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	5
ABSTRACT	6
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Biologiškai aktyvių junginių ekstrahavimas.....	8
1.2 Fermentinės hidrolizės nauda	9
1.3 Fenoliniai junginiai ir jų kvalifikacija	10
1.3.1 Fenolinių junginių pasiskirstymas įvairiose augalų dalyse	12
1.4 Flavanoidai ir jų struktūra.....	12
1.5 Antimikrobinis aktyvumas augaluose.....	13
1.6 Antioksidacinis aktyvumas augaluose	14
1.7 Fermentų klasifikacija, veikimo principas ir biologinis pritaikymas	15
1.7.1. Fermentų pavadinimai ir klasifikacija.....	15
1.7.2. „Fermento struktūra ir rišimasis su substratu“	16
1.8 Augalinių medžiagų fermentinė hidrolizė	17
1.8.1 Paragvajinio bugienio arbata.....	17
1.8.2. Geltonasis lubinas	18
1.8.3. Drugių žirnis ir fenoliniai junginiai.....	19
1.9 Ispaninio šalavijo sėklos, jų panaudojimas ir nauda žmogui.....	20
1.9.1 Ispaninio šalavijo sėklų nauda žmogaus sveikatai	22
1.9.2 Ispaninio šalavijo sėklų panaudojimas maisto produktuose	23
1.10 Ispaninio šalavijo sienelės suardymo būdai.....	24
2. TYRIMO OBJEKTAI IR METODAI	26
2.1 Tyrimo objektai.....	26
2.2 Medžiagos ir tirpikliai.....	27
2.3 Naudota aparatūra ir prietaisai	27
2.4 Ispaninio šalavijo sėklų ekstraktų paruošimas.....	28
2.3. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas.....	29
2.4. Bendrojo flavonoidų kiekio nustatymas	29

2.5. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas	30
2.7. Statistinė duomenų analizė	31
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	32
3.1 Bendrojo fenolinių junginių kiekio įvertinimas	32
3.2 Bendrojo flavonoidų kiekio įvertinimas	35
3.3 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas augaluose	38
IŠVADOS	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS	42
PADĖKA	49

SANTRAUKA

Bakalauro darbo autorius :	Goda Vaškevičiūtė
Bakalauro darbo pavadinimas:	Fermentinės hidrolizės įtakos augalinių produktų biologiniam aktyvumui įvertinimas
Vadovas(-ė):	doc. dr. Vilma Kaškonienė
Darbas pristatytas:	Vytauto Didžiojo Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Kaunas, 2021 06 11
Puslapių skaičius:	48
Lentelių skaičius:	8
Paveikslų skaičius:	16
Priedų skaičius:	0

Sėklos yra vertingas produktas dėl savo sudėtyje esančių biologiškai aktyvių medžiagų. Tačiau, žmogaus organizmas dėl sudėtingos sėklų ląstelės sienelės struktūros, šias medžiagas įsisavina sunkiai. Taigi, norint padidinti ir optimizuoti biologinį prieinamumą yra ieškoma pačių tinkamiausių būdų polifenolinių junginių ekstrakcijai atlikti. Šio darbo tikslas buvo įvertinti ir palyginti skirtingais fermentais apdorotų sėklų biologinį aktyvumą. Fenolinių junginių kiekiai, išsiskyrusių flavanoidų kiekiai bei antioksidacinis aktyvumas turėjo būti nustatyti naudojant spektrofotometrinius Folin-Ciocalteu, $AlCl_3$ kolorimetrinį ir DPPH radikalo surišimo metodus, tačiau dėl COVID-19 pandemijos šie tyrimai nebuvo atlikti. Išanalizavus literatūros šaltinius, galima teigti, jog fermentinė hidrolizė padidina fenolinių junginių bei antioksidacinį ir radikalų pašalinimo aktyvumą su DPPH laisvuju radikalu. Fermentinis ekstrahavimas įrodo savo efektyvumą, padidindamas polifenolio kiekį ekstraktuose. Polifenoliai yra atsakingi už antioksidacinį aktyvumą. Apdorojus žaliavas fermentais padidėja biologiškai aktyvių medžiagų kiekis. Tikėtina, kad visi išanalizuoti literatūroje rasti duomenys pasižymėtų panašiomis savybėmis ir rezultatais šiame darbe.

ABSTRACT

Author of Master Thesis: Goda Vaškevičiūtė

Fulltitle of Master Thesis: Evaluation of the influence of enzymatic hydrolysis on the biological activity of plant products

Supervisor: doc. dr. Vilma Kaškonienė.

Presented at: Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, Kaunas, 2021 06 11

Number of pages: 48

Number of tables: 8

Number of pictures: 16

Number of pictures: 0

Seeds are a valuable product due to their biologically active substances. However, due to the complex structure of the seed cell wall, human body are difficult to absorb these substances. Thus, in order to increase and optimize bioavailability, the most suitable methods for the extraction of polyphenolic compounds are being sought. The aim of this study was to evaluate and compare the biological activity of seeds treated with different enzymes. Phenolic levels, flavanoids released, and antioxidant activity were to be determined using Folin-Ciocalteu spectrophotometric, $AlCl_3$ colorimetric, and DPPH radical scavenging methods, but these studies were not performed due to the COVID-19 pandemic. Analyzing the literature, it can be stated that enzymatic hydrolysis increases the antioxidant and radical scavenging activity of phenolic compounds with DPPH free radical. Enzymatic extraction proves its effectiveness in increasing the polyphenol content in the extracts. Polyphenols are responsible for antioxidant activity. Treatment of raw materials with enzymes increases the amount of biologically active substances. It is likely that all the analyzed data found in the literature would have similar properties and results in this work.

IVADAS

Sėklos yra puikus baltymų ir sveikųjų riebalų šaltinis. Kiekvienam sveiką mitybą propaguojančiam žmogui, rekomenduojama sėklas įtraukti į kasdieninį maisto racioną, nes jos, kaip augalinis maistas, aprūpina mūsų organizmą energija, kurioje gausu maistinių medžiagų. Ispaninio šalavijo sėklų, paragvajinio bigienio arbatos, geltonojo lubino sėklų bei drugių žirnio nauda sveikatai daugiausia siejama su natūraliai esančiais fenoliniais junginiais, flavanoidų bei antioksidantų išsiskyrimu, kurie yra plačiai paplitę augaluose. Fenoliniai junginiai yra didžiausia funkcinų junginių grupė, kuriai tenka didžioji antioksidacinio aktyvumo dalis, esanti augaluose ir augaliniuose produktuose. Flavanoidai dalyvauja augalų reakcijose į sunkias aplinkos sąlygas ir veiksmingai reguliuoja ląstelių diferenciaciją bei augimą. Augaluose dauguma jų funkcijų yra susijusios su stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Antioksidantas apibrėžiamas kaip bet kuri kita medžiaga, kuri atitolina arba slopina tikslinės molekulės oksidacinį pažeidimą. Pagrindinė antioksidanto savybė yra jo sugebėjimas sulaikyti laisvuosius radikalus, o antioksidaciniai junginiai, pašalina laisvuosius radikalus. Fenoliniai junginiai, flavanoidai bei antioksidantai suteikia didelės naudos tiek žmogaus organizmui, tiek augalams.

Tačiau, išgauti ir pasisavinti minėtoje žaliavoje esančias vertingas ir naudingas medžiagas yra sudėtinga dėl ląstelės sienelės struktūros. Norint ją suardyti ir padidinti bioaktyvių junginių išgavą, bei antioksidacinį ir antimikrobinį aktyvumą alternatyva tampa – fermentinė hidrolizė. Pagal Alasuvanto ir kt. (2017), gali būti naudojami ir kiti fermentiniai, fizikiniai, cheminiai bei mechaniniai metodai. Pinelo ir kt. (2006) teigia, jog pastaruoju metu fermentinis ekstrakcijos metodas vertinamas kaip alternatyva kitiems metodams, dėl būtent aplinkosauginių aspektų, tokių kaip - cheminių medžiagų vartojimo mažinimas. Vykiant ekstrakciją, reikia parinkti tinkamus fermentus bei žinoti tiriamo objekto ląstelės sienelės struktūrą. Mūsų duomenimis, tyrimų naudojant komercinius fermentus su ispaninio šalavijo, geltonojo lubino sėklomis, paragvajinio bigienio arbata ar drugių žirniu dar trūksta, kad būtų galima juos efektyviai pritaikyti.

Darbo tikslas: įvertinti ir palyginti skirtingais fermentais apdorotų tiriamųjų sėklų biologinį aktyvumą.

Uždaviniai:

1. Nustatyti fenolinių junginių kiekius tiriamosiose sėklose, veikiant skirtingais fermentais.
2. Nustatyti flavonoidų kiekius skirtingais fermentais apdorotų tiriamųjų sėklų ekstraktuose.
3. Įvertinti tiriamosiose sėklose antioksidacinį aktyvumą prieš ir po apdoravimo fermentais.

Tyrimo hipotezė: Apdorojus sėklas fermentais padidėja biologiškai aktyvių medžiagų kiekis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biologiškai aktyvių junginių ekstrahavimas

Ekstrahavimas yra pagrindinis žingsnis išskiriant biologiškai aktyvius junginius iš augalinių medžiagų ir tinkamas sąlygų pasirinkimas, įskaitant tinkamą techniką ir tirpiklį, leidžia gauti didelio aktyvumo produktus. Tačiau bioaktyvių junginių ekstrahavimo išeiga yra maža dėl sudėtingų ląstelių sienelių polisacharidų, tokių kaip alginatas ir karageninas. Didelis įvairių polisacharidų kiekis ląstelių sienelėje trukdo tirpikliui patekti į bioaktyvius junginius. Paprastai ląstelių sienelės yra sudarytos iš sudėtingų biopolimerų, tokių kaip celiuliozė, hemiceliuliozė, ligninas ir pektinas (Sasidharan ir kt., 2010). Ekstrahavimo metodų įvairovė, leidžia sėkmingai pasirinkti tą, kuris leis išskirti pasirinktus junginius iš mėginio su numatyta išeiga, ir tada juos nustatyti naudojant tinkamą analizės metodiką. Tačiau pagrindinis ekstrahavimo proceso klausimas yra tinkamo tirpiklio pasirinkimas. Tirpiklio tipas lemia išskyrimo efektyvumą ekstrahavimo proceso metu, o didžiausią efektyvumą galima pasiekti tuo momentu, kai pasirinktas tirpiklis konkrečiai sąveikauja su ekstrahuojamais junginiais. Galutinai pasirinkus tam tikrą ekstrahavimo metodą, reikėtų stengtis naudoti kuo mažiau reagentų ir vengti naudoti toksiškus reagentus. Todėl, palyginti su įprastais ekstrahavimo metodais, pirmenybė teikiama pagreitintam tirpiklio ekstrahavimui, ekstrakcijai ultragarsu arba superkritiniais skysčiais. Dėl vis griežtesnės aplinkos apsaugos taisyklių ir šiuolaikinių tendencijų, apibrėžtų vadinamaisiais „žaliosios chemijos principais“, superkritinių skysčių gavyba įgijo ypatingą susidomėjimą tarp ekstrahavimo būdų. „Idealiu“ ekstrahavimui yra būdingas kinetinis ir didelę išeigą turintis, kiekybinis ekstrahuotų medžiagų išgavimas, kurio proceso metu medžiagos nedegraduojama, o naudojamą tirpiklį reikia lengvai atskirti nuo tirpinio. Klasikiniai ekstrahavimo metodai, kurie iki šiol buvo naudojami išskiriant organinius junginius, dažnai užima daug laiko ir reikalauja daug toksiškų tirpiklių, tokių kaip dichlormetanas ar metanolis, naudojimo. Todėl technika, kuri yra artima „idealui“, yra dinamiškai plėtojama kuo didesne apimtimi. Superkritinis skysčių išgavimas tapo įdomia alternatyva klasikiniams technikoms, ypač augalinių medžiagų atveju. Be to, didėjantis susidomėjimas natūraliais produktais daro superkritinį skysčių išgavimą pagrindine ekstrahavimo technika dirbant su šiais produktais (Huie, 2002). Li ir kt. (2004) teigia, jog ekstrahavimo efektyvumą lemiantis mechanizmas yra medžiagos, išgaunamos iš augalinės medžiagos vidaus, o paskui iš fazių kontaktinio paviršiaus, masę transportuojant į tirpiklį. Svarbus vaidmuo ekstrahavimo procese yra atsparumas masės perdavimui, susijęs su specifine ekstrahuotų junginių vieta ir žaliavos struktūra. Šiuo metu manoma, kad bioaktyvūs junginiai yra susieti su ląstelių sienelių polimerais dėl daugelio silpnų sąveikų, tokių kaip vandenilio jungtys ar hidrofiliškos

sąveikos, todėl juos sunku išplauti naudojant įprastus ekstrahavimo metodus. Polisacharidų, tokių kaip celiuliozė, pektinas ir hemiceliuliozė, buvimas sumažina įprastų ekstrahavimo metodų ekstrahavimo efektyvumą. Įdomus metodas, leidžiantis išsiskirti analizuojamiems junginiams, yra fermentų naudojimas augalų ląstelių sienelėms ardyti. Ląstelių sienelių vientisumo suardymas, naudojant skirtingus fermentus, siekiant padidinti bioaktyvių augalų komponentų izoliaciją ir taip pagerinti ekstrahavimo efektyvumą. Fermentai, tokie kaip celiuliozė, β -gliukozidazės ir pektinazės, naudojami augalų ląstelių sienelių komponentų hidrolizei ir skaidymui. Fermentinių procesų efektyvumas labai priklauso nuo naudojamo fermento ar fermentų mišinio tipo ir optimalių jų veikimo sąlygų (pH, joninės jėgos, temperatūros) pasirinkimo. Todėl būtų naudinga atlikti naujus veiksmingus ir selektyvius tyrimus, skirtus didesniam bioaktyvių medžiagų išgavimui, ypač iš augalų, kuriuose ląstelių sienelė gali būti fizinis barjeras, užkertantis kelią efektyviam ekstrahavimui. „Yerba mate“ ir geltonojo lubino - dvi svarbios augalų rūšys farmacijos ir papildų pramonės požiūriu (Sieprawskaet ir kt., 2020).

1.2 Fermentinės hidrolizės nauda

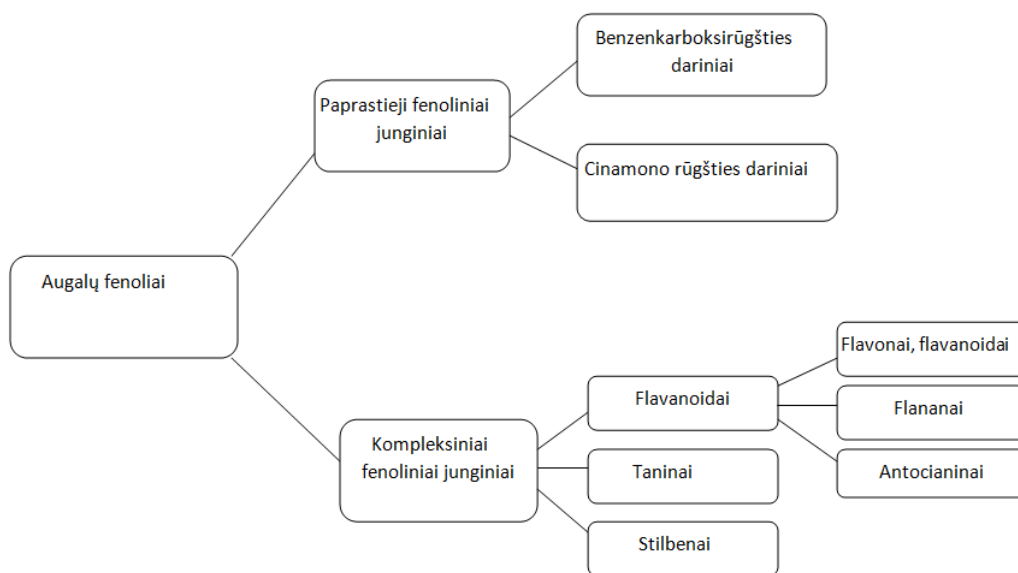
Augaluose ir dumbliuose yra naujų terapinių galimybių turinčių biologinių junginių. Šie junginiai arba įterpiami į ląstelės sienelės matricą, arba sujungiami su polimerais ląstelių citoplazmoje, o tai trukdo išskirti bioaktyvius junginius ekstrahavimo metu. Fermentinė ląstelių sienelių ir citoplazmos polimerų hidrolizė padidina biologinių junginių išsiskyrimą ir išsaugo jų biologinę galią. Fermentinė hidrolizė yra efektyviausias ir patikimiausias būdas bioaktyvių peptidų gamybai dėl jos produktyvumo ir reakcijos laiko. Fermentinės hidrolizės metu bioaktyviems peptidams gaminti galima naudoti daugiau nei vieną fermentą. Fermentus galima pridėti nuosekliai arba vienu metu, priklausomai nuo tinkamos temperatūros, pH ir hidrolizės trukmės (Axelsson, 2011). Pagal Brethauer ir Wyman (2009) šiuos fermentus, iš esmės proteinazes, galima suskirstyti pagal veikimo mechanizmą, kurį jie demonstruoja kaip egzo arba endoproteinazes. Egzopeptidazės išskiria vienintelę aminorūgštį arba trumpus peptidus iš pagarindinių baltymų, o endoproteinazės skaido baltymus ir išskiria peptidus. Po hidrolizės atliekamas procesas, siekiant atskirti suardytus peptidus nuo medžiagos (Brok ir kt., 2019). Fermentinė hidrolizė baltymams atstatyti yra sudėtingas procesas, nes fermentams būdingos reakcijos nutraukia skirtingus peptidinius ryšius. Fonkwe ir Singh (1996) pasiūlė, kad geresnis regeneruotų baltymų funkcionalumas paprastai priklauso nuo temperatūros, pH, maišymo, proteazės specifiškumo, fermento ir substrato koncentracijos bei santykio tarp dviejų paskutinių parametų.

Taigi apibendrinant, fermentinė hidrolizė yra paprastas, efektyvus metodas, kurio sąlygos yra lengvesnės. Vykstant fermentinei hidrolizei Axelsson (2011) teigia, jog išgauti baltymai yra nesunaikinami. Tai turi tam tikrų pranašumų, palyginti su tradiciniu rūgščių ir šarmų ekstrahavimo

metodu, kai baltymai gaunami iš paukštienos atliekų: kolageniniai, nekolageniniai ir kiti baltymai (pvz., kraujas ir kaulų čiulpai) būtų hidrolizuojami, o tai padidintų baltymų išeigą ir sumažintų susidarančių atliekų tūrį.

1.3 Fenoliniai junginiai ir jų kvalifikacija

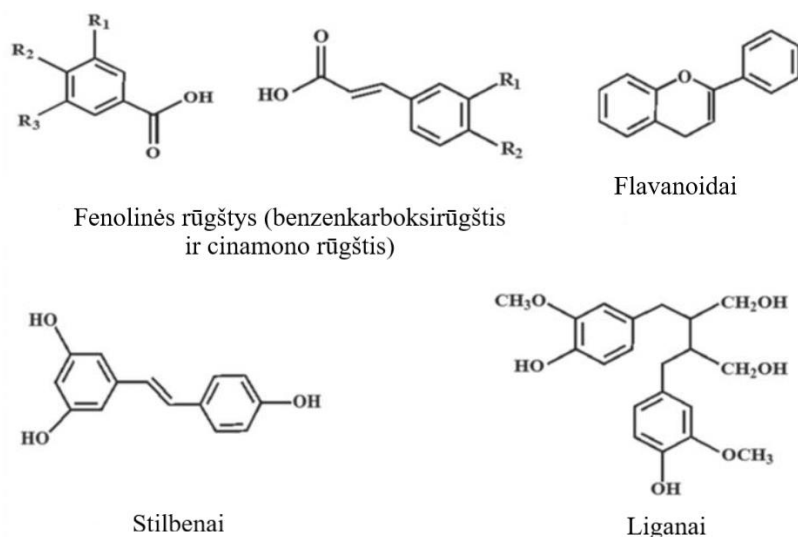
Fenoliniai junginiai – antriniai augalų metabolitai, turintys bendrą aromatinį žiedą, turintį vieną ar daugiau hidroksilo grupių. Iki šiol buvo nustatyta daugiau nei 8000 natūralių fenolinių junginių. Iš augalų šaltinių išskirti fenoliniai junginiai yra paprasti fenoliai, flavonoidai, ligninai ir lignanai, taninai, ksantonai ir kumarinai. Žinoma, kad šie fenoliniai junginiai pasižymi stipriu priešvėžiniu aktyvumu ir kovoja su įvairiomis ligomis, susijusiomis su oksidaciniu stresu. Tyrimai parodė, kad dietinių fenolių poveikis sveikatai yra dėl jų gebėjimo rodyti antioksidacinį, priešuždegiminį ir antiklastogeninį poveikį. Hidroksilo grupių įtraukimas į fenilo žiedą yra pagrindinis fenolinių rūgščių biosintezės etapas. Dėl heterogeninių šių fenolinių rūgščių struktūrų, kurios svyruoja nuo mažos molekulinės masės vieno aromatinio žiedo struktūros iki didelės molekulinės masės polimerinių junginių, jas galima plačiai suskirstyti į paprastus ir sudėtingus fenolius (1 pav.) (Gowdaet ir kt., 2016).



1 pav. Augalų fenolinių junginių klasifikacija pagal jų struktūrą. Šaltinis: Gowdaet ir kt. 2016 (taikytas vertimas EN-LT)

Augalų fenoliniai junginiai iš esmės yra klasifikuojami, kaip paprastieji ir kompleksiniai fenoliniai junginiai. Paprastieji fenoliniai junginiai klasifikuojami kaip benzenkarboksirūgšties ir cinamono rūgšties dariniai, o kompleksiniai fenoliniai junginiai klasifikuojami į flavonoidus, taninus ir stilbenus. Benzenkarboksirūgščių ir cinamono rūgščių junginiuose yra karboksilo grupė, prijungta prie benzeno žiedo, prie kurio prijungta viena ar daugiau hidroksi arba metoksi grupių. Be to, cinamono

rūgštys turi neprisotintą propiono rūgšties šoninę grandinę, pritvirtintą prie benzeno žiedo. Kompleksiniai fenoliniai junginiai yra didesnės molekulinės masės junginiai. Šios fenolinės rūgštys dažniausiai randamos ląstelių vakuolėse. Taninai ir flavonoidai yra geriausi kompleksinių fenolių, esančių tarp vaisių ir daržovių, pavyzdžiai. Flavonoidai yra sudaryti iš 2 fenolio žiedų, prie kurių yra prisijungęs prisotintas deguonis, turintis heterociklinių pirano žiedų. Dėl deguonies turinčio pirano žiedą flavonoidai skirstomi į: antocianinus, flavonus, flavanolių ir kt. Didelis sudėtingumas pasiekiamas dėl šių molekulių acetilavimo ar glikozilinimo su gliukoze (Anantharajuet ir kt., 2016). Polifenoliai yra antriniai augalų metabolitai ir paprastai dalyvauja ginantis nuo ultravioletinių spindulių ar patogenų agresijos. Maiste polifenoliai gali prisidėti prie kartumo, sutraukimo, spalvos, skonio, kvapo ir oksidacinio stabilumo. XX a. pabaigoje epidemiologiniai tyrimai ir susijusios metaanalizės primygtinai leido manyti, kad ilgalaikis augalų polifenolių turinčių dietų vartojimas apsaugojo nuo vėžio, širdies ir kraujagyslių ligų, diabeto, osteoporozės ir neurodegeneracinių ligų vystymosi. Įvairiose augalų rūšyse nustatyta daugiau nei 8000 polifenolinių junginių. Visi augaliniai fenoliniai junginiai susidaro iš bendro tarpinio produkto – enilalanino arba artimo pirmtako – šikimo rūgšties. Jie dažnai siejami su kitais junginiais, tokiais kaip karboksirūgštys ir organinės rūgštys, aminorai, lipidai, ir ryšys su kitais fenoliniais junginiais. Polifenoliai gali būti klasifikuojami į skirtingas grupes, atsižvelgiant į juose esančių fenolio žiedų skaičių ir remiantis struktūriniais elementais. Pagrindinės klasės apima fenolinės rūgštis, flavonoidus, stilbenus ir lignanus. 2 paveiksle pavaizduotos skirtingos polifenolių grupės ir jų cheminė struktūra, o 3 paveiksle parodyta fenolinių junginių kvalifikacija (Pandeyet ir kt., 2009).



2 pav. Skirtingos polifenolių grupės ir jų cheminė struktūra. Šaltinis: Pandeyet ir kt., 2009 (taikytas vertimas EN-LT)

Fenoliniai junginiai yra kvalifikuojami į kelias sritis (3 pav.) :



3 pav. Fenolinių junginių kvalifikacija. Šaltinis: Robardset ir kt., 1999 (taikytas vertimas EN-LT)

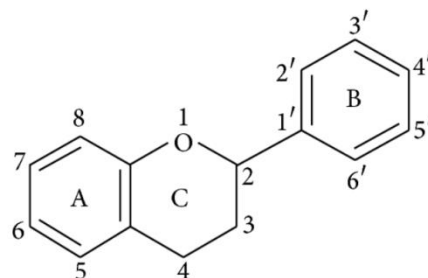
1.3.1 Fenolinių junginių pasiskirstymas įvairiose augalų dalyse

Fenolinės rūgštys yra plačiai paskirstę įvairiose augalų dalyse, įskaitant šaknis, lapus, vaisius ir daržoves. Pagal Anantharajuet ir kt. (2016), kavos rūgštis yra labiausiai paplitusi fenolinė rūgštis, plačiai randama vaisiuose, o ferulo rūgštis randama sėklos apvalkalo, sėlenų ir vaisių ląstelių sienelėse. Augalų lapuose ir stiebuose yra didesnis fenolinių rūgščių kiekis, o skirtingos rūšys pastebimai skiriasi. Pavyzdžiui, kompleksinių polifenolių yra ląstelių vakuolėse, lapo audiniuose, epidermyje, žieduose ir vaisiuose. Taip pat žievėse, medienos ir vaisių ankštyse gausu taninų, o gėlėse yra daugiau flavonoidų. Augalų fenolinės rūgštys yra neatsiejama mūsų mitybos dalis, todėl joms skiriamas pagrindinis dėmesys. Pavyzdžiui, grūdai, sėklos, ankštiniai augalai, sojos pupelės, kava, arbata, rozmarinas ir čiobreliai, kurie yra plačiai naudojami mūsų mitybos racione, yra gausūs fenolinių rūgščių šaltiniai. Anantharajuet ir kt. (2016) tyrimas parodė, kad galo rūgštis yra dažniausia fenolinė rūgštis, randama tarp vaisių, daržovių, kaštonų ir žaliųjų cikorių.

1.4 Flavonoidai ir jų struktūra

Flavonoidai yra plačiai paplitę polifenoliniai antriniai metabolitai, turintys biologinį aktyvumą augaluose ir naudingi žmonių sveikatai. Jie dalyvauja augalų reakcijose į sunkias aplinkos sąlygas ir veiksmingai reguliuoja ląstelių diferenciaciją bei augimą. Augaluose dauguma jų funkcijų yra susijusios su stipriomis antioksidacinėmis savybėmis (Khalidet ir kt., 2019). Kaip teigia Kumar ir kt., (2013) flavonoidai yra natūralių junginių grupė, turinti kintančią fenolio struktūrą ir randama augaluose. 1930 m. iš apelsinų buvo izoliuota nauja, nežinoma medžiaga. Tuo metu buvo manoma, kad tai yra naujos grupės vitaminai ir ji buvo paskirta kaip vitaminas P. Vėliau paaiškėjo, kad ši medžiaga buvo flavonoidas (rutinas) ir iki šiol buvo nustatyta daugiau nei 4000 flavonoidų rūšių. Chemiškai flavonoidai yra sudaryti iš penkiolikos anglies skeletu, susidedančiu iš dviejų benzeno žiedų (A ir B, kaip parodyta 4 paveiksle), sujungtų per heterociklinį pirano žiedą (C). Jie gali būti suskirstyti į įvairias klases, tokias kaip flavonai (pvz., flavonas, apigeninas ir luteolinas), flavonoliai (pvz., kvercetas, kaempferolis, myricetas

irfisetinas), flavanonai (pvz., flavanonas, hesperetinas ir naringeninas) ir kiti. Įvairios flavonoidų klasės skiriasi C žiedo oksidacijos lygiu ir substitucijos modeliu, o atskiri klasės junginiai skiriasi A ir B žiedų pakeitimo modeliu.



4 pav. Cheminė flavonoidų struktūra. Šaltinis: Kumar ir kt., 2013

Flavonoidai atsiranda kaip aglikonai, glikozidai ir metilinti dariniai. Pagrindinė flavonoidų struktūra yra aglikonas (4 pav.). Šešių narių žiedas, kondensuotas kartu su benzeno žiedu yra α -pironas (flavonoliai ir flavanonai), arba jo dihidroderatyvas (flavonoliai ir flavanonai). Benzenoido pakaitalo padėtis padalija flavonoidų klasę į flavonoidus (2 padėtis) ir izoflavonoidus (3 padėtis). Flavonoliai skiriasi nuo flavanonų pagal hidroksilo grupę 3 padėtyje ir C2 – C3 dvigubą jungtį (Kumar ir kt., 2013). Flavonoidai atlieka įvairią biologinę veiklą augaluose, gyvūnuose ir bakterijose. Augaluose jau seniai žinoma, kad flavonoidai yra sintetinami tam tikrose vietose ir yra atsakingi už gėlių žiedų spalvą ir aromatą, vaisiai - dėl to, kad pritrauktų apdulkintojus, sėkloms ir sporoms, kad padėtų dygti, o daigams, jog augtų ir vystytųsi. Flavonoidai apsaugo augalus nuo skirtingų biotinių ir abiotinių veiksnių ir veikia kaip unikalūs ultravioletiniai filtrai, veikia kaip signalo molekulės, alopatiniai junginiai, fitoaleksinai, detoksikuojančios medžiagos ir antimikrobiniai gynybiniai junginiai. Flavonoidai yra atsparūs šalčiui, sausrai ir gali atlikti funkcinį vaidmenį augalų šilumos aklimatizacijai (Panche ir kt., 2016).

1.5 Antimikrobinis aktyvumas augaluose

Kaip teigia Nascimento (2000), daugelis augalų yra naudojami dėl jų antimikrobinų savybių, kurios atsiranda dėl augalo apykaitoje sintetinamų junginių. Šie produktai yra žinomi dėl savo veikliųjų medžiagų, pavyzdžiui, fenolinių junginių, kurie yra eterinių aliejų dalis, taip pat iš taninų.

Pagal Harbone (1983) ir Wagner ir kt. (1984) metodiką buvo naudojami dešimties augalų etanoliniai ekstraktai. Augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas buvo tirtas prieš Gram(+) ir Gram(-) bakterijas. Septyniuose iš augalų (baziliko, gvazdikėlio, melisos, rozmarino, šalavijo, čiobrelis ir kraujažolės) pagrindinė veiklioji medžiaga buvo eteriniai aliejai, o kituose trijose (gvajavos, džambolano ir granato) buvo didelis taninų kiekis. Išskyrus gvazdikėlius, visi kiti augalai turintys eterinių aliejų savo sudėtyje buvo auginami iš sėklų. Augalų ekstraktų antimikrobinis poveikis buvo tirtas su *Staphylococcus*

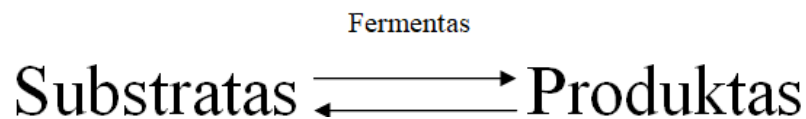
aureus, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* bakterijų kultūromis. Visos naudotos bakterijų padermės parodė jautrumą augalams per 24 valandas, o didžiausiu jautrumu pasižymėjo *Candida albicans* (Nascimento, 2000).

1.6 Antioksidacinis aktyvumas augaluose

Augalams nepalankios sąlygos, tokios kaip ekstremali temperatūra, sausra, sunkieji metalai, maistinių medžiagų trūkumas ir didelis druskingumas, sukelia didelę reaktyviųjų deguonies rūšių (ROS) koncentraciją, kuri gali sukelti oksidacinį stresą. Norint to išvengti, ląstelės turi kompleksinę antioksidacinę sistemą su fermentiniais ir nefermentiniais elementais. Nefermentinės sistemos molekulėse yra skirtingi veikimo mechanizmai, pavyzdžiui, fermentų slopinimas, mikroelementai dalyvaujantys gaminant laisvuosius radikalus, chelatai, reaktyviųjų rūšių įsisavinimas ir aktyvinimas arba padidinta apsauga naudojant kitas antioksidacines gynybas (Barua ir kt., 2014). Tarp šių molekulių junginiai, gauti iš antrinės apykaitos, ypač fenoliniai junginiai, atlieka pagrindinį vaidmenį prieš oksidacinį stresą (Pang ir kt., 2018). Pasak, Nićiforović ir kt., (2010) žinoma, kad šie junginiai veikia kaip antioksidantai ne tik dėl jų gebėjimo atiduoti vandenilį ar elektronus, bet ir dėl to, kad jie yra stabilūs radikalūs tarpiniai produktai. Alesiani ir kt. (2010) teigia, jog fenoliniai junginiai yra svarbūs ne tik dėl didelės įtakos juslinėms vaisiaus savybėms (spalvai, kvapui ir skonui), bet ir dėl antioksidacinių, antikarcinogeninių, antimikrobinių, antialerginių, antimutageninių ir priešuždegiminių savybių. Todėl daugelio augalų vaidmuo ligų prevencijoje iš dalies siejamas su jų sudedamųjų dalių fenolinių junginių antioksidacinėmis savybėmis (Scalbert ir Williamson, 2000). Neseniai fenoliniai junginiai Rice-Evans ir kt. (1996) tyrime *in vitro* buvo laikomi galingais antioksidantais ir pasirodė esant stipresni antioksidantai nei vitaminai C ir E bei karotinoidai. Fenoliniai junginiai taip pat turi apsauginį poveikį žmonėms, kai augalai vartojami kaip maistas (Nićiforović ir kt., 2010). Kaip teigia Chaves ir kt. (2020) paprastai antioksidacinis fenolinių junginių kiekis augalų ekstraktuose yra veiksmingas esant mažoms koncentracijoms, o žmonėms jis yra susijęs su širdies ir kraujagyslių ligų bei vėžio prevencija. Pagal Yamagishi ir Matsui (2011) antioksidantas gali būti plačiai apibrėžtas kaip bet kuri medžiaga, kuri atitolina arba slopina tikslinės molekulės oksidacinį pažeidimą. Pagrindinė antioksidanto savybė yra jo sugebėjimas sulaikyti laisvuosius radikalus, o antioksidaciniai junginiai, tokie kaip fenolinės rūgštys, polifenoliai ir flavonoidai, pašalina laisvuosius radikalus, tokius kaip peroksidas, hidroperoksidas ar lipidinis peroksilas, ir taip slopina oksidacinius mechanizmus, kurie sukelia degeneracines ligas, teigia Wu ir kt. (2011). Žoliniai augalai nuo senų laikų laikomi geru antioksidantu (Pour ir kt., 2012).

1.7 Fermentų klasifikacija, veikimo principas ir biologinis pritaikymas

Fermentai yra biologiniai katalizatoriai (dar vadinami biokatalizatoriais), kurie pagreitina gyvų organizmų biochemines reakcijas. Jie taip pat gali būti išgaunami iš ląstelių ir paskui naudojami katalizuojant įvairius komerciškai svarbius procesus. Pavyzdžiui, jiems tenka svarbus vaidmuo gaminant saldikius ir modifikuojant antibiotikus, jie naudojami skalbimo milteliuose ir įvairiuose valymo produktuose, jie vaidina svarbų vaidmenį atliekant analitinius prietaisus ir tyrimus, kurie gali būti naudojami klinikoje, kriminalistikoje ir aplinkoje. Žodį „fermentas“ pirmą kartą pavartojo vokiečių fiziologas Wilhelmas Kühne'as 1878 m., aprašydamas mielių gebėjimą gaminti alkoholį iš cukrų, ir jis yra kilęs iš graikų kalbos žodžių *en* (reiškiantis „viduje“) ir *zume* („mielės“) (Trevan, 2015). Kaip katalizatoriai, fermentai reikalingi tik labai mažomis koncentracijomis ir jie pagreitina reakcijas, patys jų nevertodami. Fermentus paprastai apibūdiname kaip gebančius katalizuoti substrato molekulių virsmą produkto molekulėmis taip (5 pav.):



5 pav. Fermentas gebantis katalizuoti substrato molekulių virsmą produkto molekulėmis Robinson, 2015 (taikytas vertimas EN-LT)

Be to, kad fermentai yra labai stiprūs katalizatoriai, jie taip pat pasižymi nepaprastu specifiskumu, nes jie paprastai katalizuoja tik vieno tipo (arba daugiausia įvairių panašių tipų) substrato molekulių pavertimą produkto molekulėmis (Robinson, 2015).

1.7.1. Fermentų pavadinimai ir klasifikacija

Fermentai paprastai turi bendrinius pavadinimus (dažnai vadinamus „trivialiais pavadinimais“), kurie nurodo jų katalizuojamą reakciją su priesaga –azė (pvz., oksidazė, dehidrogenazė, karboksilazė), nors atskirų proteolitinių fermentų galūnė paprastai yra -in (pvz., tripsinas, chimotripsinas, papainas). Dažnai trivialus pavadinimas taip pat nurodo substratą, kuriame veikia fermentas (pvz., gliukozės oksidazė, alkoholio dehidrogenazė, piruvatodekarboksilazė). Tačiau kai kurie nereikšmingi pavadinimai (pvz., invertazė, diastazė, katalazė) pateikia mažai informacijos apie substratą, produktą ar dalyvaujančią reakciją (1 lentelė) (Trevan, 2015).

1 lentelė. Fermentų kvalifikacija: pagrindinės fermentų klasės EC sistemoje. Šaltinis: Trevan, 2015

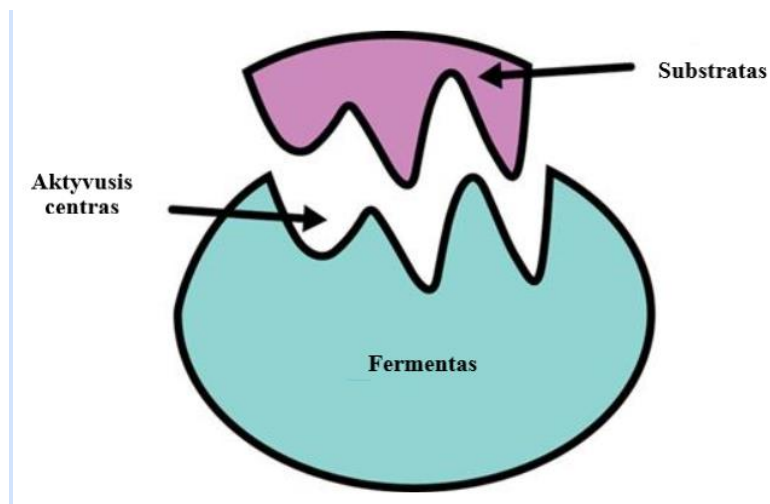
Skaičius nurodantis reakcijos tipą	Fermento klasė	Reakcijos tipas
1.	Oxidoreductazės	Oksidacija/redukcija

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

2.	Transferazės	Atomo/grupės pernešimas (įskaitant ir kitas klases)
3.	Hidrolazės	Hidrolizė
4.	Liazės	Grupės pašalinimas (įskaitant ir 3.)
5.	Isomerazės	Isomerazė
6.	Ligazės	Molekulių sujungimas, susijęs su pirofosfato jungties nutrūkimu

1.7.2. „Fermento struktūra ir rišimasis su substratu“

Amino rūgšties pagrindu pagaminti fermentai yra kamuoliniai baltymai, kurių dydis svyruoja nuo mažesnių nei 100 iki daugiau kaip 2 000 aminorūgščių liekanų. Šios aminorūgštys gali būti išdėstytos kaip viena ar kelios polipeptidinės grandinės, kurios yra sulankstytos ir sulenktos. Suformuotos specifinės trimatės struktūros, apimančios mažą plotą, vadinamą aktyvią vietą (6 pav.), kur substratas iš tikrųjų jungiasi. Aktyvioje vietoje gali būti tik nedidelis skaičius (mažiau nei 10) sudedamųjų aminorūgščių.



6pav. Substrato prisijungimo prie fermento molekulės aktyviosios vietos vaizdavimas. Šaltinis: Vallard, 2019 (taikytas vertimas EN-LT)

Tai yra aktyvios vietos forma ir krūvio savybės, leidžiančios jai prisijungti prie vieno tipo substrato molekulės, todėl fermentas gali parodyti savo katalizinio aktyvumo specifiškumą. Pagrindinis mechanizmas, kuriuo fermentai katalizuoja chemines reakcijas, prasideda nuo substrato (ar substratų) prisijungimo prie aktyvios fermento vietos. Aktyvioji vieta yra specifinis fermento regionas, jungiantis su substratu (6 pav.). Substrato prisijungimas prie fermento sukelia elektronų pasiskirstymo pokyčius cheminėse substrato jungtyse ir galiausiai sukelia reakcijas, dėl kurių susidaro produktai. Produktai išsiskiria iš fermento paviršiaus, kad fermentas atsinaujintų kitam reakcijos ciklui. Aktyvioji vieta turi

unikalią geometrinę formą, kuri papildo substrato molekulės geometrinę formą, panaši į dëlionės detalių tinkamumą. Tai reiškia, kad fermentai specifiškai reaguoja tik su vienu ar labai keliais panašiais junginiais (Pollack ir kt., 1986). Hipotezę, kad fermentų specifiškumas atsirado dėl papildomo substrato ir jo aktyviosios vietos pobūdžio, 1894 m. pirmą kartą pasiūlė vokiečių chemikas Emilis Fischeris ir ji tapo žinoma kaip „Fischer“ „užrakto ir rakto hipotezė“, kai tik tinkamo dydžio ir forma (substratas) telpa į spynos (fermento) rakto skylę (aktyviojoje vietoje) (Takamine, 1894). Reikėtų paminėti, kad nors daugelį fermentų sudaro tik baltymai, daugelyje jų taip pat yra nebaltyminio komponento, žinomo kaip kofaktorius, kuris yra būtinas fermento kataliziniam aktyvumui. Kofaktorius gali būti kitoje organinėje molekulėje, tokiu atveju jis gali būti kofermentu, arba gali būti neorganinė molekulė, paprastai metalo jonas, pavyzdžiui, geležis, manganas, kobaltas, varis ar cinkas. Kofermentas, tvirtas ir nuolatinis prisijungimas prie baltymo, paprastai fermento protezo grupė, teigia Vellard (2003).

1.8 Augalinių medžiagų fermentinė hidrolizė

1.8.1 Paragvajinio bugienio arbata

Augalai yra neribotas biologiškai aktyvių junginių šaltinis. Farmacijos, kosmetikos ir net maisto pramonėje, iš jų gauti produktai yra naudojami vis dažniau. Didžiausia augalų bioaktyvių junginių grupė yra polifenoliai, pasižymintys antibakterinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis, todėl juos galima naudoti kaip natūralius kosmetikos ir maisto produktų konservantus. Jie gali padidinti savo mikrobiologinę saugą ir pailginti galiojimo laiką. Be to, plėtojant ekologišką kosmetikos ir maisto pramonę ateityje bus kur kas plačiau naudojami natūralūs augalinės kilmės konservantai, tačiau ypač svarbu, kad jų būtų gaunama ir aplinkai nekenksmingu būdu. Vienas iš pavyzdžių - „Yerba mate“, dar kitaip žinomas – paragvajinio bugienio arbatos antpilas, pagamintas iš medžio *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. lapų, žinomas ir paruoštas guaranių genties Paranos baseine, siekiant sumažinti nuovargį, mieguistumą, atpalaiduoti protą ir numalšinti alkį (7 pav.) (Anetaet ir kt., 2020).

Svarbiausi paragvajinio bugienio savybes lemiantys junginiai pirmiausia yra polifenolio junginiai ir purino alkaloidai. Įrodyta, kad jų kiekis užpiluose yra didesnis nei žaliosios ir juodosios arbatos. Daugiausiai polifenolių yra kofeino rūgštyje ir jos dariniuose, chlorogeno rūgštyje, kaempferolyje, kvercitrine, kvercitinino rūgštyje, rutine, chinino rūgštyje ir galo rūgštyje. Savo ruožtu pagrindiniai purino alkaloidai yra kofeinas (0,4-1,8 %) ir teobrominas (0,15-0,8 %). Be to, šis gėrimas yra turtingas mineralinių druskų šaltinis, turintis kalio, magnio ir mangano. Bioaktyvių junginių kiekis lemia šios rūšies augalų antioksidacines, priešuždegimines, antibakterines, priešvėžines savybes. Medžiagos, daugiausia atsakingos už „Yerba mate“ specifinį skonį, yra kartūs, vandenyje tirpūs saponinai. *Ilex paraguariensis* lapuose yra rasta 1,2 % saponino. Dėl to, kad paragvajinis bugienis

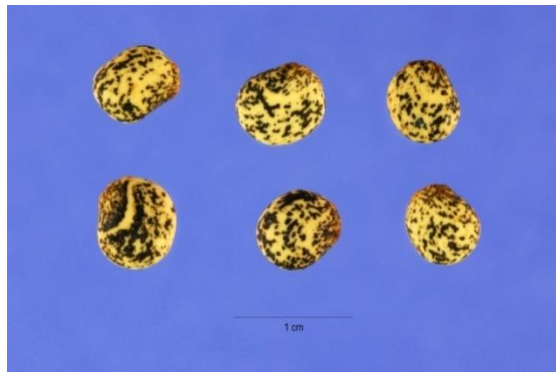
pasižymi dideliu antioksidaciniu potencialu ir dideliu bioaktyvių junginių kiekiu, todėl yra naudojamas maisto papilduose (Burriss ir kt., 2012).



7 pav. Paragvajinio bugienio arbata. Šaltinis: Krishna, 2017

1.8.2. Geltonasis lubinas

Lupinus luteus L., žinomas kaip geltonasis lubinas, yra vienmetė augalų rūšis iš *Fabaceae L.* šeimos. Dėl mažo kenksmingų alkaloidų kiekio dar vadinamas saldžiuoju valgomuoju lubinu. Lenkijoje geltonasis lubinas pirmiausia naudojamas kaip sodo augalas, rečiau - kaip ūkinių gyvūnų pašaras, tuo tarpu Vakarų Europoje jis tampa vis svarbesniu kaip valgomasis augalas žmogaus mityboje. Jis dažnai naudojamas kaip virimo grūdas, gaminant lubinų miltus ir puikų priedą be glitimo diabetu sergančių žmonių ar sveikimo laikotarpių žmonių mityboje (Wasilewkoet ir kt., 1998).



8 pav. Geltonojo lubino (*Lupinus luteus L.*) sėklos. Šaltinis: Heuze V., 2018

Geltonųjų lubinų sėklos (8 pav.) yra gausus baltymų (38-50 %) ir riebalų (5-20 %) šaltinis. Be to, jose yra daugybė amino rūgščių, ypač arginino, taip pat antioksidantų (polifenolių). Taipogi, verta paminėti, kad didelis skaidulų kiekis ir žemas glikemijos indeksas (naudojamas gliukozės kiekiui kraujyje įvertinti nurijus) yra papildomas augalo pranašumas. Justynaet ir kt. (2019) ankstesni tyrimai parodė, kad ekstraktas iš daiginto geltonojo lubino turi antibakterinių savybių, neparodydamas citotoksiškumo.

1.8.3. Drugių žirnis ir fenoliniai junginiai

Clitoria ternatea L., paprastai žinoma kaip drugių žirnis, yra daugiamecis atogrąžų ankštinis augalas, priklausantis *Fabaceae* šeimai (9 pav.). *C. ternatea* augalas yra viena iš keturių tradicinių žolelių, kuri buvo naudojama ajurvedos medicinoje, o drugių žirnių mėlynos gėlės šimtmečius buvo naudojamos kaip natūralus maisto dažiklis daugelyje Azijos virtuvių. Teigiama, kad įvairių augalų dalių ekstraktai turi daugybę farmakologinių veiklų, įskaitant antioksidacinę, antidiabetinę ir hepatoprotektyvų poveikį. Ši drugių žirnių nauda sveikatai daugiausia siejama su natūraliai esančiais fenoliniais junginiais, kurie yra plačiai paplitę ir visame augale. Fenoliniai junginiai yra didžiausia funkcinių junginių grupė, kuriai tenka didžioji antioksidacinio aktyvumo dalis, esanti augaluose ir augaliniuose produktuose. Jų redoksinės savybės vaidina gyvybiškai svarbų vaidmenį skaidant peroksidus, šalinant pavienius ir trigubus oksigenus, be to, adsorbuojant ir neutralizuojant laisvuosius radikalus (Akbar, 2020). Hidroksilo grupės padėtis ir skaičius reguliuoja fenolinių junginių antioksidacinį aktyvumą. Flavonoidai yra didžiausias glikozidų arba laisvos būsenos fenolinių junginių klasteris. Pranešama, kad dėl stiprios antioksidacinės veiklos jie atideda arba užkerta kelią keliems sunkiems ir degeneraciniams negalavimams - įskaitant senėjimą, artritą, atminties praradimą, kataraktą, insultą, vėžį, širdies ir kraujagyslių ligas bei Alzheimerio ligą. Be to, flavonoidų gamyba reaguojant į mikrobu sukeltą infekciją buvo nustatyta kaip veiksminga augalų apsaugos strategija. Šių medžiagų antimikrobinis aktyvumas priklauso nuo jų gebėjimo formuoti kompleksus su tirpiaisiais ir tarpląsteliniiais baltymais, bakterijų ląstelėmis ir membranomis.



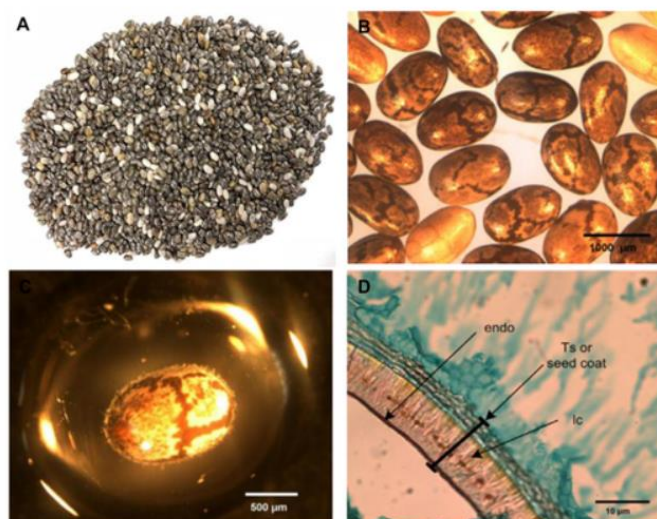
9 pav. Drugių žirnis (*Clitoria ternatea L.*). Šaltinis: Conway, 2001

Be funkcinių junginių, augaliniai peptidai sulaukia dėmesio kaip funkcinių ingredientų kandidatai. Augaliniai peptidai yra specifiniai baltymų fragmentai, kurie daro naudingą poveikį įvairiose srityse. Šie bioaktyvūs peptidai turi daug fiziologinių funkcijų, įskaitant antioksidacinę, antimikrobinę ir antihipertenzinę aktyvumą. Jie jau gali būti gauti natūraliai arba gali būti gaunami apdorojant cheminiu

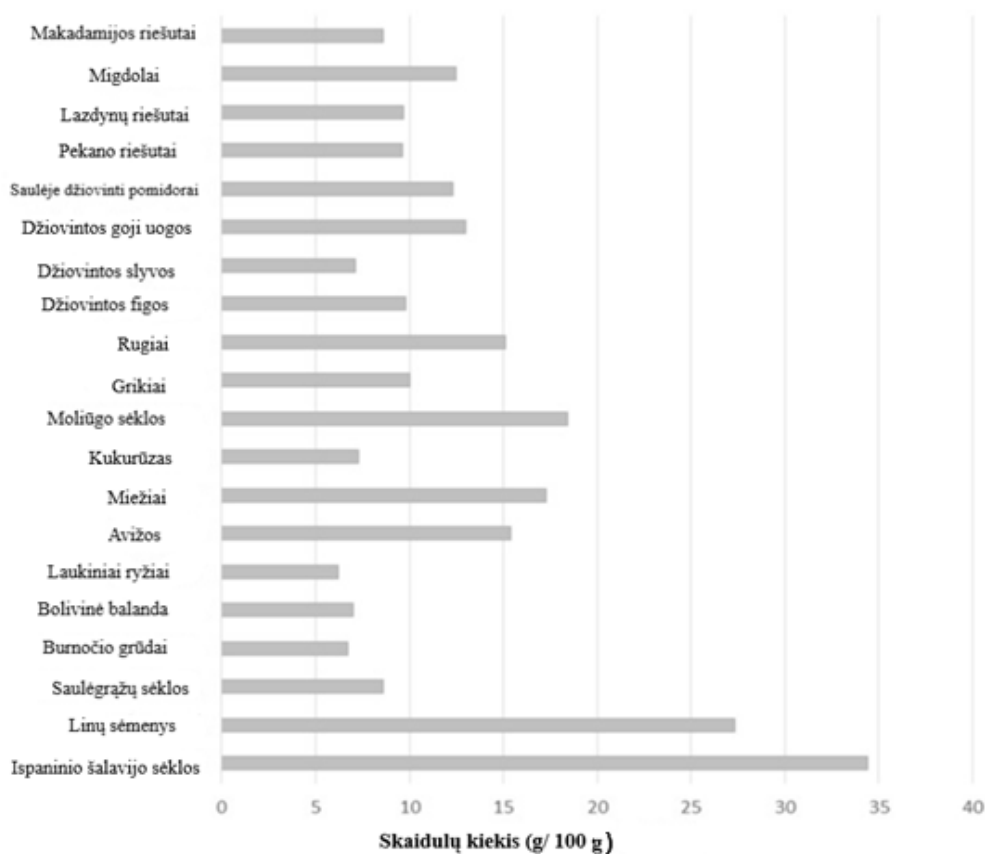
ar biologiniu būdu. Pranešama, kad proceso apdorojimas, toks kaip terminis apdorojimas ir fermentinė hidrolizė, sustiprina funkcinių junginių, baltymų ir peptidų išsiskyrimą (Abreu ir kt., 2013). Saikingas terminis apdorojimas, pavyzdžiui, virimas ir skrudinimas, gali suardyti sudėtingas struktūras, padidinti bioaktyvių komponentų prieinamumą ir gaminti naujus junginius, dėl to paveikti jų funkcines savybes. Be to, ankštinių augalų sėklų ekstraktuose paprastai atliekama bromelaino ir tripsino hidrolizė. Bromelainas pasižymi plačiu baltymų skilimo specifiškumu ir yra stabilus plačiame pH diapazone (pH 4-8). Paprastai baltymų vietas jis suskaido argininu, lizinu, tirozinu, glutamo rūgštimi, glicinu, ornitinu, metioninosulfoksidu ir alaninu, tačiau skilimo specifiškumą gali pakeisti pH pokytis. Fermentuose hidrolizuotos, keptos drugių žirnių sėklos galėtų būti naudojamos kaip pridėtinės vertės ingredientai, siekiant pagerinti bendrą maisto produktų kokybę ir funkcionalumą (Oguiset ir kt., 2019).

1.9 Ispaninio šalavijo sėklos, jų panaudojimas ir nauda žmogui

Ispaninio šalavijo sėklos priklauso *Lamiaceae* (*Mint*) šeimai, tai valgomosios *Salvia lamiacea* - šalavijų šeimos žydinčio augalo sėklos, gimtoji šalis Meksika ir Šiaurės Gvatemala, žydi vasaros sezono metu. Ispaninio šalavijo sėklos yra vienmetis žolinis augalas, kurio sėklos buvo vartojamos jau prieš tūkstančius metų. Dabartiniai tyrimų rezultatai rodo didelę ispaninio šalavijo sėklų maistinę vertę ir patvirtina jų plačias sveikatai skatinančias savybes bei rodo, kad ispaninio šalavijo sėklų komponentams yra būdingas teigiamas poveikis kraujo lipidų kiekio pagerėjimui dėl jų hipotenzinio, hipoglikeminio, antimikrobinio ir imunostimuliuojančio poveikio. Ispaninio šalavijo sėklos priklauso funkcinių ingredientų grupei, jos turtingos omega-3 ir omega-6 riebalų rūgštimis, angliavandeniais, antioksidantais, kalciumu, baltymais, skaidulinėmis medžiagomis, vitaminais ir mineralais. Jos taip pat išsiskiria plataus vartojimo galimybėmis, tai kasdien valgomas maistas, kuris be savo mitybinės vertės dar turi papildomą fiziologinį bei profilaktinį poveikį žmogaus organizmui ir sveikatai (Zakarauskas, 2017). Chia yra plokščios bei ovalo formos sėklos, kurių dydis yra labai mažas, gaunamos iš ispaninio šalavijo augalo. Šios sėklos būna įvairių spalvų: nuo baltos iki rudos ar juodos, taip pat jos yra 2,0-2,5 mm ilgio, 1,2-1,5 mm pločio ir 0,8-0,10 mm storio (Coates, 2011). Subrendusių ispaninio šalavijo sėklų epidermio ląstelėse yra gleivių, kurios liečianti su vandeniu, nedelsiant išsiplečia (10 pav.). Plyšus pirminiam ląstelių sluoksniui, išsikišusiam iš epidermio ląstelių, sėkla padidėja bei tampa gleivėta, slidi ir lipni (Muñoz ir kt., 2012). Pagal maistinių skaidulų kiekį ispaninio šalavijo sėklos viršija džiovintų vaisių, grūdų ar riešutų kiekį (11 pav.).



10 pav. Ispaninio šalavijo sėklos. A) pilno dydžio sėklos; B) visa sausa sėkla (apytikslis vaizdas); (C) visa sėkla, hidratuota aplink gleivinės kapsulę; D) sėklos vidus: pastebimi trys stačiakampių ląstelių sluoksniai, sudarantys sėklos apvalkalą; endo: endokarpo sluoksnis; lc: skleroidinis sluoksnis. Šaltinis: Muñoz ir kt., 2012



11 pav. Įvairių maisto produktų, maistinių skaidulų kiekio palyginimas. Šaltinis: Kulczynski ir kt., 2019 (taikytas vertimas EN-LT)

Šiomis sėklomis pradėta domėtis dėl nepakeičiamųjų baltymų (15-25 %), riebalų (30-33 %), angliavandenių (26-41 %), maistinių skaidulų (18-30 %), mineralų (4-5 %), vitaminų ir sausųjų medžiagų

(90-93 %) bei didelio kiekio antioksidantų (Ixtainaa ir kt., 2008). Kaip teigia Kulczynski ir kt. (2019), šiose sėklose yra apie 30-34 g maistinių skaidulų, kurių netirpi frakcija sudaro maždaug 85-93 %, o tirpių maistinių skaidulų maždaug 7-15 %.

1.9.1 Ispaninio šalavijo sėklų nauda žmogaus sveikatai

Ispaninio šalavijo sėklos turi teigiamos įtakos ir žmogaus sveikatai, jos padeda apsisaugoti nuo tam tikrų ligų, pavyzdžiui diabeto, epilepsijos, įvairių uždegiminių ligų, širdies-kraujagyslių, reumato, išsėtinės sklerozės, psichikos sutrikimų, depresijos, artrito, astmos, vaikų ligų, viršsvorio. Ispaninio šalavijo sėklos naudojamos ne tik maisto pramonėje, bet ir kosmetikoje (Vuksan ir kt., 2010). Šios sėklos turi daug įvairių teigiamų, naudingų maistinių savybių. Daugeliu būdų reguliariai valgant ispaninio šalavijo sėklas galima pagerinti sveikatą. Teigiama, kad svarbiausia ispaninio šalavijo sėklų nauda, tai, kad jos pasižymi dideliu antioksidantų kiekiu, kurie neutralizuoja laisvuosius radikalus. Jie gali sustabdyti laisvųjų radikalų atsiradimą arba gali nutraukti šių radikalų oksidavimo reakcijas ir taip sumažinti laisvųjų radikalų daromą žalą žmogaus organizmo ląstelėms. Taip pat, antioksidantai padeda pagreitinti odos atstatymo sistemą, sulėtina senėjimo procesą. Ispaninio šalavijo sėklos gali padėti išvengti pirmalaikio odos senėjimo, kuris atsiranda dėl laisvųjų radikalų daromos žalos (Marthaet ir kt., 2012).

Linolo riebalų rūgštis, kuri padeda organizmui įsisavinti riebaluose tirpius vitaminus A, D, E ir K, gausiai randama sėklose, reguliuoja cholesterolio kiekį ir mažina kraujo spaudimą, tai sėklų gebėjimas panaikinti uždegimą ir naudinga gydant širdies ligas. Teigiama, jog sėklas labai naudinga vartoti turintiems širdies sutrikimų. Ispaninio šalavijo sėklose yra daug polinesočiųjų riebalų rūgščių, ypač omega-3, olinoleno rūgštis (2 lentelė). Norint pasiekti didžiausią naudą gerai sveikatai palaikyti reikia susidaryti tinkamą mitybos planą, remiantis 2 lentelės duomenimis. Patiriamas didesnis baltymų, mažesnis sočiųjų riebalų vartojimas ir omega-3 riebalų rūgščių suvartojimas. Šių riebalų rūgščių suvartojimas skatina širdies ir kraujagyslių ligų profilaktiką (Zakarauskas, 2017).

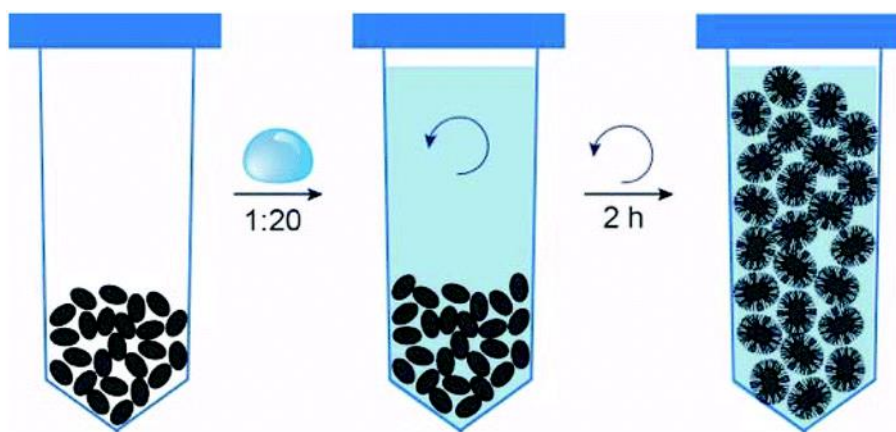
Mažytėje ispaninio šalavijo sėkloje yra pakankamai didelis sveikųjų riebalų kiekis, daugiau omega-3 riebiųjų rūgščių nei laišoje. Omega-3 veikia profilaktiškai nuo uždegimų, sumažina kraujo spaudimą ir saugo nuo blogojo cholesterolio, visa tai prisideda prie širdies apsaugojimo (Ayerza ir kt., 2002). Remiantis Zakarausku (2017) uždegiminiai procesai gali paveikti kraujagyslių funkcijas ir sukelti širdies ligas. Ispaninio šalavijo sėklos turtingos kalciu, jose 18 % kalcio rekomenduojamos paros normos žmogui. Kalcis ypatingai svarbus kaulams, nes padeda išlaikyti kaulų masę ir stiprumą. Sėklų sudėtyje taip pat yra boro, kuris yra svarbus kaip maistinių medžiagų šaltinis kaulams. Verta paminėti, jog ispaninio šalavijo sėklos yra vienos iš geriausių augalinių baltymų šaltinių.

2 lentelė. Lipidų ir riebalų rūgščių kiekis ispaninio šalavijo sėklose (*Salvia Lamiacea*). Šaltinis: Zakarauskas, 2017

PAVADINIMAS	G/100 G
Lipidai	34,39
Sotieji riebalai	9,74
Palmitino rūgštis(C16: 0)	6,69
Margarino rūgštis(C17: 0)	0,06
Stearino rūgštis(C18: 0)	2,67
Mononesočiųjų riebalų	10,76
Polinesočiųjų riebalų	79,47
Linolo rūgštis(C18: 2Ω-6)	17,36
Linolenorūgštis(C18: 3, Ω-3)	62,02
Nesočiųjų riebalų	90,26

1.9.2 Ispaninio šalavijo sėklų panaudojimas maisto produktuose

Dažniausiai ispaninio šalavijo (*Salvia lamiacea*), dar kitaip vadinamo chia, sėklos yra auginamos komerciniais tikslais. Chia sėklos - įvairių amino rūgščių ir antioksidantų šaltinis, jos gali būti panaudojamos kaip stabilizatoriai ir emulsikliai. Ispaninio šalavijo sėklos gali būti valgomos žalios kaip ir daugelis sėklų, o išmirkusios įgauna želatinos tekstūros pavidalą ir dėl šios savybės yra naudojamos maisto ir gėrimų gamyboje, dėl išskirtinės gelio tekstūros. Sėklos yra hidrofiliškos, mirkant sugeria skysčius iki 12 kartų daugiau nei jų svoris (12 pav.).



12 pav. Ispaninio šalavijo sėklų hidrofiliškumas (Ispaninio šalavijo sėklos: vanduo)(*Salvia Lamiacea*). Šaltinis: Brutschet ir kt., 2019

Ispaninio šalavijo sėklos yra naudojamos įvairių kepinų gamyboje, tokių kaip duonos, pyragų ar sausainių gaminime. Pagal Castro (2003), ispaninio šalavijo sėklos, yra turtingos omega – 3 riebalų rūgštimis ir kitais funkcionaliais komponentais, būtent dėl to, tai suteikia joms populiarumą ir panaudojimą maisto pramonėje. Mažose ispaninio šalavijo sėklose yra 5-6 % gleivių, kurios gali būti

panaudojamos kaip maistinės skaidulos. Remiantis Muñoz, Cobos ir kt. (2012) tyrimais, chia sėklyčių gleivės geba perimti didesnę svorį negu pati sėkla. Tyrimuose buvo naudota 100 mg gleivių, kurios absorbuoja 2,7 g vandens. Grigelmo Miguel ir Martín-Belloso (1998), pateikė išvadą, jog kuo didesnis tirpus maistinių skaidulų kiekis tuo ji padidina vandens sulaikymo pajėgumą. Teigiama, kad storosios žarnos bakterijos, kurios pasižymi aukštu vandens sulaikymu ir turi galimybę formuoti drebučių masę, lengvai fermentuoja tirpias maistines skaidulas, o tai lėtina skrandžio ištuštinimą ir padidina virškinimo trakto turinio klampumą.

Apibendrinant galima teigti, jog ispaninio šalavijo sėklos yra turtingos baltymais, lipidais ir kitais naudingais pluoštais, lyginant su kitomis sėklomis. Taip pat, šios sėklos pasižymi turinčios didelį kiekį fenolinių junginių su antioksidaciniu poveikiu, o tai patvirtina, jog ispaninio šalavijo sėklos gali turėti teigiamą poveikį sveikatai, kai jos yra panaudojamos praturtinti maisto produktus gamybos pramonėje. Kaip teigia Zakarauskas (2017), ispaninio šalavijo sėklų maistinės sudėties įvairovė, gali padėti pakeisti valgymo įpročius, subalansuoti sveiką mitybą ir turėti pridėtinę vertę maisto produktų ruošime.

Viena iš svarbiausių funkcinių savybių, kodėl pramonėje yra naudojamos ispaninio šalavijo sėklos, tai būtent juslinių savybių išlaikymas. Buvo atliktas tyrimas, tiriant juslinių savybių naudą, kuriame buvo palyginta ispaninio šalavijo sėklų, aliejaus, bei kiaušinių poveikis duonos gamyboje. Atlikus tyrimą išaiškėjo, jog duonos produktai pagaminti su ispaniniu šalaviju, savo sudėtyje turėjo daugiau baltymų (25-30 %), palyginti su kitais duonos gaminiais, kuriuose buvo naudojami aliejus ir kiaušiniai (21 %). Taip pat, duonos gaminiai, į kuriuos buvo pridėta ispaninio šalavijo, turėjo kur kas daugiau maistinių skaidulų (4-5 proc.), negu duona su aliejumi ir kiaušiniais (1-2 proc.). Šis tyrimas parodo, kad produktas gali išlaikyti, ne tik juslines savybes, bet ir būti naudingas ir funkcionalus vartotojų sveikatai ir gerai savijautai (Puiget ir kt., 2011). Brutsch ir kt. (2019) teigia, jog pagrindinis ispaninio šalavijo sėklų panaudojimo tikslas pramonėje - palaikyti šviežumą, juslines ir funkcines savybes, kurios turėtų teigiamą poveikį vartotojų sveikatai ir mitybos naudai bei praturtinti maisto produktus sudėties įvairove.

1.10 Ispaninio šalavijo sienelės suardymo būdai

Salvijos sėklų rūšyse yra antiseptinių savybių turintis monoterpenas. Naujausių šios rūšies tyrimų metu pastebėta, kad junginiai sumažina DNR sintezę ląstelėje (Ayerza ir kt., 2011). Pagal Betancur-Ankona ir kt. (2004), salvijos rūšys yra naudojamos liaudies medicinoje visame pasaulyje, jos turi antibakterines, antioksidacines, antidiabetines ir priešnavikines savybes. Atsižvelgiant į tai, kad ląstelių sienelę sudaro celiuliozė, hemiceliuliozė, pektinas ir baltymai, taip pat fenoliniai junginiai, susieti su

turimais polisacharidais su vandenilio ir hidrofobinėmis jungtimis, įvairūs fermentai, tokie kaip celiuliozės, pektinazės ir hemiceliuliozės, gali būti naudojami kaip hidrolizuojančios medžiagos, sunaikinti ląstelių sienelių struktūrą. Šie fermentai taip pat gali būti naudojami siekiant padidinti ląstelių sienelių įsiskverbimo potencialą, dėl kurio išsiskiria fenoliniai junginiai ir padidėja bioaktyvių junginių ekstrahavimo išeiga (Ixtaina ir kt., 2008). Kitas mechanizmas, kurį aprašė Fernández ir kt. (2015), yra tiesioginis fermento veikimas skaidant esterių ar eterių ryšius tarp fenolinių junginių ir augalų ląstelių sienelių polimerų. Pektinazė sukelia pektino pasislinkimą ar suskaidymą, dėl ko sunaikinama ląstelės sienelė ir palengvėja fenolinių junginių išsiskyrimas.

2. TYRIMO OBJEKTAI IR METODAI

2.1 Tyrimo objektai

Tyrimai vykdyti 2020-2021 metais, VDU Gamtos mokslų fakultete, instrumentinės analizės atviros prieigos centro laboratorijose. Tyrimo planas pateiktas 13 paveiksle.

Ispaninio šalavijo sėklos buvo įsigytos dvejose vietose - UAB Lirola, kilmės šalis: Argentina/Paragvajus ir UAB Riešutai jums, kilmės šalis: Uganda, Paragvajus, Meksika, Bolivija, Peru, Argentina. Žaliavos įsigytos 2020 metais, rugsėjo mėnesį, chiaseklos.lt ir riesutajums.lt internetinėse parduotuvėse. Prieš tyrimą sėklos buvo laikomos sausoje vietoje, kambario temperatūroje.



13 pav. Eksperimento planas

2.2 Medžiagos ir tirpikliai

Ispaninio šalavijo ekstraktuose esančių bioaktyvių junginių analizei naudoti reagentai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Analizei naudoti reagentai

Tirpiklis/ Reagentas	Gamintojas/ Kilmės šalis
Bidistiliuotas vanduo	Vandens valymo sistema Firstream™Cyclon™, Anglija
Fermentas <i>Clara- Diastase</i>	Sigma – Aldrich, JAV
Fermentas <i>pektinazė</i> iš <i>Aspergillus niger</i>	Sigma, Vokietija
Fermentas <i>Viscozyme L</i>	Sigma, Vokietija
Fermentas <i>celiulazė</i> iš <i>Aspergillus niger</i>	Sigma, Vokietija
Metanolis 99,8 % (CH ₃ OH)	Barta a Cihlar, Čekija
Folin&Ciocalteu'sfenolinis reagentas	Sigma, JAV
Natrio karbonatas 99,5 % (Na ₂ CO ₃)	Merck, Vokietija
Aliuminio chloridas 99,17 % (AlCl ₃ ·6H ₂ O)	Chempur, Lenkija
Heksametilentetraaminas 99,5 % (C ₆ H ₁₂ N ₄)	Roth, Vokietija
Rutino reagentas (Rutinhydrate) 95 %	Sigma, Vokietija
Acto rūgštis 99 % (CH ₃ COOH)	Lachema, Čekija
DPPH laisvasis radikalas (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	Sigma-Aldrich, Vokietija
Acetonitrilas (C ₂ H ₃ N)	Lachema, Čekija
Natrio acetatas (CH ₃ COONa · H ₂ O, an. gr.)	UAB "Eurochemicals", Slovakija

2.3 Naudota aparatūra ir prietaisai

Ispaninio šalavijo ekstraktuose esančių bioaktyvių junginių analizei naudota aparatūra ir prietaisai 4 lentelėje.

4 lentelė. Analizei naudota aparatūra ir prietaisai

Aparatūra ir prietaisai	Gamintojas
Keramikinė grūstuvė	GOST 9147-80, Čekija
Analitinės svarstyklės	Shimadzu Auw 120 D, Bellingen, Vokietija
Termostatinė vandens vonelė	Heidolph, Schwabach, Vokietija
Centrifuga	ThermoScientific, Lietuva
Popierinis filtras	PratDumas, Prancūzija

4 lentelės tęsinys

Vakuuminis siurblys	KNF labport, Vokietija
Spektrofotometras	MiltonRoy, Spectronic 1201, JAV
1 ml vienkartinės kiuvetės	Hitachi, JAV
Autoklavas Laboklav 25	Steriltechnik AG, Vokietija

2.4 Ispaninio šalavijo sėklų ekstraktų paruošimas

Tiriamos ispaninio šalavijo sėklos susmulkintos porcelianinėje grūstuvėje ir į stiklinius buteliukus padalintos po 1 g. Į kiekvieną iš buteliukų įpilama 4,8 ml bidistiliuoto vandens. Išmatuojamas mišinio pH, kuris optimaliai pritaikytas visiems fermentams – 4,5. Fermentinė hidrolizė vykdoma į ispaninio šalavijo sėklas įpylus skirtingų fermentų: *Clara-Diastase*, pektinazės, *Viscozyme* ar celiulazės santykiu 1:5 ir 1:2,5 (fermentas : ispaninio šalavijo sėklos) (3 lentelė). Hidrolizės reakcija vykdoma, įkaitintoje iki 45 °C temperatūros, vandens vonelėje, mėginius joje laikant 60 min. Fermentai inaktyvuojami laikant mišinius 5 min. 100 °C temperatūroje. Po inaktyvacijos bandiniai centrifuguojami 6500 aps/min. 5 min. ir nupilami. Likusios nuosėdos užpilamos 2,5 ml 100 % metanolio ir paliekamos purtyklėje. Po 24 h vandeniniai ir metanoliniai ekstraktai sumaišomi ir nufiltruojami per popierinį filtrą, naudojant Biucherio piltuvą su kolba bei vakuuminį siurbį.

5 lentelė. Tyrimui pasirinkti fermentai

Fermento komercinis pavadinimas (gamintojas, kilmės šalis)	Sudedamosios dalys/ Poveikis	Fermento aktyvumas	Optimalios sąlygos pagal gamintojo rekomendaciją
<i>Clara-Diastase</i> (Sigma – Aldrich, JAV)	α -Amilazė, celiulazė, sacharazė, peptidazė, fosfatazė ir sulfatazė/ Hidrolizuoja glikogeną, celiuliozę, sacharozę, baltymus.	39,7 U/mg	Temperatūra 40-50 °C, pH 4- 4,5
Pektinazė iš <i>Aspergillus niger</i> (Sigma, Vokietija)	Pektinazė/ Hidrolizuoja pektinus, kurie yra augalų ląstelių sienelių sudedamoji dalis	1,07 U/mg	Temperatūra 45-55 °C, pH 3-6,5
<i>Viscozyme L</i> (Sigma, Vokietija)	Arabanazė, celiulazė, β -gliukanazė, hemiceliulazė, ksilanazė/ Hidrolizuoja polisacharidus, arabinozę, celiuliozę, glukaną, hemiceliuliozę, ksilanus.	100 FGU/g	Temperatūra 25-55 °C, pH 3,3-5,5
Celiulazė iš <i>Aspergillus niger</i> (Sigma, Vokietija)	Celulazė/ Hidrolizuoja celiuliozę	1,8 U/g	Temperatūra 40-50 °C, pH 4-5

*informacija paimta iš gamintojo (Merck, *nenustatyta data*) pateikiamų fermento specifikacijų

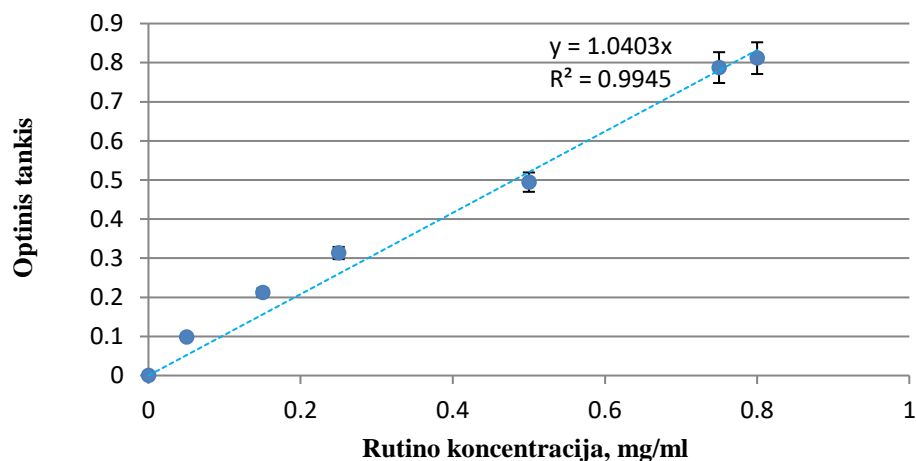
2.3. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas

Bendrasis fenolinių junginių ir flavonoidų kiekis, taip pat bendrasis radikalų surišimo aktyvumas metanoliniuose-vandeniniuose ispaninio šalavijo sėklų ekstraktuose analizuotas spektrofotometru, naudojant 1 ml talpos vienkartinės kiuvetės.

Augalinėje žaliavoje fenolinių junginių analizei yra naudojamas Folin-Ciocalteu kolorimetrinis metodas. Šis metodas yra paremtas tuo, kad šarminėje terpėje, kuri sukuriama Na_2CO_3 tirpalu, esantys fenoliai, reaguoja su fosfomolibdato ir fosfovolframo rūgščių kompleksu. Šių rūgščių reakcijos metu su Folin-Ciocalteu reagentu susidaro mėlynos spalvos junginiai, kurių sugerties maksimumas yra 760nm (Stalikas, 2007).

Paruošti bandiniai iš 50 μl ispaninio šalavijo sėklų ekstrakto, 1500 μl 4 % Na_2CO_3 tirpalo ir 50 μl Folin-Ciocalteu reagento. Praėjus 30 min. inkubacijos, kambario temperatūroje, bandiniai analizuojami spektrofotometru, esant 760 nm bangos ilgio absorbcijai (Kaškonienė ir kt., 2015).

Pateikta fenolinių junginių kiekio įvertinimo kalibracinė kreivė (14 pav.).

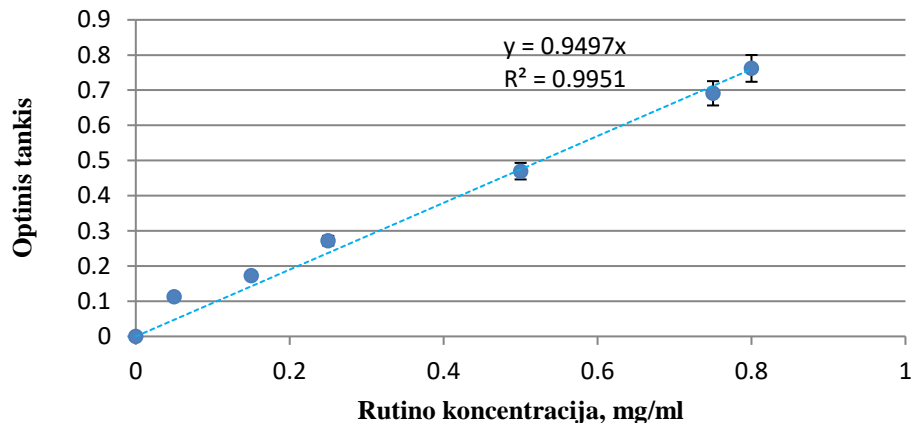


14 pav. Fenolinių junginių kiekio įvertinimo kalibracinė kreivė sudaryta naudojant rutino standartą ($n=3$, $\text{SSN} \pm 5\%$)

2.4. Bendrojo flavonoidų kiekio nustatymas

Bendrasis flavonoidų kiekis ispaninio šalavijo sėklų mėginiuose nustatomas naudojant spektrofotometrą, esant 407 nm bangos ilgiui. 40 μl ispaninio šalavijo sėklų ekstrakto sumaišoma su 960 μl reagento tirpalo, užkimštą mėgintuvėlį pavartant kelis kartus ir laikoma $+5^\circ\text{C}$ temperatūroje. Reagento tirpalas paruošiamas iš 6 ml 5 % heksametilentraatamino, 1,5 ml 33 % acto rūgšties, 30 ml 100 % metanolio, 4,5 ml 10 % aliuminio chlorido ir 30 ml distiliuoto vandens. Praėjus 30 min. inkubacijos, matuojamas paruoštų bandinių optinis tankis (Kaškonienė ir kt., 2015).

Pateikta flavanoidų junginių kiekio įvertinimo kalibracinė kreivė (15 pav.).



15 pav. Flavonoidų junginių kiekio įvertinimo kalibracinė kreivė (n=3, SSN ± 5 %)

2.5. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas

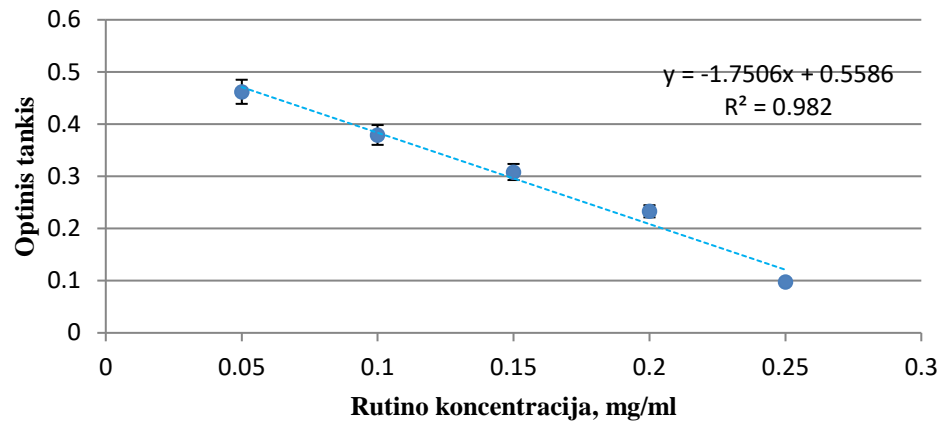
Bendrajam radikalų surišimo aktyvumui nustatyti yra matuojama, kiek DPPH radikalo neutralizavo tiriamoje medžiagoje esantys bioaktyvieji junginiai ir lyginama su DPPH etaloninio tirpalo absorbcijos koeficientu, apskaičiuojama pagal formulę:

$$SP = \left(A_0 - \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Čia SP – slopinimo procentas, %, A_0 – etaloninio DPPH tirpalo absorbcija, A_t – DPPH –ispaninio šalavijo sėklų ekstrakto absorbcija.

DPPH tirpalas ruošiamas ištirpinus 10 mg DPPH reagento 125 ml acetonitrilo, toliau pridedama 125 ml metanolio (100 %), išmatuojama absorbcija prie 515 nm bangos ilgio ir tiksliai privedama prie 0,5 absorbcijos vienetų, naudojant buferinį tirpalą : acetonitrilą : metanolį (2:1:1) ir laikoma tamsoje. Analizei naudojamas natrio acetato buferis, kurio pH 5,5. Acto rūgštimi reguliuojamas buferio rūgštingumas. Buferis sumaišomas su DPPH radikalu. Analizei bandiniai paruošti sumaišius 38,5 μ l ispaninio šalavijo sėklų ekstrakto ir 1500 μ l DPPH tirpalo. Praėjus 15 min. inkubacijos tamsoje, mėginiai tiriami spektrofotometru, esant 515 nm bangos ilgio absorbcijai (Kaškonienė et al., 2015). Rezultatai apskaičiuojami pagal formulę (1). Jei absorbcija > 1,0 absorbcijos vienetai, ekstraktai praskiedžiami ekstrakcijos tirpikliu. Kiekvienas mėginys matuojamas 3 kartus (Kaškonienė ir kt., 2015).

Pateikta antioksidacinio (DPPH) aktyvumo įvertinimo kalibracinė kreivė (16 pav.).



16 pav. Antioksidacinio (DPPH) aktyvumo įvertinimo kalibracinė kreivė (n=3, SSN≤5 %)

2.7. Statistinė duomenų analizė

Gauti tyrimų rezultatai statistiškai apdoroti ir susisteminti naudojant Microsoft Office Excel (Microsoft, JAV) kompiuterinę programą. Visi tyrimai atlikti po tris kartus. Apskaičiuota santykinė paklaida, standartinė paklaida ir rezultatų aritmetinis vidurkis. Įvertintas rezultatų patikimumas, vieno veiksnio dispersine analize (ANOVA), naudojant kompiuterinę programą STATISTIKA (STATISTICA 13) (Sakalauskas, 2003).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šioje dalyje bus pristatoma skirtingų augalų ir sėklų, apdorotų skirtingais fermentais bendras fenolinių junginių kiekis, bendrasis flavonoidų kiekis bei antioksidacinis aktyvumas. Dėl COVID-19 pandemijos, bendrasis fenolinių junginių kiekio įvertinimas, bendrasis flavonoidų kiekio įvertinimas ir antioksidacinio aktyvumo įvertinimas nebuvo įvertintas ir darbe yra pateikiami literatūros šaltiniuose rasti duomenys.

3.1 Bendrojo fenolinių junginių kiekio įvertinimas

Fenoliniai junginiai veikiantys daugiausia kaip fitoaleksinai, apdulkintojų pritraukėjai, augalų pigmentacijos veiksniai, antioksidantai ir apsauginės priemonės nuo ultravioletinės šviesos (Khoddami ir kt., 2013). Jie gali veikti kaip antioksidantai, o tai reiškia, kad jie gali neutralizuoti kenksmingus laisvuosius radikalus (Petre, 2019). Kaip teigia Chon (2013), maiste fenoliai gali prisidėti prie produktų kartumo, sutraukimo, spalvos, skonio, kvapo ir oksidacinio stabilumo.

Fermentai sumažina tirpiklių suvartojimą ir padidina bioaktyvių junginių ekstrahavimo efektyvumą. Tyrimuose fermentai buvo naudojami specialiai augalinėms medžiagoms apdoroti prieš tradicinius ekstrahavimo metodus (Yang ir kt., 2011). Fenolių ekstrahavimo metoduose paprastai naudojami mišrių tirpiklių (dioksano/etanolio, vandens/acetono, vandens/metanolio ir vandens/etanolio) mišiniai arba jie atliekami naudojant šarminę, rūgščią ar fermentinę hidrolizę (Ribeiro, 2013). Buvo atliktas tyrimas siekiant įvertinti pektinazės ir *Viscozyme* fermentų poveikį linų sėmenų miltams. Ribeiro (2013) tyrime buvo naudojami du tirpikliai – vanduo ir etanolis. Gauti rezultatai parodė, jog tiek pektinazės tiek *Viscozyme* fermentai pasižymėjo dideliu poveikiu gleivių hidrolizei, o tai patvirtina kiek didesnis fenolinių junginių ir baltymų išsiskyrimas, paprastai pagerėjęs esant etanoliumi. Veikiant pektinazės fermentui su etanoliumi išsiskyrusių fenolių kiekis buvo didesnis, veikiant su vandeniu, veiksmingumas sumažėjo 12 %. Priešingai buvo veikiant *Viscozyme* fermentui, su etanoliumi išsiskyrusių fenolių kiekis buvo mažesnis 27 %, nei veikiant su vandeniu. Tyrimo rezultatai parodė, jog išsiskyrusių fenolių kiekis buvo didžiausias veikiant *Viscozyme* fermentui su vandeniu – 100 %. Šis fermentų mišinys hidrolizuoja įvairius polisacharidus, tokius kaip: ksilaną, arabinozę, gliukaną, celiuliozę, kurie įeina į ląstelės sienelės struktūrą, todėl tai galėjo turėti įtakos geresniems išsiskyrusių fenolių kiekio rezultatams.

Panašus tyrimas buvo atliktas su pistacijų žaliąja dalimi, fermentinis ekstrahavimas buvo atliktas pagal Seifzadeh ir kt. (2018) metodą su trumpomis modifikacijomis. Panašaus pobūdžio tyrimas buvo atliekamas ir Chamorro ir kt., (2012) su vynuogių išspaudomis ir odele bei vynuogių sėklomis ir odele, kurį atliko - Fernándezas ir kt., (2015), naudojant pektinazės, celiulazės ir tanazės fermentus.

Natrio acetato buferis (50 mM) buvo naudojamas kaip tirpiklis palaikant optimalias pH sąlygas (Seifzadeh ir kt., 2018). Šiuose tyrimuose buvo naudojamas Folin – Ciocalteu metodas. Seifzadeh ir kt. (2018) tyrime įvairių pektinazės fermento koncentracijų poveikis fenolinių junginių ekstrahavimui parodė, kad pektinazė buvo labai efektyvi ekstrahuojant šiuos junginius, todėl fenolinių junginių ekstrahavimo kiekis padidėjo 44 % palyginti su kontroliniu mėginiu. Pridėjus daugiau fermento, ekstrahavimo išeiga padidėjo tik 5 %. Fernándezas ir kt. (2015) atliko tyrimą ir rezultatuose pateikė 2,5 karto padidėjusį fenolinių junginių ekstrahavimą iš vynuogių odelės ir sėklų, naudojant pektinazės fermentą, palyginti su kontroliniu mėginiu. Priešingai, Chamorro ir kt. (2012) rezultatuose pateikė, jog pektinazė neturėjo reikšmingo poveikio fenolinių junginių ekstrahavimui iš vynuogių išspaudų ir sėklų. Skirtingų celiulazės koncentracijų poveikis fenolinių junginių ekstrahavimo išeigai buvo panašus į pektinazės fermento poveikį, Fernándezas ir kt. (2015) tyrime. Celiulazė buvo efektyvi ekstrahuojant fenolinius junginius, vynuogių sėklų ir odelės tyrime, ekstrahavimo išeiga padidėjo apie 59 %, lyginant su tanazės fermentu, o fermento koncentracijos padvigubinimas neturėjo jokio reikšmingo poveikio ekstrahavimui ($p < 0,05$), tačiau Chamorro ir kt. (2012) išvados nurodė, kad celiulazės fermentas neturėjo jokios įtakos didinant vynuogių sėklų ir išspaudų fenolinių junginių ekstrahavimą. Apie fenolinių junginių ekstrahavimo padidėjimą naudojant tanazę nustatyta Chamorro ir kt. (2012) tyrime. Pagal Chamorro ir kt. (2012) rezultatus, naudojant tanazės fermentą fenolinių junginių ekstrahavimas iš vynuogių sėklų ir išspaudų padidėjo iki 72 %. Seifzadeh ir kt. (2018) tyrime, fenolinių junginių ekstrahavimo kiekio išsiskyrimui, tanazės fermentas turėjo reikšmingą poveikį, lyginant su pektinazės fermentu, rezultatai buvo panašūs. Priešingai Fernándezas ir kt. (2015) atskleidė, kad tanazės fermentas neturėjo reikšmingo poveikio fenolinių junginių ekstrahavimui iš vynuogių odelės ir sėklų.

Taigi, pagal aptartus literatūrinius rezultatus pektinazės fermentas pasižymėjo didžiausiu išsiskyrusių fenolinių junginių kiekiu atliktuose tyrimuose su vynuogių sėklomis ir odele (ekstrahavimo išeiga siekė – 67 %) bei pistacijų žaliosios dalies tyrime (ekstrahavimo išeiga siekė – 44 %), lyginant su celiulazės ir tanazės fermentais. Vynuogių išspaudų ir sėklų tyrime, tanazės fermentas parodė geriausius rezultatus (ekstrahavimo išeiga siekė – 72 %), lyginant su kitais fermentais. Linų sėmenų tyrime didžiausiu išsiskyrusiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo *Viscozyme* fermentas (išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis veikiant su vandeniu buvo $6,14 \pm 0,10$ mg/ g), lyginant su pektinazės fermentu (6 lentelė).

6 lentelė. Augalų ir sėklų bendrojo fenolinių junginių kiekio įvertinimo apžvalga

Augalo pavadinimas	Naudoti fermentai	Tirpiklis	Komentaras	Literatūra
--------------------	-------------------	-----------	------------	------------

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

6 lentelės tęsinys

Linų sėmenys	<i>Pectinase</i> <i>Viscozyme</i>	Vanduo/ Etanolis	Veikiant pektinazės fermentui su etanoliumi išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis buvo didesnis $4,9 \pm 0,08$ mg/g nei veikiant su vandeniu $4,27 \pm 0,09$ mg/g, o veikiant <i>Viscozyme</i> fermentui su etanoliumi išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis buvo mažesnis $4,46 \pm 0,08$ mg/g nei veikiant su vandeniu $6,14 \pm 0,10$ mg/g.	Ribeiro, 2013
Pistacijų žaliųjų dalis	<i>Pectinase</i> <i>Tannase</i>	Natrio acetato buferis	Veikiant pektinazės fermentui išsiskyrusių fenolinių junginių ekstrahavimo kiekis buvo didesnis $82,38 \pm 4,46$ mg GAE/gDW nei naudojant tanazės fermentą $73,43 \pm 3,89$ mg GAE/gDW. Lyginant pektinazės fermentą su kontroliniu mėginiu $46,51 \pm 0,70$ mg/g, pektinazė parodė geresnius ir efektyvesnius rezultatus.	Seifzadeh ir kt. (2018)
Vynuogių išspaudos ir sėklos	<i>Cellulase</i> <i>Pectinase</i> <i>Tannase</i>	Natrio acetato buferis	Didžiausias išsiskyrusių fenolinių junginių ekstrahavimo kiekis buvo iš vynuogių išspaudų ir sėklų, naudojant tanazės fermentą $80,41 \pm 0,08$ mg GAE/gDW. Pektinazė neturėjo reikšmingo poveikio fenolinių junginių ekstrahavimui, išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis buvo $38,25 \pm 1,24$ mg GAE/gDW iš vynuogių išspaudų ir sėklų. O išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis, naudojant celiulazės fermentą, buvo $22,46 \pm 0,11$ mg GAE/gDW.	Chamorro ir kt., 2012
Vynuogių sėklos ir odelė	<i>Cellulase</i> <i>Pectinase</i> <i>Tannase</i>	Natrio acetato buferis	Didžiausias išsiskyrusių fenolinių junginių ekstrahavimo kiekis buvo iš vynuogių odelės ir sėklų, naudojant pektinazės fermentą $94,74 \pm 2,31$ mg GAE/gDW. Celiulazė buvo efektyvi ekstrahuojant fenolinius junginius, išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis buvo $77,98 \pm 0,14$ mg GAE/gDW, o išsiskyrusių fenolinių junginių kiekis, veikiant tanazės fermentui, buvo $31,65 \pm 9,12$ mg GAE/gDW.	Fernándezas ir kt., 2015

Iš literatūros analizės ir gautų rezultatų galima teigti, jog bendrojo fenolinių junginių kiekio išgavimas priklauso nuo tiriamo objekto, tinkamų fermentų parinkimo, nuo pasirinkto objekto cheminės sudėties, fermento ir žaliavos santykio. Gautiems skirtingiems rezultatams įtakos galėjo turėti skirtinga žaliavos geografinė kilmė, ekstraktų paruošimo būdas, naudotas tirpiklis bei eksperimento sąlygos. Dėl

šalyje susiklosčiusios padėties, COVID-19 pandemijos, nepavyko atlikti tyrimo. Tikėtina, jog rezultatai parodytų panašius duomenis atliekant šį darbą.

3.2 Bendrojo flavonoidų kiekio įvertinimas

Augalai išskiria įvairias chemines medžiagas, kad atbaidytų ir pritrauktų vabzdžius, kai kuriais atvejais augalų maitinančius natūralius žolėdžių plėšrūnus. Flavonoidai sintetunami visose augalo dalyse. Jie daro įtaką vaisių, gėlių ir sėklų spalvai, kvapui ir skoniu, todėl jie tampa patrauklūs vabzdžiams, paukščiams ar žinduoliams, kurie padeda pernešti žiedadulkes ar sėklas. Dėl savo įvairios cheminės struktūros ir įvairovės, atsirandančios dėl prijungtų pakaitų, jie turi daug svarbių funkcijų augaluose. Flavonoidai dalyvauja augalų apsaugoje nuo biotinių (žolėdžių, patogenų) ir abiotinių stresų (ultravioletinės spinduliuotės, šilumos), dėl savo antioksidacinių savybių taip pat palaiko ląstelių redoksinę būseną. Antioksidacinis flavonoidų aktyvumas yra susijęs su molekulės struktūra: konjuguotų dvigubų ryšių buvimu ir funkcinų grupių atsiradimu žieduose (Mierziaket ir kt., 2014).

Išanalizuoti moksliniai tyrimai, kuriuose buvo tirtas polifenolio kiekis šviežių vaisių ir daržovių ekstraktuose, gautuose naudojant fermentinę ir metanolio ekstrakcijas. Saura-Calixto ir kt. (2007) tyrime buvo tirtas žaliojo ir raudonojo pipiro polifenolių kiekis, Guerrero ir kt. (2010) – tyrime - miško uogų (gervuogių, aviečių, braškių ir mėlynių), Eberhardt ir kt. (2000) tyrime – kriaušės, žaliojo obuolio, kivio ir moliūgo (visi šie mėginiai buvo tirti be odelės), Uzunović ir kt. (2008) tyrime – kivio, apelsino ir žaliojo obuolio sulčių. Polifenolių kiekis vaisių ir daržovių ekstraktuose, gautuose ekstrahuojant fermentiniu būdu, buvo žymiai didesnis nei gaunamas ekstrahuojant metanolio. Polifenolių koncentracija gervuogių, aviečių, braškių ir mėlynių uogose buvo labai panaši ir jų sumažėjimas buvo mažesnis (5-13 %) nei po fermentinio ekstrahavimo, o kitų vaisių ir daržovių sumažėjo apie 40-70 %. Nepaisant to, tokie mėginiai kaip kivio vaisius, žalieji pipirai, kriaušės, žalieji obuoliai ir moliūgai parodė didžiausią abiejų ekstrakcijų skirtumą, šių fermentiniu būdu ekstrahuotų mėginių polifenolio kiekis buvo nuo 36 % iki 68 % didesnis nei gautų ekstrahuojant metanolio. Fermentiniu būdu ekstrahuotų sulčių mėginiuose polifenolio kiekis buvo didesnis, o tarp ekstrahavimo metodų buvo nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,05$). Tiksliau analizuojant mėginius (fermentinė hidrolizė/metanolio ekstrakcija), pagal pateiktus rezultatus geriausiu polifenolių išsiskyrimu, atliekant fermentinę ekstrakciją, pasižymėjo miško uogos – mėlynės (100/87 %), gervuogės (93/88 %), avietės (88/81 %) ir braškės (77/73 %), rezultatai, tiriant mėginius su metanolio ekstrakcija, buvo panašūs. Kriaušė (28/18 %), raudonasis pipiras (27/25 %) bei moliūgas (26/11 %) pasižymėjo mažiausiu polifenolių kiekio išsiskyrimu, lyginant su mėlynių mėginiu. Žaliojo pipiras (56/18 %), žaliasis obuolys (52/23 %) ir kivio vaisius (51/23 %) pasižymėjo vidutiniu išsiskyrusiu polifenolių kiekiu, lyginant su kitais vaisiais ir daržovėmis. Kriaušės, moliūgo,

žaliojo pipiro, žaliojo obuolio ir kivio vaisiaus mėginių rezultatai tiriant metanolio ekstraktu buvo dvigubai mažesni nei tiriant fermentine ekstrakcija. Remiantis trečiojo tyrimo duomenimis su kivio vaisiaus mėginiu, kivio vaisiaus (100/45 %) išsiskyrusių polifenolių kiekis buvo didesnis, o kivio vaisių sultyse (84/48 %) buvo nustatytas mažesnis išsiskyrusių polifenolių kiekis fermentiniuose ekstraktuose, analogiški rezultatai buvo žaliojo obuolio vaisiaus (100/44 %) ir sulčių (78/39 %) duomenyse. Šių vaisių ir sulčių skirtumą galima paaiškinti tuo, kad vaisių terpėje lengviau pasiekiami polifenolių junginiai. Apelsino sulčių mėginys (54/4 %) neparodė gero polifenolių išsiskyrimo, lyginant su kitais vaisių ir sulčių mėginiais (7 lentelė).

7 lentelė. Skirtingų vaisių, daržovių ir vaisių sulčių bendrojo flavanoidų junginių kiekio įvertinimo apžvalga

Augalo pavadinimas	Ekstrakcija	Komentaras	Literatūra
Žaliasis ir raudonasis pipiras	Fermentinė ir metanolinė	Žaliasis pipiras ($305 \pm 4/96 \pm 12$ mg per 100 mg šviežios masės) (fermentine ekstrakcija/ metanolio ekstrakcija) pasižymėjo dvigubai didesniu polifenolių išsiskyrimu, lyginat su raudonuoju pipiru ($153 \pm 18/136 \pm 14$ mg per 100 mg šviežios masės). Žaliojo pipiro mėginys tirtas fermentiniame ekstrakte buvo žymiai efektyvesnis, nei tirtas metanoliniame ekstrakte. Kiek kitaip rodo raudonojo pipiro rezultatai, tyrimo duomenimis, mėginys tirtas fermentiniame ekstrakte buvo ne žymiai didesnis už tirtą metanoliniame ekstrakte.	Saura-Calixto ir kt., (2007)
Miško uogos (gervuogės, avietės, braškės ir mėlynės)	Fermentinė ir metanolinė	Geriausiu polifenolių išsiskyrimu pasižymėjo miško uogos, tiriant su fermentine ekstrakcija (fermentine ekstrakcija/ metanolio ekstrakcija) - mėlynės ($548 \pm 1/475 \pm 34$ mg per 100 mg šviežios masės), gervuogės ($507 \pm 10/482 \pm 13$ mg per 100 mg šviežios maės), avietės ($482 \pm 11/444 \pm 10$ mg per 100 mg šviežios masės) ir braškės ($422 \pm 15/402 \pm 14$ mg per 100 mg šviežios masės), rezultatai, tiriant mėginius su metanolio ekstrakcija, buvo labai panašūs.	Guerrero ir kt., (2010)

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

7 lentelės tęsinys

Augalo pavadinimas	Ekstrakcija	Komentaras	Literatūra
Kriaušės, žaliasis obuolys, kivio vaisius ir moliūgas	Fermentinė ir metanolinė	Geriausiu polifenolių išsiskyrimu, atliekant fermentinę ekstrakciją, pasižymėjo žaliasis obuolys (fermentinė ekstrakcija/ metanolio ekstrakcija) ($286 \pm 1 / 126 \pm 1$ mg per 100 mg šviežios masės) ir kivio vaisius ($280 \pm 17 / 126 \pm 11$ mg per 100 mg šviežios masės). Kriaušės ($155 \pm 35 / 99 \pm 7$ mg per 100 mg šviežios masės) ir moliūgo ($141 \pm 31 / 60 \pm 12$ mg per 100 mg šviežios masės) mėginiai pasižymėjo mažiausių polifenolių išsiskyrimu, lyginant su kitais mėginiais. Rezultatai, tiriant mėginius su metanolio ekstrakcija, buvo dvigubai mažesni.	Eberhardt ir kt., (2000)
Kivio, apelsino ir žaliojo obuolio sultys	Fermentinė ir metanolinė	Kivio sultys (fermentinė ekstrakcija/ metanolio ekstrakcija) ($235 \pm 25 / 135 \pm 6$ mg per 100 mg šviežios masės) ir žaliojo obuolio sultys ($223 \pm 15 / 112 \pm 3$ mg per 100 mg šviežios masės) pasižymėjo geriausiu polifenolių išsiskyrimu, atliekant fermentinę ekstrakciją. Apelsino sulčių mėginys ($155 \pm 6 / 12 \pm 4$ mg per 100 mg šviežios masės) neparodė gero polifenolių išsiskyrimo, lyginant su kitais mėginiais. Gauti rezultatai, tiriant mėginius su metanolio ekstrakcija, buvo dvigubai mažesni.	Uzunović ir kt., (2008)

Saura-Calixto ir kt. (2007), Guerrero ir kt. (2010), Eberhardt ir kt. (2000), Uzunović ir kt. (2008), tyrimuose buvo analizuojami skirtingų vaisių, daržovių ir vaisių sulčių fermentinių ir metanolinių ekstraktų fenoliniai junginiai. Iš gautų rezultatų ir literatūros analizės galima daryti išvadą, jog fermentinis ekstrahavimas aiškiai parodė jo efektyvumą, padidindamas polifenolio kiekį ekstraktuose. Tokiems rezultatams įtakos galitūrėti maistinių polifenolių cheminė struktūra, pagrindinė struktūra, molekulinė masė, glikozilinimo ir acetilinimo laipsnis, konjugacija su kitais fenoliais, polimerizacijos laipsnis ir tirpumas (Manachet ir kt., 2005). Be to, teigiama, kad svarbiausias lemiamas veiksnys būtų glikozido ir aglikono, sujungto su skirtingais maisto komponentais, cheminė struktūra (Stahlet ir kt., 2002). Dėl šalyje susiklosčiusios padėties, COVID-19 pandemijos, nepavyko atlikti tyrimo. Tikėtina, jog rezultatai parodytų panašius duomenis atliekant šį darbą.

3.3 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas augaluose

Laisvasis radikalas apibrėžiamas kaip bet koks atomas ar molekulė, turinti neporinius elektronus (Umamaheswari ir kt., 2008). Kaip teigia Saha ir kt., (2008) gyvosiose sistemose laisvieji radikalai susidaro kaip įprasto organizmo medžiagų apykaitos proceso dalis. Antioksidantai kovoja su laisvaisiais radikalais ir apsaugo mus nuo įvairių ligų. Nors antioksidaciniai fermentai, tokie kaip superoksidodismutazė, katalazė ir glutationoperoksidazė, vaidina svarbų vaidmenį pašalinant laisvuosius radikalus ir oksidatorius, šie gynybos mechanizmai nėra pakankami. Todėl ląstelių makromolekulės lengvai patiria oksidacinį pažeidimą (Bergendi ir kt., 1999). Kähkönen ir kt. (1999) tyrimai atskleidė, kad didžiąją antioksidacinio aktyvumo dalį gali sudaryti tokie junginiai kaip flavonoidai, flavonai, izoflavonai, antocianinas, katechinas ir kiti fenoliniai junginiai. Augalai turi daug bioaktyvių junginių, turinčių didelį antioksidacinį aktyvumą. Skirtingų augalų rūšių antioksidacinio aktyvumo nustatymo tyrimai gali padėti atskleisti šių rūšių, kaip naujų antioksidacinių junginių šaltinio, vertę. Yra daugybė in vitro metodų, leidžiančių įvertinti antioksidacinį aktyvumą, ir svarbu pasirinkti tinkamą metodą, siekiant nustatyti, kurios rūšys turi didžiausią antioksidacinį aktyvumą. Įvertinant antioksidacinį aktyvumą taikomas fotometriniškas laisvojo radikalo 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) sujungimo metodas. DPPH radikalas yra vienas iš nedaugelio stabilių azoto radikalų, kuris greitai skyla šviesoje ir yra tamsiai violetinės spalvos, dėl šių priežasčių eksperimentas yra atliekamas tamsoje. Jis nėra panašus į kitus trumpai gyvuojančius, reaktyvius peroksido radikalus, kurie dalyvauja riebiųjų rūgščių peroksidacijoje, nes antioksidantai, kurie reaguoja su peroksido radikalais, gali iš vis nereaguoti su DPPH radikalu. Antioksidantams surišus DPPH radikalo spalva šviesėja, lygiagrečiai jiems perduodant vandenilį (Kaškonienė ir kt., 2015).

Literatūroje yra daugybė nuorodų, nurodančių įvairių augalų antioksidacinį aktyvumą. Buvo tiriamas šviežių slyvų Dojovan (1998) ir džiovintų slyvų Najafabad (2014), autorių tyrimuose, įvairių dalių žydinčios amerikinės lantanos (*Lantana camara*) Pour (2012), azijinės centelės (*Centella asiatica*) ir mėlynžiedės taškuonės (*Bacopa monnieri*) Meena ir kt., (2012) autorių tyrimuose, antioksidacinis ir radikalų pašalinimo aktyvumas su DPPH laisvuju radikalu, etanoliniuose ir metanoliniuose ekstraktuose. Tiek etanoliniuose, tiek metanoliniuose ekstraktuose didžiausias DPPH radikalų pašalinimo aktyvumas Dojovan (1998) ir Najafabad (2014) tyrimuose nustatytas džiovintiems slyvos bandiniams (100%), metanoliniame ekstrakte rezultatai buvo geresni 10 %, lyginant su etanoliniu ekstraktu. Šviežios slyvos rezultatai buvo gerokai mažesni (70%), metanoliniame ekstrakte rezultatai buvo geresni 21 %, lyginant su etanoliniu ekstraktu. Pour (2012) atliktame tyrime buvo tirtas *L. camara* įvairių dalių metanolinių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas. Antioksidacinis aktyvumas įvairių

L.camara augalo dalių buvo palygintas su žinomu antioksidantu vitaminu C, kurio DPPH vertė buvo $6,21 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$. Lapų, žiedų, šaknų, stiebo ir vaisiaus vertės taip pat išmatuotos atliekant DPPH radikalų pašalinimo tyrimus. *L. camara* augalo lapai parodė geriausias antioksidacines savybes, antioksidacinis aktyvumas buvo padidėjęs tik apie 2 kartus, o *L. camara* vaisiai parodė prastą antioksidacinį aktyvumą, antioksiacinis aktyvumas skyrėsi 15 kartų, lyginant su kontroliniu mėginiu. Augalo žiedų vertė buvo padidėjusi 4 kartus, šaknų – 5 kartus, stiebo – 7 kartus, palyginti su kontrole. *L.camara* metanolio ekstraktų antioksidacinis potencialas buvo tiriamas ieškant naujų bioaktyvių junginių iš gamtos išteklių. Paaiškėjo, kad *L.camara* lapai, žiedai, šaknys ir stiebai turi didžiausią antioksidacinį aktyvumą, palyginti su etaloniniu antioksidantu vitaminu C, skirtu DPPH valymo veiklai. Polifenolių buvo rasta visuose mėginiuose ir tokia tvarka: lapai>žiedai>šaknys>stiebai> vaisiai (Pour, 2012). Meena ir kt. (2012) tyrime su *C. asiatica* ir *B. monnieri* žolelėmis taip pat buvo tiriamas antioksidacinis aktyvumas su DPPH radikalais. Buvo tirtos 20, 40, 60, 80 μl žolių koncentracijos. Skirtingų koncentracijų metanolio *B. monnieri* ekstraktas pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, palyginti su *C. asiatica* ekstraktu. *B. monnieri* antioksidacinis aktyvumas DPPH skirtingų koncentracijų vidurkis siekė 94,81 %, lyginant *C. asiatica* žolių skirtingų koncentracijų vidurkį – 72,12 %, jis pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu aktyvumu DPPH.

Taigi, pagal aptartus literatūrinius rezultatus, geriausiu antioksidaciniu ir radikalų pašalinimo aktyvumu su DPPH laisvuju radikalais pasižymėjo *B. monnieri* žolių mėginys (naudojant 80 μl žolių koncentraciją), metanolio ekstrakte. Džiovintos slyvos mėginys, *L. camara* augalo lapų mėginys, metanolio ekstraktuose, taip pat parodė žymiai geresnes antioksidacines savybes, palyginti su šviežios slyvos mėginiu, *L. camara* augalo žiedais, šaknimis, stiebu ir vaisiais bei *C. asiatica* žolių įvairių koncentracijų mėginiais (8 lentelė).

Antioksidantai yra nepaprastai svarbios medžiagos, gebančios apsaugoti kūną nuo žalos, kurią sukelia laisvųjų radikalų sukeltas oksidacinis stresas. Augaliniai polifenoliai veikia kaip reduktoriai ir antioksidantai. Taigi, galima daryti išvadą, kad polifenoliai yra atsakingi už antioksidacinį aktyvumą. Iš literatūros apžvalgos matyti, jog antioksidacinio aktyvumo įvertinimas priklauso nuo tiriamo objekto, naudoto ekstrakto bei geografinės surinkimo vietovės. Gautiems skirtingiems rezultatams įtakos galėjo turėti skirtinga žaliavos geografinė kilmė, naudotas ekstraktas bei eksperimento sąlygos. Apdorojus sėklas fermentais padidėja biologiškai aktyvių medžiagų kiekis. Dėl šalyje susiklosčiusios padėties, Covid – 19 pandemijos, nepavyko atlikti tyrimo. Tikėtina, jog rezultatai parodytų panašius duomenis atliekant šį darbą.

8 lentelė. Augalų antioksidacinio aktyvumo, naudojant DPPH laisvąjį radikalą, įvertinimo apžvalga

Augalo pavadinimas	Ekstraktas	Komentaras	Literatūra
Šviežia slyva	Etanolio/ metanolio ekstraktas	Šviežios slyvos DPPH radikalų pašalinimo aktyvumas buvo mažesnis, palyginus su džiovintos slyvos mėginiu. Etanoliniame ekstrakte buvo 49,10±1,24 %, o metanoliniame ekstrakte – 62,40±1,08 %.	Dojovan ir kt. (1998)
Džiovinta slyva	Etanolio/ metanolio ekstraktas	Tiek etanoliniame tiek metanoliniame ekstraktuose, džiovintos slyvos DPPH radikalų pašalinimo aktyvumas buvo didžiausias, palyginus su šviežios slyvos mėginiu. Etanoliniame ekstrakte buvo 79,78±1,34 %, o metanoliniame 87,94±0,81 %.	Najafabad ir kt. (2014),
Įvairios <i>Lantana camara</i> dalys	Metanolio ekstraktas	<i>Lantana camara</i> augalo lapai parodė geriausias antioksidacines savybes 16,02±0,94 µg / mL (lyginant su kontroliniu mėginiu - 6,21±0,04 µg / mL), o <i>Lantana camara</i> vaisiai parodė prastą antioksidacinį aktyvumą 90,11±0,57 µg / mL. Augalo žiedų vertė buvo - 28,92±0,19 µg / mL, šaknų - 31,52±0,74 µg / mL, stiebo – 46,96±2,51 µg / mL.	Pour (2012)
<i>Centella asiatica</i> ir <i>Baccopa monnieri</i>	Metanolio ekstraktas	<i>B. monnieri</i> ir <i>C. Asiatica</i> žolių antioksidacinis aktyvumas DPPH buvo matuotas skirtingose žolių koncentracijose. <i>B. monnieri</i> : 20 µL – 53 %, 40 µL – 81 %, 60 µL – 110 %, 80 µL – 135 %, <i>C. Asiatica</i> žolės, pasižymėjo mažesniu antioksidaciniu aktyvumu: 20 µL – 42 %, 40 µL – 65 %, 60 µL – 86 %, 80 µL – 96 %.	Meena ir kt. (2012)

IŠVADOS

1. Literatūros apžvalga rodo, jog fermentinė hidrolizė padidina fenolinių junginių kiekius. Fenolinių junginių kiekio padidėjimas priklauso nuo tiriamo objekto, tinkamų fermentų parinkimo, nuo pasirinkto objekto cheminės sudėties, fermento ir žaliavos santykio. Rezultatams įtaką gali turėti skirtinga žaliavos geografinė kilmė, ekstraktų paruošimo būdas, naudotas tirpiklis bei eksperimento sąlygos. Tikėtina, jog teigiamas pokytis gautųsi ir ispaninio šalavijo, paragvajinio bugienio, geltonojo lubino sėkloms bei drugių žirnio augalui.

2. Remiantis literatūros šaltinių duomenimis, polifenolių kiekis vaisių ir daržovių ekstraktuose, gautuose ekstrahuojant fermentiniu būdu, buvo žymiai didesnis nei gaunamas ekstrahuojant metanoliu. Polifenolius ekstrahuojant fermentiniu būdu, padidėja polifenolinių junginių išgava. Rezultatams įtakos gali turėti maistinių polifenolių cheminė struktūra, molekulinė masė, glikozilinimo ir acetilinimo laipsnis, konjugacija su kitais fenoliais, polimerizacijos laipsnis ir tirpumas. Tikėtina, jog teigiamas pokytis gautųsi ir ispaninio šalavijo, paragvajinio bugienio, geltonojo lubino sėkloms bei drugių žirnio augalui.

3. Pagal aptartus literatūrinius rezultatus, galima teigti, jog fermentinė hidrolizė padidina antioksidacinį ir radikalų surišimo aktyvumą su DPPH laisvuju radikalų. Polifenoliai yra atsakingi už antioksidacinį aktyvumą. antioksidacinio aktyvumo įvertinimas priklauso nuo tiriamo objekto, naudoto ekstrakto bei geografinės surinkimo vietovės. Rezultatams įtaką gali turėti skirtinga žaliavos geografinė kilmė, naudotas ekstraktas bei eksperimento sąlygos. Tikėtina, jog teigiamas pokytis gautųsi ir ispaninio šalavijo, paragvajinio bugienio, geltonojo lubino sėkloms bei drugių žirnio augalui.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abreu, M. L. C., Vieira, R. A. M., Rocha, N. S., Araujo, R. P., Gloria, L. S., Fernandes, A. M., Lacerda, P. D. ir Gesualdi, A. J. (2013). *Clitoria ternatea* L. as a Potential High Quality Forage Legume. *Asian – Australas Journal of Animal Sciences*, 27, 169-178.
- Ayerza, H. R. ir Coates, W. (2011). Proteincontent, Oilcontent and Fatty Acid Profiles as Potential Criteria to Determine the Origin of Commercially Grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34, 1366– 1371.
- Ayerza, R., Coates, W. ir Lauria, M. (2002). Chia Seed (*Salviahispanica* L.) Fatty Acid Source for Broilers: Influence on Fatty Acid Composition, Cholesterol and Fatcontent of White and Dark Meats, Growth Performance, and Sensory Characteristics. *Poultry Science*, 81, 826–837.
- Akbar, S.(2020). *Clitoriaternatea* L. (Fabaceae/ Leguminosae). *Handbook of 200 Medicinal Plants*, 19, 673-679.
- Alasuvanto, E., Hertzberg, R., Pajari, S. (2017). Cell Distruption Methods [interaktyvus] School of Chemical Technology [žiūrėta: 2021 m. sausio 11 d.]. Prieiga per: <http://mycourses.aalto.fi/pdf>.
- Alesiani, D., Canini, A., D’abrosca, B., Dellagreca, M., Fiorentino, A., Mastellone, C., Monaco, P. ir Pacifico, S. (2010). Antioxidant and Antiproliferative activities of Phytochemicals from Quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *Food Chemistry*, 118, 199–207.
- Anantharaju, P.G., Gowda, P.C., Vimalambike, M.G. ir Madhunapantula, S.V. (2016). Anoverviewon the Role of Dietary Phenolics for the Treatment of Cancers. *Nutrition Journal*, 99, 62-74.
- Aneta, K. S., Rafinska, K., Skiersa, J., W. ir Buszewski, B. (2020). The Influence of Plant Material Enzymatic Hydrolysis and Extraction Conditionson the Polyphenolic Profiles and Antioxidant Activity of Extracts: A Green and Efficient Approach. *Molecules*, 25, 2074.
- Axelsson, J.(2011). Separate Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Spruce. *Linkoping University, Department of Physics, Chemistry and Biology* [žiūrėta: 2021m. gegužės 12d.]. Prieiga per: diva-portal.org/smash/get/diva2:427842/FULLTEXT01.pdf.
- Baptista, R. C., Horita, C. N. ir Sant’Ana, A. S. (2020). Natural Products With Preservative Properties for Enhancing the Microbiological Safety and Extending the Shelf-Life of Seafood: A review. *Food Research International*, 127, 122-125.
- Barua, C.C., Sen, S., Das, A.S., Talukdar, A., JyotiHazarika, N., Barua, A. ir Barua, I. (2014). A Comparativestudy of the In Vitro Antioxidant Property of Different Extracts of *Acoruscalamus* Linn. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4, 8–18.

- Bergendi, L., Benes, L. ir Durackova, Z. (1999). Chemistry, Physiology and Pathology of Free Radicals. *Life Sciences*, 65, 1865–1874.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S. ir Chel-Guerrero L. (2004). Wet-Fractionation of Phase *Olus lunatus* Seeds: Partial Characterization of Starch and Protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1193–1201.
- Brethauer, S. ir Wyman, C. E. (2009). Review: Continuous Hydrolysis and Fermentation for Cellulosic Ethanol Production. *Bioresourse Technology*, 101, 4862 – 4874.
- Brok, S., Kurnz, A. ir Prube, U. (2019). Impact of Hydrolysis Method Son the Utilization of Agricultural Residues as Nutrient Source for D-lactic Acid Production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Fermentation*, 5, 12.
- Brutsch, L., Stringer, F. J., Kuster, S., Windhab, E. J. ir Fischer, P. (2019). Chia Seed Mucilage – a Vegan Thickener: Isolation, Tailoring Viscoelasticity and Rehydration. *Food and Function*, 10, 4854–4860.
- Burris, K. P., Harte, F. M., Davidson, P. M., Stewart, C. N. ir Zivanovic, S. (2012). Composition and Bioactive Properties of „Yerba Mate“ (*Ilex paraguariensis*, A. St. Hill): A Review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72, 268–274.
- Castro, A. G. (2003). A Química e a Reológico Processamento Dos Alimentos. *Ciênciatécnica*, 25, 295;
- Chamorro, S. , Viveros, A. , Alvarez, I. , Vega, E. ir Brenes, A. (2012). Changes in Polyphenol and Polysaccharide Content of Grape Seed Extract and Grape Pomace After Enzymatic Treatment. *Food Chemistry*, 133, 308–314.
- Chaves, N., Santago, A. Ir Alias, J. C. (2020). Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants (Basel)*, 9, 96.
- Chon, S. U. (2013). Total Polyphenols and Bioactivity of Seeds and Sprouts in Several Legumes. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 6112–6124.
- Coates, W. (2011). Whole and Ground Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds, Chia Oil – Effect Son Plasma Lipids and Fatty Acids. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, 13, 12–17.
- Craig, R. (2004). Application for Approval of Whole Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed and Ground Whole Seed as Novel Food Ingredient. Northern Ireland: Mr D Armstrong. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2, 29.

- Donovan, J. L., Meyer, A. S. ir Waterhouse, A. L. (1998). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Prunes and Prune Juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agriculture in Food Chemistry*, 46, 1247–1252.
- Eberhardt, M. V., Lee, C. Y. ir Liu, R. H. (2000). Nutrition: Antioxidant Activity of Fresh Apples. *Nature*, 405, 903–904.
- Fang, Y.Z., Yang, S. ir Wu, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18, 872–879.
- Fernández, K., Vega, M. ir Aspé, E. (2015). An Enzymatic Extraction of Proanthocyanidins from País Grape Seeds and Skins. *Food Chemistry*, 168, 7–13.
- Grigelmo-Miguel ir Martin-Belloso, M. (1998). Characterization of Dietary Fiber from Orange Juice Extraction. *Food Research International*, 31, 355-361.
- Guerrero, J. C., Ciampi, L. P., Castilla, A. C., Medel, F. S., Schalchli, H. S. ir Hormazabal E. U. (2010). Antioxidant Capacity, Anthocyanins, and Total Phenols of Wild and Cultivated Berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*., 70, 537– 544.
- Harbone, J. B. (1983). Phytochemical Methods. *Chapman & Hall, London*, 288.
- Heck, C. I. ir De Mejia, E.G. (2007). „Yerba Mate“ Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science*, 72, 138–151.
- Huie, C. W.(2002). A Review of Modern Sample-Preparation Techniques for the Extraction and Analysis of Medicinal Plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 23–30.
- Yamagishi, S. ir Matsui T. (2011). Nitric Oxide, a Janus-Faced Therapeutic Target for Diabetic Microangiopathy-Friend or Foe? *Pharmacological Research*, 64, 187–194.
- Yazdi, A. P. G., Barzegar, M., Sahari, M. A. ir Gavlighi, H. A.(2019). Optimization of the Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Pistachio Green Hull. *Food of Science Nutrition*, 7, 356-366.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M. ir Tom M. C. (2008). Physical Properties of Chia (*Salvia hispanica* L .) Seeds. *Industrial Crops and Products*, 28, 286– 293.
- Justyna, T. P., Ciereszko, I., Dubis, A. T., Lesniewska, J., Basa, A., Winnicki, K., Zabka, A., Audzei, M., Sobiech, L., Faligowska, A., Skrzypczak, G. ir Maszewski J. (2019). Irrigation-Induced Changes in Chemical Composition and Quality of Seeds of Yellow Lupine (*Lupinus luteus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 5521.

- Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Maruška, A.(2015). Volatile Compounds Composition and Antioxidant Activity of Bee Pollen Collected in Lithuania. *Chemical papers*, 69, 291– 299.
- Khalid, M., Rahman, S., Bilal, A., Huang, D. (2019). Role of Flavonoids in Plant in Teractions with the Environment and Against Human Pathogens. *Journal of Integrative Agriculture*,18, 211-230.
- Khoddami, A, Wilkes, M. A. ir Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- Kulczynski, B., Cisowska, J. K., Taczanowski, M., Kmiecik, D. ir Michalowska A. G. (2019). The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds – Current State of Knowledge. *Nutrients*, 11, 1242.
- Kulczyński, B., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D. ir Gramza-Michałowska A.(2019). The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds – Current State of Knowledge. *Nutrients*, 11, 1242.
- Kumar, S. ir Pandey A. K.(2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. *The Scientific World Journal*, 2013, 16.
- Li, H. B., Jiang, Y. ir Chen F. (2004). Separation Method Sused for *Scutellaria baicalensis* Active Components. *Journal of Chromatography B*, 812, 277–290.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. ir Rémésy, C. (2005). Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230–242.
- Martha, G. C., Armando, R. T. ir Carlos A. A. (2012). A Dietary Pattern in Cluding Nopal, Chia Seed, Soy Protein, and Oat Reduces Serum Triglycerides and Glucose in Tolerance in Patients with Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition*, 142, 64–69.
- Meena, H., Pandey, K. H., Pandey, P., Arya, M. C. ir Ahmed Z. (2012). Evaluation of Antioxidant Activity of Two Important Memory Enhancing medicinal plants *Baccopa monnieri* and *Centella asiatic*. *Indian journal of Pharmacology*, 44, 114-117.
- Munoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O. ir Aguikera J. M.(2012). Chia Seeds: Microstructure, Mucilage Extraction and Hydratation. *Journal of Food Engineering*, 108, 216-224.
- Najafabad, A. M. irJamei, R. (2014). Free Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of Methanolic and Ethanolic Extracts of Plum (*Prunus domestica* L.) in Both Fresh and Dried Samples. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4, 343-353.
- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C. ir Silva G. L.(2000). Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic – Resistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 144-156.

- Nićiforović, N., Mihailović, V., Mašković, P., Solujić, S., Stojković, A. irMuratspahić, D.P. (2010). Antioxidant Activity of Selected Plant Species; Potential New Sources of Natural Antioxidants. *Food and Chemical Toxicology: and International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48, 3125–3130.
- Oguis, G. K., Gilding, E. K., Jackson, M. A. irCraik, D. J. (2019). Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*), a Cyclotide – Bearing Plant With Applications in Agriculture and Medicine. *Frontiers in Plant Science*, 10, 645.
- Panche, A. N., Diwan, A. D. ir Chandra S. R.(2009). Flavonoids. *Journal of Nutrition Science*, 3, 5.
- Pandey, K. B. ir Rizvi S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-278.
- Pang, Y., Ahmed, S., Xu, Y., Beta, T., Zhu, Z., Shao, Y. ir Bao J.(2018). Bound Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Whole Grain and Bran of White, Red and Blackrice. *Food Chemistry*, 240, 212–221.
- Petre, A.(2019). What are Polyphenols? Benefits and Food Sources. *Journal of Healthline*, vol. 15, 236-269.
- Pinelo, M., Arnous, A. ir Meyar A.(2006). Upgrading of Grape Skins: Significance of Plant Cell- Well Structural Components and Extraction Tehniques for Phenol Releasw. *Trends Food Science Technology*, 17, 579-590.
- Pollack, S. J., Jacobs, J. W. ir Schultz P. G. (1986). Selective Chemical Catalysis by Anantibody. *Science*, 234, 1570-1573.
- Pour, B. M., Jothy, S. L., Latha, L. Y., Chen, Y. ir Sasidharan S. (2012). Antioxidant Activity of Methanol Extracts of Different Parts of *Lantana camara*. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 960-965.
- Puig, E. I. ir Haros, M.(2011). La Chia en Europa: El Nuevo Ingrediente en productos de Panadería. *Alimentaria, Lugo*, 22, pg. 73-77.
- Ribeiro, B. D., Barreto, D. W. ir Coelho, M. A. Z. (2013). Enzyme-Enhanced Extraction of Phenolic Compounds and Proteins from Flaxseed Meal. *ISRN Biotechnoly*, 11, 14-19.
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P. ir Glover, W. (1999). Phenolic Compound and their Role in Oxidative Processes in Fruits. *Food Chemistry*, 66, 401- 436.
- Robinson, P. K.(2015). Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41.

- Saha, M. N., Alam, M. A., Aktar, R. ir Jahangir, R. (2008). *In Vitro* Free Radical Scavenging Activity of *Ixoracoccinea* L. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 3, 90–96.
- Sandeep, K. ir Sarma, M. (2020). Book of Functional and Preservative Properties of Phytochemicals. Academic press (pg. 24-29).
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. ir Latha, L. Y.(2010). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8, 1-10.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J. ir Goñi I. (2007). Intake and Bioaccessibility of Total Polyphenols in a Whole Diet. *Food Chemic*, 101, 492–501.
- Scalbert, A. irWilliamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073–2085.
- Seifzadeh, N., Sahari, M. A., Barzegar, M. ir Gavlighi, H. A. (2018). Concentration of Pistachio Hull Extract Antioxidants Using Membrane Separation and Reduction of Membrane Fouling Durinf Process. *Food Science Nutrition*, 6, 1741-1750.
- Sieprawska, A. K., Rafinska, K., Skierska, J. W. ir Buszewski B.(2020). The Influence of Plant Material Enzymatic Hydrolysis and Extraction Conditionson the Polyphenolic Profiles and Antioxidant Activity of Extracts: A Green and Efficient Approach. *Molecules*, 25, 2074.
- Stahl, W., Van, D. B. H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J. ir Faulks, R. M. (2002). Bioavailability and Metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23, 39–100.
- Stalikas, C. D.(2007). Extraction, Separation and Detection Methods for Phenolic Acids and Fvonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.
- Takamine, J. (1894). Process of Making Diastatic Enzyme. *U.S. Patent*, 6, 525-823.
- Treva, M. D. (2015). Immobilized Enzymes: An Introduction and Applicationsin Biotechnology. *Essaysin Biochemistry*, 15, 1- 41.
- Umamaheswari, M. ir Chatterjee, T. K. (2008). *In Vitro* Antioxidant Activities of the Fractions of *Cocciniagrands* L. Leaf Extract. *African Journal of Traditional Complement and Alternative Medicines*, 5, 61–73.
- Uzunović, A. ir Vranić, E. (2008). Stability of Anthocyanins from Commercial Black Currant Juice Under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 8, 254–258.

- Vashist, S. K., Zheng, D., Al-Rubeaan, K., Luong, J. H. T. ir Sheu F. S. (2011). Technology Behind Commercial Devices for Blood Glucose Monitoring in Diabetes Management. *Chimistry of Acta*, 703, 124-136.
- Vellard, M. (2003). The Enzyme as Drug: Application of Enzymes as Pharmaceuticals. *Current Opinionin Biotechnology*, 14, 444–450.
- Vuksan, V., Jenkins, A. L. ir Dias A. G.(2010). Reduction in Postprandial Glucose Excursion and Prolongation of Satiety: Possible Explanation of the Long-Term Effects of Whole Grain Salba (*Salvia hispanica* L.). *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, .436–438.
- Wagner, H., Blandt, S. ir Zgainski, E. M. (1984). Plant Drug Analysis. *Spring-Verlag, New York*, 320.
- Wasilewko, J. ir Buraczewska, L. (1998). Chemical Composition Including Content of Amino Acids, Minerals and Alkaloids in Seeds of Three Lupin Species Cultivated in Poland. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 8, 1–12.
- Wu, Y. Y., Li, W., Xu, Y., Jin, E. H. ir Tu, Y. Y. (2011). Evaluation of the Antioxidant Effects of Four Main theaflavin Derivatives Through Chemiluminescence and DNA Damage Analyses. *Journal of Zhejiang University Science in Biology*, 12, 744–751.
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J. ir Li H. B. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Science*, 18, 96.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti Vytauto Didžiojo universiteto biologijos katedros vedėjui, prof. habil. dr. Algimantui Paulauskui, už galimybę dirbti ir tobulėti GMF Instrumentinės analizės laboratorijose.

Darbo vadovei doc. dr. Vilmai Kaškonienei, už pagalbą ir kantrybę bei didelį rūpestį, rašant baigiamąjį bakalauro darbą.

Darbo recenzentei Vaidai Tubelytei, už skirtą laiką baigiamojo bakalauro darbo tikrinimui bei pastebėjimus ir klausimus.

Baigiamųjų bakalauro darbų vertinimo komisijai, už objektyvumą įvertinant mano darbą.