

VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS
LIETUVOS AGRARINIŲ IR MIŠKŲ MOKSLŲ CENTRAS

Mindaugas VIŠOCKIS

**BIOMOLEKULIŲ EKSTRAKCIJOS IŠ AUGALINĖS ŽALIAVOS
EFEKTYVUMO DIDINIMAS NAUDOJANT IMPULSINIUS
ELEKTRINIUS LAUKUS**

Mokslo daktaro disertacija
Žemės ūkio mokslai, agronomija (A 001)

Akademija, 2019

Mokslo daktaro disertacija rengta 2015–2019 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre pagal Lietuvos Respublikos švietimo ir mokslo ministro 2019 m. vasario 22 d. įsakymu Nr. V-160 Vytauto Didžiojo universitetui kartu su Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centru suteiktą doktorantūros teisę.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Pranas Viškelis (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija A 001)

Mokslinis konsultantas:

Prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, Gamtos mokslai, Biofizika N 011)

Disertacijos gynimo taryba:

Pirmininkas:

Prof. dr. Zenonas Dabkevičius (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija A 001)

Nariai:

Prof. dr. James Gerard Lyng (Dublino universiteto kolegija, Žemės ūkio mokslai, Agronomija A 001)

Prof. dr. Lina Raudonė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, Farmacija M 003)

Doc. dr. Živilė Tarasevičienė (VDU Žemės ūkio akademija, Žemės ūkio mokslai, Agronomija A 001)

Dr. Vita Tilvikienė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija A 001)

Disertacija bus ginama Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademijos ir Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Agronomijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2019 m. gruodžio 3 d. 13 val. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės institute, seminarų salėje Nr. 1–12. Adresas: Instituto al. 1, 58344 Akademija, Kėdainių r.

Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos nacionalinėje Martyno Mažvydo bibliotekoje bei Vytauto Didžiojo universiteto ir Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro bibliotekose.

VYTAUTAS MAGNUS UNIVERSITY
LITHUANIAN RESEARCH CENTRE FOR AGRICULTURE AND FORESTRY

Mindaugas VISOCKIS

**APPLICATION OF PULSED ELECTRIC FIELDS TO IMPROVE
THE EXTRACTION OF BIOMOLECULES FROM
VEGETABLE RAW MATERIAL**

Doctoral Dissertation
Agricultural Sciences, Agronomy (A 001)

Akademija, 2019

Dissertation was prepared during 2015–2019 at Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry pursuant to order No. V-160 issued by the Minister of Education and Science on the 22th of February 2019, granting a joint right for Vytautas Magnus University and Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry for provision of doctoral studies.

Scientific supervisor:

Prof. dr. Pranas Viškelis (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy A 001)

Scientific consultant:

Prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Nature Sciences, Biophysics N 011)

Chairman:

Prof. dr. Zenonas Dabkevičius (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy A 001)

Council of the defence of the doctoral dissertation:

Members:

Prof. dr. James Gerard Lyng (University College Dublin, Agricultural Sciences, Agronomy A 001)

Prof. dr. Lina Raudonė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy M 003)

Assoc. prof. dr. Živilė Tarasevičienė (Vytautas Magnus University Agriculture Academy Agricultural Sciences, Agronomy A 001)

Dr. Vita Tilvikienė (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy A 001)

The defence of the dissertation will be held at the public meeting of the Council of Agronomy on the 3rd of December 2019, at 1 p. m. in the seminar room No. 1–12 of Institute of Agriculture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry. Address: Instituto al. 1, Akademija, LT-58344 Kėdainiai distr., Lithuania.

The dissertation is available at Martynas Mažvydas National Library of Lithuania and libraries of Vytautas Magnus University and Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	8
1. LITERATŪROS ANALIZĖ	11
1.1. Biofizikiniai augalinių ląstelių elektroporacijos reiškiniai.....	11
1.1.1. Augalinė ląstelė.....	11
1.1.2. Ląstelės sienelės įtaka biomolekulių ekstrakcijai	11
1.1.3. Biologinio audinio elektrinės savybės.....	14
1.1.4. Išorinio streso įtaka medžiagų apykaitos procesams augalinėse struktūrose	18
1.1.5. Pasyvi molekulių ir jonų pernaša per protoplasto membraną.....	20
1.1.6. Aktyvi molekulių ir jonų pernaša per protoplasto membraną	21
1.1.7. Tonoplasto ir ląstelės membranos transmembraninių potencialų evoliucija	21
1.1.8. Elektroporacijos proceso biofizikinis mechanizmas	22
1.2. Technologiniai elektroporacijos veiksniai	25
1.2.1. Impulsinio elektrinio lauko stiprumas.....	25
1.2.2. Impulsinio apdorojimo trukmė ir suteiktos specifinės energijos kiekis	25
1.2.3. Elektrinio impulso parametrų įtaka elektroporacijos procesui	26
1.2.4. Pagrindiniai elektroporacijos metodo trūkumai.....	28
1.3. Impulsinio elektrinio lauko įtaka sulčių išėigai ir antocianinų ekstrakcijai iš mėlynių uogų (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	28
1.4. Impulsinio elektrinio lauko įtaka kapsaicino ir dihidrocapsaicino ekstrakcijos efektyvumui iš aitriųjų paprikų „Habanero“ (<i>Capsicum annum</i> L.)	30
1.5. Impulsinio elektrinio lauko įtaka betalainų ekstrakcijos efektyvumui iš šviežių burokėlių (<i>Beta vulgaris</i> L.)	32
1.6. Elektroporuotos ląstelės matematinis modelis	34
2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS	36
2.1. Tyrimų objektų parinkimas	36
2.2. Mėlynių uogų apdorojimas impulsiniais elektriniais laukais.....	36
2.3. Aitriųjų vienmečių paprikų apdorojimas impulsiniais elektriniais laukais.....	38
2.4. Raudonųjų burokėlių apdorojimas impulsiniais elektriniais laukais.....	39
2.5. Antocianinų nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu	40
2.6. Kapsaicinoidų nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	40
2.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas	41
2.8. Betalainų kiekybinis vertinimas spektrofotometriiniu metodu	42
2.9. Baigtinių elementų metodas	42
2.10. Impulsinio elektrinio lauko stiprumo ir suteiktos specifinės energijos kiekio apskaičiavimas	44
2.11. Ląstelių dezintegracijos lygio vertinimas.....	44

2.12. Programinė įranga	45
2.13. Tyrimo duomenų statistinis įvertinimas.....	45
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	46
3.1. Antocianinų ekstrakcijos išėiga po apdorojimo impulsiniais elektriniais laukais.....	46
3.1.1. <i>Impulsinio elektrinio lauko įtaka mėlynių sulčių išėigai.....</i>	46
3.1.2. <i>Impulsinio elektrinio lauko įtaka antocianinų ekstrakcijos efektyvumui iš mėlynių uogų.....</i>	47
3.1.3. <i>Impulsinio elektrinio lauko įtaka antocianinų kiekiui mėlynių uogų išspaudų ekstraktuose.....</i>	50
3.1.4. <i>Impulsinio elektrinio lauko įtaka mėlynių sulčių ir jų išspaudų ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui.....</i>	54
3.2. Kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėiga po apdorojimo impulsiniais elektriniais laukais.....	55
3.2.1. <i>Kiekybinis kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos vertinimas.....</i>	55
3.2.2. <i>Kokybinis kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos vertinimas.....</i>	59
3.3. Betalainų ekstrakcijos išėiga po apdorojimo impulsiniais elektriniais laukais	60
3.3.1. <i>Impulsinio elektrinio lauko įtaka betalainų ekstrakcijos efektyvumui</i>	60
3.3.2. <i>Elektrinių impulsų skaičiaus ir impulsinės srovės priklausomybė.....</i>	61
3.3.3. <i>Lašelių dezintegracijos indekso ir ekstrakto savitojo elektrinio laidumo palyginamasis vertinimas.....</i>	62
3.3.4. <i>Elektrinio lauko stiprumo ir suteiktos specifinės energijos kiekio įtaka betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijos efektyvumui</i>	67
3.3.5. <i>Elektrinio lauko stiprumo ir impulsų skaičiaus įtaka betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijos efektyvumui.....</i>	69
3.4. Matematinis elektroporuotos laštelės modelis	75
3.4.1. <i>Elektroporuotos laštelės matematinio modelio projektavimas</i>	75
3.4.2. <i>Baigtinių elementų tinklelio generavimas</i>	78
3.4.3. <i>Elektroporuotos laštelės modelio savitojo elektrinio laidumo sąlygos.....</i>	79
3.4.4. <i>Biologinės laštelės transmembraninių potencialų tyrimas</i>	81
3.4.5. <i>Elektroporacijos įtaka elektrinio lauko stiprumui ant laštelės membraną</i>	85
3.4.6. <i>Elektroporacijos proceso chronologinė analizė</i>	87
IŠVADOS	90
LITERATŪROS SĄRAŠAS	91
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	107
DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ KOPIJOS	109
SUMMARY	139
CURRICULUM VITAE	179
PADĖKA.....	180

SANTRUMPOS

ATP	Adenozin 5' trifosfatas
BEI	Betalainų ekstrakcijos išeiga
BEM	Baigtinių elementų metodas
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas
ESC	Efektyvioji skysčių chromatografija
FRAP	Geležies redukcijos antioksidacinė galia
IEL	Impulsinis elektrinis laukas
BCEI	Betacianinų ekstrakcijos išeiga
YCAP	Kapsaicinų ekstrakcijos išeiga
LAMMC	Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centras
SEK	Specifinės energijos kiekis
TAC	Bendras antocianinų kiekis
TE	Trolokso ekvivalentas
TMP	Transmembraninis potencialas
v/v	Tūrių santykis
Z _p	Ląstelių dezintegracijos indeksas

IVADAS

Augalinės žaliavos apdorojimas impulsiniais elektriniais laukais (IEL) yra vienas sparčiausiai besivystančių metodų maisto pramonėje (Puértolas ir kt., 2016). Šis metodas taikomas gaminant gyvulinės ir augalinės kilmės maisto produktus (Toepfl, 2006; Jäger, 2013). Taikant IEL metodą, galima reikšmingai padidinti biologiškai aktyvių junginių ekstrakciją (Lebovka ir kt., 2003), pakeisti biologinių audinių struktūrinės savybes (Pataro ir kt., 2011), vykdyti sulčių ir pieno produktų pasterizaciją (Arroyo ir kt., 2016). Dėl ypač trumpo apdorojimo laiko (μs – ms), IEL metodas, priešingai nei daugelis tradicinių augalinės žaliavos perdirbimo technologijų, nepasižymi žalingu terminiu poveikiu produkto kokybei (Pizzichemi, 2007). Šis technologinis privalumas augalinės žaliavos perdirbimo proceso metu leidžia išsaugoti didesnę kiekį žmogaus sveikatai naudingųjų medžiagų ir vitaminų (Azmir ir kt., 2013) bei išlaikyti natūralią galutinio produkto prekinę išvaizdą (Kannan, 2011). Nustatyta ir tai, kad IEL apdorotų vaisių sultys pasižymi net didesniu biologiškai aktyvių junginių kiekiu (Pataro ir kt., 2017). Paminėtina, kad taikant IEL metodą, proceso metu suvartojamas energijos kiekis yra net kelis kartus mažesnis negu taikant tradicines maistinės žaliavos perdirbimo technologijas (Haberl ir kt., 2013).

Vertinant aplinkosaugos požiūriu, biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijai būtina rinktis metodus, kuriems nereikia didelių organinių tirpiklių, energijos ir laiko sąnaudų (Mamidipally ir Liu, 2004; Esatbeyoglu ir kt., 2015). Todėl pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama inovatyviems ir aplinką tausojantiems ekstrakcijos metodams (Tiwari ir Cullen, 2013). Apdorojimas IEL daugeliu atžvilgiu yra efektyviausias būdas pasiekti biologiškai aktyvių junginių ekstrakciją, tačiau didelė technologinių parametru (elektrinio lauko stiprumas, suteiktos specifinės energijos kiekis (SEK) bei į žaliavą paduotų impulsų skaičius) ir biologinių veiksmų (augalinės žaliavos savitasis elektrinis laidumas, audinių osmosinis slėgis) sklaida neleidžia parinkti optimalių IEL metodo parametru, kurie būtų universaliai pritaikomi (Jäger ir Knorr, 2017).

Siekiant efektyviai padidinti biomolekulių ekstrakciją iš augalinės žaliavos, būtini nauji, platesnės apimties IEL parametru tyrimai.

Hipotezė. Tikėtina, kad, impulsinio elektrinio lauko (IEL) metodo technologinius parametrus (elektrinio lauko stiprumas, elektrinių impulsų skaičius ir suteiktas specifinės energijos kiekis) pritaikant specifinėms augalinės žaliavos savybėms (augalinės žaliavos savitasis elektrinis laidumas, audinių osmosinis slėgis), galima pasiekti optimalią biologiškai aktyvių junginių išėigą iš augalinės žaliavos.

Tyrimų tikslas – optimizuoti impulsinio elektrinio lauko (IEL) parametrus siekiant efektyviai padidinti biomolekulių ekstrakciją iš augalinės žaliavos.

Tyrimų uždaviniai:

1. Ištirti IEL sukeltos ląstelių elektroporacijos įtaką biologiškai aktyvių junginių išėgai iš mėlynių uogų (*Vaccinium myrtillus* L.), aitriųjų paprikų (*Capsicum annum* L.) ir raudonųjų burokėlių (*Beta vulgaris* L.).
2. Įvertinti esminių IEL parametrų (elektrinio lauko stiprumo, elektrinių impulsų skaičiaus ir suteiktos specifinės energijos kiekio) įtaką augalinės žaliavos elektrinėms savybėms.
3. Įvertinti IEL sukeltos augalinių ląstelių dezintegracijos įtaką biologiškai aktyvių junginių išėgai.
4. Nustatyti technologinius dėsningumus tarp IEL parametrų, audinio dezintegracijos indekso ir biologiškai aktyvių junginių išėgos.
5. Sukurti elektroporuotos ląstelės matematinį modelį, kuriuo būtų galima teoriškai įvertinti ląstelės išorinės terpės, ląstelės ir vakuolės citozolio elektrinių laidumų įtaką elektroporacijos proceso efektyvumui.

Ginamieji teiginiai:

1. Tinkamai parinkus IEL technologinius parametrus, galima vykdyti selektyvią biologiškai aktyvių junginių ekstrakciją iš augalinės žaliavos.
2. Biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijos efektyvumas labiausiai priklauso nuo elektrinio lauko stiprumo, suteiktos specifinės energijos kiekio ir impulsų skaičiaus.
3. Siekiant teisingai įvertinti skirtingų IEL parametrų įtaką augalinės žaliavos ląstelių dezintegracijai ir biologiškai aktyvių junginių išėgai, ląstelių dezintegracijos indekso rezultatus būtina palyginti su išmatuotais ekstraktų elektriniais laidumais.
4. Apdorojimo IEL metu indukuoto transmembraninio potencialo dydis ant biologinės ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto priklauso nuo ląstelės išorinės terpės, ląstelės citozolio ir vakuolės vidinės terpės elektrinio laidumo dydžių.

Mokslinis naujumas. Pirmą kartą įvertinus kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos efektyvumą iš aitriųjų paprikų vaisių, panaudojant apdorojimą IEL, nustatyti papildomi teoriniai ekstrakcijos dėsningumai. Vykdam tyrimus su burokėliais, pirmą kartą įrodyti tiesioginiai sąryšiai tarp ląstelių membranų pažeidimų lygį parodančio Z_p indekso, terpės laidumo ir bioaktyvių junginių išėgos. Sukurtas unikalus elektroporuotos ląstelės matematinis modelis, leidžiantis įvertinti ląstelės išorinės terpės, ląstelės ir vakuolės citozolių elektrinio laidumo įtaką transmembraninio potencialo indukavimui ant vakuolės tonoplasto membranos.

Praktinė darbo reikšmė. Šiame darbe gauti rezultatai gali būti pritaikomi medicinoje ir maisto pramonėje, siekiant padidinti biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijos efektyvumą, reikšmingai sutrumpinant ekstrakcijos laiką, sumažinant elektros energijos ir aplinkai kenksmingų organinių tirpiklių sąnaudas bei tikslingai panaudojant augalinės žaliavos antrinius perdirbimo produktus.

Tyrimų rezultatų aprobavimas. Disertacijos tema paskelbti trys moksliniai straipsniai: vienas straipsnis referuojamame leidinyje su citavimo indeksu duomenų bazėje *Clarivate Analytics Web of Science*, vienas referuojamame leidinyje be citavimo indekso duomenų bazėje *Clarivate Analytics Web of Science* ir vienas recenzuojamame periodiniame leidinyje.

Disertacijos tema parengta ir perskaityta dešimt pranešimų tarptautinėse konferencijose: šeši žodiniai (Airijoje, Slovėnijoje, Latvijoje, Austrijoje, Vokietijoje, Italijoje) ir keturi stendiniai (Lietuvoje, Portugalijoje, Jungtinėse Amerikos Valstijose, Prancūzijoje).

Darbo struktūra ir apimtis. Disertaciją parengta lietuvių kalba, jos apimtis 180 puslapių. Darbą sudaro įvadas, literatūros analizė, tyrimų metodai ir sąlygos, tyrimų rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas, mokslinių publikacijų disertacijos tema sąrašas, disertacijos tema paskelbtų mokslinių publikacijų kopijos, santrauka anglų kalba ir darbo autoriaus gyvenimo aprašymas. Disertacijoje yra 30 paveikslų, 8 lentelės, panaudota 190 mokslinės literatūros šaltinių.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Biofizikiniai augalinių ląstelių elektroporacijos reiškiniai

1.1.1. Augalinė ląstelė

Taikant elektroporacijos metodą, svarbu žinoti tyrimo objekto biologines ir struktūrines savybes, į kurias atsižvelgus yra parenkami atitinkami IEL parametrai. Augalinė ląstelė – tai eukariotinė ląstelė, turinti būdingą struktūrą ir funkcijas. Savo dydžiu ir struktūra augalinė ląstelė labiausiai primena gyvūninę ląstelę. Struktūriniai skirtumai susiję su tuo, kad augalinė ląstelė turi vakuolę ir chloroplastus, o ląstelės membrana yra fiziologiškai susijusi su celiuliozine sienele, ir tik gyvūninei ląstelei yra būdinga liposoma. Augalinės ląstelės, didesnės nei gyvūninės, yra didžiausios biologinės ląstelės, kurių dydis pagal ląstelių rūšį gali varijuoti nuo 10 µm iki 1000 µm (Fry, 2017). Augalinės ląstelės dydis tiesiogiai priklauso nuo brandos etapo – kuo ląstelė labiau subrendusi, tuo ji didesnė. Augalinės ląstelės dažniausiai yra kampuotos ir / ar cilindro formos. Formą augalinei ląstelei suteikia jos sienelė. Kai gyvūninė ląstelė pasidalija į dvi naujas ląsteles, kiekviena iš naujai susidariusių ląstelių gali migruoti ir pakeisti savo buvimo vietą audinyje, o pasidalijus augalinei ląstelei, abi naujos susidariusios ląstelės dėl vidurinės lamelos (ang. *middle lamella*) lieka glaudžiai sujungtos ir negali migruoti (Fry, 2017). Didžiąją dalį (iki 90 %) augalinės ląstelės vidaus užima ne citoplazma, bet vakuolė (Pierce ir Higinbotham, 1970). Vakuolė ląstelėje veikia kaip laikina saugykla, kurioje kaupiami jonai, cukrai, amino rūgštys, baltymai ir polisacharidai (Karp ir Marshall, 2013). Vakuolėje taip pat nuo likusių ląstelės organoidų yra izoliuojami toksinai, kurie išsiskiria ląstelėje metabolinių procesų metu arba yra gaunami iš aplinkos (Karp ir Marshall, 2013). Vakuolės viduje esantys junginiai sudaro hipertoniinį tirpalą, todėl per tonoplastą osmozės būdu į vakuolę intensyviai juda vandens molekulės (Karp ir Marshall, 2013). Osmozės sukurtas turguro slėgis spaudžia ląstelės membraną prie jos sienelės – taip palaikomas ląstelės tvirtumas ir padedama jai plėstis augimo metu (Karp ir Marshall, 2013). Vakuolės vidinė terpė yra rūgštinė, o būdingą pH sukuria ir palaiko ATP energiją naudojančios V tipo H⁺ baltymai „siurbliai“, kurie H⁺ jonus prieš elektrocheminį gradientą, per tonoplastą perneša į vakuolės vidų.

1.1.2. Ląstelės sienelės įtaka biomolekulių ekstrakcijai

Augalinio audinio perikarpo ląstelių (apie 80 % visų augalinių ląstelių) sienelės susideda iš pektino (~35 %), hemiceliuliozės (~25 %), celiuliozės (~30 %), mažo kiekio glikobaltymų ir tam tikro kiekio fenolinių junginių (Fry, 2017). Ląstelės sienelė susiformuoja tada, kai šie substratai yra išskiriami per protoplasto, augalinės ląstelės be sienelės, membraną į apoplastą. Šių trijų makro molekulių koncentracija keičiasi pagal augalo rūšį, ląstelės rūšį ir sienelės formavimosi stadijas.

Ląstelės vystymosi periode ląstelės sienelė yra vadinama pirmine. Kadangi pirminė sienelė yra stipriai hidratuota amorfinė struktūra, susidedanti iš hemiceliuliozės ir pektino, ji gali plėstis kartu su didėjančia ląstele (Doris ir Steer, 2001). Augalinių audinių ląstelėms subrendus ir nustojus plėstis, jų pirminės sienelės transformuojasi į antrines sienelės – storesnes ir tvirtesnes. Kita vertus, augaliniai audiniai, patiriantys kalcio deficitą, taip pat vykstant etileno biosintezei vaisiuose ir daržovėse po derliaus nuėmimo, pasižymi silpnesnėmis ląstelių sienelėmis (Haard, 1984; Watkins, 2017). Sienelės sudėtis ir struktūra taip pat keičiasi atsižvelgiant į išorinius veiksnius – aplinkos sąlygas (Karp ir Marshall, 2013).

Ląstelės sienelės funkcija yra saugoti ląstelę nuo galimų mechaninių pažeidimų bei suteikti augaliniam audiniui tvirtumo. Ląstelės sienelė augalinei ląstelei taip pat suteikia bei padeda išlaikyti jai būdingą formą ir dydį, net ir esant didelio turguro slėgio būsenoje (Lodish ir kt., 2013). Tyrimų metu buvo nustatyta, kad sienelę atskyrus ir izoliavus nuo protoplasto, šis įgauna sferinę formą, o jo dydis tampa priklausomas nuo jį supančio tirpalo ištirpusių medžiagų koncentracijos (Fry, 2017). Pažymėtina, kad ištirpusių medžiagų koncentracija augalinės ląstelės vakuolėje yra didesnė nei citozolyje, o šiame – didesnė nei apoplaste (Lodish ir kt., 2013).

Augaliniame audinyje biomolekulės ir jonai gali būti pernešami apoplastiniu ir simplastiniu keliais. Apoplastas – tai erdvė, susidedanti iš pirminės ir antrinės sienelės bei jose įsiterpusių tuščių erdvių (Delsart 2016). Nustatyta, kad apoplaste laisvai difunduoja jonai (dėl neigiamą krūvį turinčių išorinių sienelės sluoksnių lengviau difunduoja anijonai) bei molekulės, kurių molekulinė masė neviršija 10 kDa (Doris ir Steer, 2001; Delsart ir kt., 2016). Šioje sistemoje difuzijos, vykstančios tarp apoplasto ir ląstelės citozolio, efektyvumas priklauso nuo ląstelių sienelių struktūros savybių skirtingose apoplasto vietose (Fry, 2011). Simplastas – tai transportinis tinklas, per plazmodesmatą jungiantis augalinio audinio ląstelių vidų į ląstelines ertmes. Plazmodesmata – tai citoplazma užpildyti, cilindro formos kanalėliai, sujungiantys gretimų ląstelių citozolius (Karp ir Marshall, 2013). Per plazmodesmos centrą gretimų ląstelių endoplazminiai tinklai yra sujungiami siaura, tankia cilindro struktūra – desmotubule (ang. *desmotubule*) (Alberts ir kt., 2015). Per plazmodesmas endoplazminis tinklas taip pat sujungia visų augalo ląstelių branduolius (Wilson ir Hunt, 2014). Mokslininkų teigimu, įprastomis sąlygomis plazmodesma praleidžia makromolekules, kurių dydis – nuo 800 Da (Wilson ir Hunt, 2014; Alberts ir kt., 2015) iki 1000 Da (Doris ir Steer, 2001; Karp ir Marshall, 2013). Pastebėta, kad plazmodesmata gali išsiplėsti ir praleisti tam tikras (30–50 kDa) makromolekules, turinčias koduojančius baltymus (Doris ir Steer, 2001; Karp ir Marshall, 2013). Plazmodesmos kanalo skersmuo gali siekti: 20–40 nm (Alberts ir kt., 2015), 30 nm (Wilson ir Hunt, 2014) ar 30–60 nm (Karp ir Marshall, 2013), o plazmodesmos vamzdelių ilgis – iki 100 nm (Wilson ir Hunt, 2014). Tyrimo metu išsiaiškinta, kad plazmodesmata gali riboti net mažos masės molekulių judėjimą, kuris,

atsižvelgiant į plazmodesmos skersmenį, turėtų būti neribojamas, bet tikslios molekulių pernašos ribojimo priežastys per plazmodesmatą iki šiol nėra žinomos (Alberts ir kt., 2015). Plazmodesmos visiškai užsidaro ir sustabdo jonų ir molekulių pernašą tose vietose, kurios ribojasi su audinio mechaniniais pažeidimais (Wilson ir Hunt, 2014). Remiantis Wilson ir Hunt, teigtina, kad plazmodesmatoje esanti citoplazma sudaro labai mažą frakciją palyginti su šiais kanalais sujungtos gretimų ląstelių citozolio kiekiu. Manoma, kad ląstelė, turinti $1000 \mu\text{m}^3$ citoplazmos, turi tik apie 100 plazmodesmų – „kanalėlių“ (Wilson ir Hunt, 2014).

Matuojant savitąjį elektrinį laidumą ir skaičiuojant ląstelių dezintegracijos indeksą, nustatyta, kad elektrinio lauko stiprumas, būtinas ląstelių elektroporacijai pasiekti, buvo didesnis tų daržovių (baklažanas) ir vaisių (bananas, kriaušė) ląstelėms, kurios turi išsivysčiusią antrinę sienelę, o obuoliams, morkoms ir agurkų vaisiams reikėjo kur kas mažesnio elektrinio lauko stiprumo (Bazhal ir kt., 2003b). Tik vienas iki šio atliktas eksperimentas parodė sumažėjusį ląstelės sienelės laidumą po IEL apdorojimo – kai, bulvės audinyje pamatavus fluorescensinio dažo FM1–43 difuziją, buvo pastebėta, kad, praėjus 30 s po apdorojimo IEL, ląstelės sienelės laidumas sumažėjo, palyginti su kontrole (Galindo ir kt., 2008). Tačiau šis rezultatas vėliau buvo aiškinamas per silpną ir per trumpą apdorojimą IEL (Delsart 2016). Janositz ir Knorr (2010) atlikti tyrimai atskleidė, kad ląstelių suspensijoje protoplastai yra apie du kartus jautresni apdorojimui impulsiniu elektriniu lauku (IEL) nei ląstelės, kurios turėjo nepažeistą ląstelės sienelę. Aguilo-Aguayo ir kt. (2014) matavo vandens kiekio pasiskirstymą morkos griežinėlio ląstelėje (vakuolėje, citozolyje ir ląstelės sienelėje) ir nustatė, kad impulsinis elektrinis laukas padidino ląstelės sienelės pralaidumą cukrams. Vynuogių uogų odelės buvo paveiktos dviem skirtingais būdais: trumpa apdorojimo trukme (1ms), bet stipriu IEL (4 kV cm^{-1}) ir ilga apdorojimo trukme, bet silpnu IEL ($0,7 \text{ kV cm}^{-1}$). Nustatyta, kad ilgesnė apdorojimo IEL trukmė ir didesnis suteiktos specifinės energijos kiekis¹ ($31 \text{ Wh/kg} > 4 \text{ Wh/kg}$), nepaisant silpnesnio elektrinio lauko stiprumo, nulėmė didesnes visų ląstelės sienelės polisacharidinių sluoksnių pažaidas – taip padidintas laidumas vandens molekulėms suardant pektino užpildytus tarpus tarp skaidulinių hemiceliuliozės elementų (Cholet ir kt., 2014). Iširta, kad žirnių sėklas paveikus IEL, jų ląstelių sienelės suplonėja (Baier ir kt., 2015). Tai gali turėti teigiamą įtaką biomolekulių pernašai.

Apibendrinant galima teigti, kad dauguma iki šiol atliktų tyrimų rodo, jog apdorojimas IEL turi tiesioginę įtaką biomolekulių pernašai per ląstelės sienelę. Tačiau iki galo nėra aišku, ar apdorojimo IEL nulemti ląstelės sienelės pažeidimai turi reikšmingą įtaką padidėjusiai bioaktyvių junginių koncentracijai apoplaste. Darytina prielaida, kad jonų ir biomolekulių pernaša apoplasto

¹ Specifinės energijos kiekis (SEK) – tai dydis, nurodantis augalinės žaliavos apdorojimo IEL metu masės vienetui (kg) suteiktą išorinės elektrinės energijos kiekį, išreikštą džauliais (J).

sistemoje elektroporacijos proceso efektyvumą labiau paveikia nei pernašos mechanizmai, egzistuojantys augalinės ląstelės simplaste.

1.1.3. *Biologinio audinio elektrinės savybės*

Biologiniuose audiniuose elektrinio krūvio nešėjai yra teigiami (katijonai) ir neigiami (anijonai) jonai, o struktūros savitasis elektrinis laidumas priklauso nuo šių jonų koncentracijos ir difuzijos koeficiento (Ackmann ir Seitz, 1984). Visi biologiniai audiniai susideda iš ląstelių ir tarpląstelinės terpės. Augaluose tarpląstelinė terpė yra vadinama apoplastu, kuris nuo ląstelių citozolio yra atskirtas plonų (5–7 nm) lipidinių membranų. Augalinės ląstelės taip pat turi plazmodesmas – siaurus (9 nm), retai išsidėsčiusius kanalėlius, kurie tarpusavyje sujungia gretimų ląstelių citoplazmas – ląstelių elektrolitus. Tiek simplasto, tiek apoplasto cheminė sudėtis yra panaši ir susideda iš jonų ir įvairių molekulių, todėl abi aplinkos elektriniu požiūriu gali būti suprantamos kaip elektrolitai. Šių elektrolitais užpildytų aplinkų klampumas tiesiogiai priklauso nuo temperatūros (Ivorra, 2015).

Vertinant elektriniu požiūriu, ląstelė yra kur kas sudėtingesnis darinys nei apoplastas, nes jos viduje, be jonų ir krūvį turinčių molekulių (baltymų, organinių rūgščių ir kt.), taip pat funkcionuoja ir membraninės struktūros (vakuolė, plastidės, mitochondrijos, endoplazminis tinklas ir kt.), pasižyminčios skirtingomis elektrinėmis savybėmis (Lew, 2012). Kitaip tariant, viduląstelinė aplinka turi tiek laidininkams, tiek dielektrikams būdingų savybių (Ivorra, 2015). Remiantis elektrinių grandinių teorija, kai laidininkas yra patalpintas elektriniame lauke, jo viduje vyksta laisvųjų krūvininkų judėjimas – teka elektrinė srovė – tol, kol veikia sukurtas išorinis elektrinis laukas. Tačiau išorinis elektrinis laukas neindukuoja vidinio elektrinio lauko laidininkuose (Miklavčič ir Pavšelj, 2016):

$$E_{vid} = 0; \quad (1.1)$$

čia E_{vid} – laidininke indukuotas elektrinis laukas, ($V\ m^{-1}$).

O dielektrikai turi polinių molekulių, kurių teigiamų ir neigiamų krūvininkų centrai nesutampa skirtingo molekule sudarančių atomų krūvių santykio atveju. Tada sukurtas išorinis elektrinis laukas orientuoja (poliarizuoja) šių molekulių dipolius ir sukuria vidinį elektrinį lauką.

Išorinio elektrinio lauko medžiagoje sukurtas vidinis elektrinis laukas redukuojasi dėl dipolių poliarizacijos sukurto priešingos krypties elektrinio lauko (Miklavčič ir Pavšelj, 2016):

$$E_{vid} = E_{iš} - E_p; \quad (1.2)$$

čia E_{vid} – dielektrike indukuotas elektrinis laukas, $E_{iš}$ – išorinis elektrinis laukas, E_p – poliarizacijos sukurtas elektrinis laukas.

Elektrinio lauko stiprumą medžiagoje nulemia santykinė dielektrinė skvarba, o šis sąryšis išreiškiamas santykiu (Miklavčič ir Pavšelj, 2016):

$$E_{vid} = \frac{E_{iš}}{\varepsilon_r}; \quad (1.3)$$

čia ε_r – santykinė dielektrinė skvarba, (F/m).

Skvarba – tai fizikinis dydis, apibūdinantis medžiagos gebėjimą kaupti energiją (Grimnes ir Martinsen, 2008). Biologinės struktūros, be gebėjimo kaupti energiją, taip pat pasižymi specifiniu elektriniu laidumu σ , kuris atitinka menamą skvarbos dedamąją (Pliquett, 2017). Elektroporacijos atveju biologinės medžiagos skvarbumas įvertinamas santykinė kompleksine skvarba, kuri aprašoma lygtimi (Miklavčič ir Pavšelj, 2016):

$$\varepsilon^* = \frac{\varepsilon_r - j\sigma}{\omega \cdot \varepsilon_0}; \quad (1.4)$$

čia ε_r – santykinė dielektrinė konstanta, kuri atspindi medžiagos, patalpintos tarp elektrodų, elektrinį talpumą; σ – savitasis elektrinis laidumas ($S \cdot m^{-1}$); ω – kampinis dažnis ($\omega = 2\pi f$); ε_0 – vakumo dielektrinė skvarba (F/m); $j = \sqrt{-1}$.

Biologinės struktūros dielektrinį skvarbumą taip pat apibūdina ir fazės poslinkis (Ivorra, 2015):

$$\varphi = \arctan\left(\frac{\omega \cdot \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0}{\sigma}\right); \quad (1.5)$$

čia σ – savitasis elektrinis laidumas.

Atsižvelgiant į ląstelės ir jos išorinės terpės elektrines savybes, galima teigti, kad tiek gyvūniniai, tiek augaliniai audiniai elektriniu požiūriu yra sudaryti iš tarpusavyje sujungtų struktūrų *laidininkas – dielektrikas – laidininkas* (Lew, 2012). Elektrinių grandinių teorijoje tokios struktūros dar vadinamos elektrinio krūvio kondensatoriais.

Kondensatoriuje sukauptas krūvio kiekis apskaičiuojamas lygtimi (Ivorra, 2015):

:

$$Q = C \cdot U; \quad (1.6)$$

čia Q – krūvio kiekis (F x V); C – elektrinis talpumas (F); U – potencialų skirtumas tarp dviejų lygiagrečių laidinukų, atskirtų dielektriko (V).

Elektrinis talpumas – tai dydis, apibūdinantis dielektriko savybę kaupti krūvį (Miklavčič ir Pavšelj, 2016):

:

$$C = \frac{\varepsilon \cdot A}{d} = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot \frac{A}{d}; \quad (1.7)$$

čia C – elektrinis talpumas (F), ε – dielektriko skvarba (F/m); A – plotas tarp dviejų lygiagrečių laidininkų (m^2); d – atstumas tarp laidininkų (dielektriko storis) (m), ε_r – santykinė dielektriko skvarba (dielektrikų visada didesnė už 1); ε_0 – vakuomo dielektrinė skvarba ($8,8541 \times 10^{-12}$, (F/m).

Kai augalinis audinys yra paveikiamas elektrinio lauko, tada juo tekanti kintanti elektrinė srovė sukelia laisvųjų krūvininkų (jonų) poliarizaciją ir relaksaciją, o šie vienas po kito vykstantys procesai sumažina paduodamo impulso amplitudę ir pakeičia fazės kampą tarp įtampos ir per struktūrą praėjusios elektrinės srovės (Repo ir kt., 2000). Augalinės ląstelės poliarizacija priklauso nuo biologinių audinio savybių, taip pat nuo paduodamo signalo dažnio, sukuriama elektrinio lauko stiprumo, jonų koncentracijos simplaste ir apoplaste bei temperatūros. Kuo mažesnis ląstelės dydis, tuo aukštesnio išorinio elektrinio signalo dažnio reikia norint pasiekti laisvųjų krūvininkų poliarizaciją (Lew, 2012).

Žinomi trys poliarizacijos mechanizmai, nulemiantys skirtingą biologinės medžiagos laidumą elektrinei srovei: alfa, beta ir gama dispersijos (Miklavčič ir Pavšelj, 2016).

Alfa dispersija ($f = 1 - 10^4$ Hz) yra susijusi su elektrodų poliarizacijos metu išsilaisvinusių laisvųjų jonų (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) judėjimu išilgai ląstelių membranų paviršių.

Beta dispersija ($f = 10^4 - 10^8$ Hz) atspindi ląstelių membranų poliarizaciją, elektrinių krūvių pasiskirstymą membranų paviršiuose dėl skirtingų laisvųjų jonų koncentracijos ląstelės citoplazmoje bei tarpląsteliniuose skysčiuose. Ši dispersija įvyksta tarpinėje dažnių juostos srityje tarp žemų ir aukštų dažnių ir yra labiausiai pastebima po IEL apdoravimo matuojant impedansą, kai norima apskaičiuoti struktūros dezintegracijos indeksą.

Impedansas – tai kompleksinis dydis, apibūdinantis medžiagos priešinamasi laisvųjų krūvininkų judėjimui laidininku. Impedansas susideda iš realios ir menamos dedamųjų. Pirmoji nusako elektrinės energijos nuostolius, t. y. šios energijos transformaciją į šiluminę, šviesos, cheminę ar mechaninę energijas, o antroji vaizduoja energijos susikaupimą dėl talpumo ir induktyvumo elementų. Šis dydis apskaičiuojamas lygtimi (Ivorra, 2015):

$$Z = R + j \cdot X ; \quad (1.8)$$

čia Z – kompleksinė varža arba impedansas (Ω); R – medžiagos elektrinė varža (Ω); j – menama dedamoji ($\sqrt{-1}$); X – reaktansas (Ω).

Matuojant biologinių struktūrų impedansą, šis dydis taip pat gali būti apskaičiuojamas lygtimi (Ivorra, 2015):

$$Z_c = \frac{\pi \cdot f \cdot C}{2} ; \quad (1.9)$$

čia π – $22/7$, f – dažnis (Hz), C – elektrinis talpumas (F).

Gama dispersija ($f > 10^9$ Hz) įvyksta dėl molekulių (vandens, baltymų), kurioms būdingas nuolatinis dipolio momentas, judėjimo – poliarizacijos.

Žemų dažnių srovės ($f = 1 - 10^4$ Hz) biologinėje medžiagoje teka tarpląsteliniais skysčiais, esančiais tarp nepažeistų ląstelių membranų, o tekant aukštų dažnių srovėms ($f > 10^9$ Hz) ląstelių membranos talpiškai „užsitrumpina“ – tai itin padidina jų elektrinį laidumą (Yarmush ir kt., 2014). Didėjant ląstelių laidumui, jų elektrinis krūvis mažėja, energijos ląstelių membranose sukaupiama vis mažiau, tai lemia sumažėjusią šių ląstelių dielektrinę skvarbą (Pliquett, 2017). Dėl poliarizacijos reiškinio žemo dažnio elektrinė srovė gali tekėti tik apoplaste. Kitaip tariant, membranos lipidų dvisluoksnis, apdorojamas išorinio elektrinio lauko, veikia kaip laisvųjų krūvininkų kondensatorius, abipus membranos vyksta laisvųjų krūvininkų poliarizacija ir žemo dažnio elektrinė srovė per ją neprateka. Tačiau kai paduodamos elektrinės srovės dažnis yra pakankamai aukštas (>1 MHz), laisvieji krūvininkai nespėja orientuotis (poliarizuotis) elektriniame lauke ir ląstelės membrana tampa laidu kintančiai elektros srovei (Ozier-Lafontaine ir Bajazet, 2005).

Biologinės ląstelės membrana yra sudaryta iš fosfolipidų dvisluoksnio ir jame įsiterpusių baltymų, tad savitasis membranos elektrinis laidumas yra labai mažas ($\sigma = 1/10^8 \Omega/m$), o fosfolipidinė membrana savo elektrinėmis savybėmis atitinka dielektrikus (remiantis Weaver (1995), biologinės membranos dielektrinė konstanta yra 2–3) (Atefi ir kt., 2012). Tačiau savitasis elektrinis laidumas yra medžiagos savybė, todėl šio dydžio skaitinė vertė skiriasi pagal medžiagą ir negali būti technologiškai valdoma. Vis dėlto elektroporacijos atveju galima valdyti biologine medžiaga pratekančios elektrinės srovės arba suteiktos specifinės energijos kiekį. Norint tą pasiekti, būtina atsižvelgti į analogišką ir grandinių teorijoje naudojamą dydį, elektrinį laidumą arba konduktansą. Konduktansas – tai dydis, apibūdinantis medžiagos, esančios tarp dviejų skirtingo krūvio potencialų (teigiamiesio ir neigiamiesio), būseną praleisti laisvuosius krūvininkus, judančius iš teigiamiesio potencialo neigiamiesio link. Šis dydis yra atvirkščias elektrinei varžai (R) ir išreiškiamas santykiu (Grimnes ir Martinsen, 2008):

$$G = \frac{i}{v} = \frac{1}{R}, (\Omega^{-1} \text{ arba } S) \quad (1.10)$$

čia G – elektrinis laidumas arba konduktansas, (Ω^{-1} arba S); v – potencialų skirtumas (elektrinė įtampa), (V), i – elektrinė srovė, (A); R – elektrinė varža, (Ω).

Elektrinis medžiagos laidumas taip pat gali būti išreiškiamas per kompleksinį, medžiagos laidumą apibūdinantį dydį admitansą (Y) (Grimnes ir Martinsen, 2008):

$$G = |Y| \cos(\angle Y), \quad (1.11)$$

čia G – elektrinis laidumas arba konduktansas, (Ω^{-1} arba S); Y – admitansas, (Ω^{-1} arba S); $\angle Y$ – admitanso fazės kampas (nuo -1 iki $+90^\circ$).

Admitansas – tai dydis, apibūdinantis laidininko gebėjimą priimti kryptingą laisvųjų krūvininkų judėjimą. Šis dydis priešingas kompleksinei varžai (Z) ir išreiškiamas santykiu (Grimnes ir Martinsen, 2008):

$$Y = \frac{1}{Z}, \quad (1.12)$$

čia Y – admitansas, (Ω^{-1} arba S); Z – kompleksinė varža arba impedansas, (Ω).

1.1.4. Išorinio streso įtaka medžiagų apykaitos procesams augalinėse struktūrose

Nustatyta, kad po derliaus nuėmimo, laikymo ir saugojimo laikotarpiu vaisiuose ir daržovėse vyksta tiek katabolinės (degradacijos), tiek anabolinės (sintezės) reakcijos (Haard, 1984) – sintetiniai pirminiai ir antriniai medžiagų apykaitos produktai (Balasa, 2014). Vaisiai ir daržovės yra skirstomi į klimakterinius, kuriuose kvėpavimo reakcijos po derliaus nuėmimo tampa intensyvesnės, ir neklimakterinius, kuriuose šios reakcijos nėra intensyvios. Klimakteriniams priskiriami obuoliai, avokadai, slyvos, svarainiai, pomidorai, kriaušės ir kt., neklimakteriniams – juodieji serbentai, vyšnios, agurkai, vynuogės, citrinos, alyvuogės, paprikos, avietės, braškės ir kt. (DeLong, 2017). Išimtis – mėlynių uogos, kurios turi abiem grupėms būdingų savybių (Kader, 2002). Klimakteriniuose vaisiuose kvėpavimo reakcijos suintensyvėja, kad būtų užbaigtas nokimo procesas ir pasiekta būdinga struktūra, spalva, skonio ir kvapo savybės, aprūpinant ląsteles reikiamu energijos kiekiu (Hulme ir kt., 1964a). Laikomi ir saugomi vaisiai ir daržovės neturi nuolatinio vandens ir maisto medžiagų tiekimo iš dirvožemio bei dėl atskirties nuo lapų negali toliau sintetinti angliavandenių (DeLong, 2017). Siekiant palaikyti tolimesnį ląstelių gyvybingumą, medžiagų apykaitos procesų metu naudojamos augimo ir brandos laikotarpiu sukauptos angliavandenių, lipidų ir baltymų atsargos (DeLong, 2017).

Basra teigimu, tos pačios rūšies augalai, kurie vystosi ir auga skirtingose aplinkose, yra nevienodai jautrūs išoriniam stresui (Basra, 1994). Augalų patiriamas stresas yra skirstomas į biotinį ir abiotinį. Biotinis stresas – tai stresas, kylantis dėl biologinių priežasčių, o abiotinis – dėl išorinės aplinkos veiksnių. Pagrindiniai abiotinio streso faktoriai yra ultravioletiniai spinduliai, karštis, šaltis, sunkieji metalai, herbicidai ir aplinką teršiančios medžiagos. Buvo pastebėta, kad išorinis stresas gali paskatinti įvairių biologiškai aktyvių junginių (antrinių metabolitų) sintezę vaisiuose, daržovėse ir uogose po derliaus nuėmimo (Padda ir Picha, 2008; Ruiz-García ir Gómez-Plaza, 2013). Antrinių medžiagų apykaitos produktų kiekis augaliniuose audiniuose priklauso nuo augalo rūšies, jo išsivystymo bei nuo patiriamo išorinio streso trukmės (Vasconsuelo ir Boland, 2007). Išorinio streso kiekis galintis pasiekti didžiausią antrinių medžiagų apykaitos produktų

išsiskyrimą, yra individualus kiekvienai augalų rūšiai (Dörnenburg ir Knorr, 1993; Vasconsuelo ir Boland, 2007). Vaisiaus subrendimo laipsnis taip pat veikia abiotinio streso toleranciją (Romero ir kt., 2009). Tad galima daryti išvadą, kad tolerancija abiotiniam stresui susijusi su augalo išsivystymo stadija (Balasa, 2014). Mokslininkų tyrimais buvo ištirta, kad kiekvienas iš kelių patiriamų stresinių faktorių veikia individualiai į augalo biologinį atsaką (Cisneros-Zevallos, 2003; Saltveit ir kt., 2005). Tyrimų metu pastebėta, kad temperatūros sukeltas stresas padidino polifenolinių junginių ir antioksidantų kiekį braškių, aviečių mėlynių uogose. 8 dienas palaikius tam tikroje temperatūroje, didesnis polifenolinių junginių ir antioksidantų kiekis buvo pastebėtas esant aukštesnėms (+20 °C ir +30 °C) nei esant žemesnėms (0 °C ir +10 °C) laikymo temperatūroms (Kalt ir kt., 1999). Nustatytas fenolių kiekio padidėjimas batatuose ir obuolių vaisiuose, kurie paprastai nėra jautrūs žemų temperatūrų stresui (Padda ir Picha, 2008). Ultravioletiniai spinduliai padidino antocianino kiekį braškių uogose, obuoliuose ir mangų vaisiuose (Higashio ir kt., 2005; González-Aguilar ir kt., 2007).

Pastaraisiais metais, kaip išorinio streso agentai, paskatinantys antrinių medžiagų apykaitos produktų sintezę, yra naudojamos perspektyviausios maistinės žaliavos apdorojimo technologijos: impulsinis elektrinis laukas, aukštas slėgis ir ultragarsas (Dörnenburg ir Knorr, 1993). Buvo pastebėta, kad žemų temperatūrų sukeltas stresas ir impulsinio elektrinio lauko apdorojimas panašiai veikia laisvųjų radikalų formavimąsi, todėl kai kurie autoriai apdorojimą IEL priskiria abiotiniui stresui (Sabri, 1997). Impulsiniu elektriniu lauku padidinus biologiškai naudingų junginių ekstrakcijos efektyvumą, būtina atsižvelgti ir į galimai didesnę žalingų, antrinių medžiagų apykaitos produktų kiekį ekstrakto (Balasa, 2014). Tiriant augalinės struktūros elastingumą, buvo nustatyta, kad išoriniam stresui viršijus tam tikrą lygį, augalinės ląstelės patiria negrįžtamus pažeidimus (Anten, 2006). Per didelis IEL intensyvumas taip pat sukelia negrįžtamus augalinių ląstelių pažeidimus. Tyrimų metu išsiaiškinta, kad IEL intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas bendrai polifenolinių junginių koncentracijai tirtuose obuoliuose (*Malus domestica*) iki tam tikros IEL intensyvumo vertės (Balasa, 2014). Dėl mažesnių ląstelių vaisiaus eksokarpui reikia intensyvesnio apdorojimo IEL nei mesokarpui, norint pasiekti tokią pat polifenolinių junginių koncentraciją po išorinio streso sukeltos antrinių medžiagų apykaitos produktų sintezės (Balasa, 2014). IEL intensyvumas, kuriuo pasiekama negrįžtama ląstelių elektroporacija – viršijama streso riba, atsiskleidė per sumažėjusią polifenolinių junginių koncentraciją (Balasa, 2014). Apibendrinant, galima teigti, jog augalinės žaliavos apdorojimas IEL, kaip abiotinio streso agentas, skatinantis antrinių medžiagų apykaitos produktų išsiskyrimą iš biologinių struktūrų, iki šiol nėra optimizuotas.

1.1.5. Pasyvi molekulių ir jonų pernaša per protoplasto membraną

Pasyvi molekulių ir jonų pernaša gali vykti paprastosios difuzijos būdu, per vienos krypties integrinius baltymus (ang. *uniporter*) ir per jonų kanalus. Abiejų rūšių baltymai jautrūs išoriniam sujaudinimui.

Difuzijos būdu per ląstelės lipidinį dvisluoksnį laisvai gali judėti tik dujos (O_2 , CO_2 , NH_3) ar mažos, hidrofobinės, krūvio neturinčios polinės molekulės (etanolis, karbamidas, sočiosios riebalų rūgštys). Vandens jonai difunduoja prisijungę prie vandens molekulių, o jų pernašos koeficientas priklauso nuo fosfolipidinių grandinėlių ilgio difuzijos srityje. Vandens jonų pernašos koeficientas svyruoja nuo $2,4 \times 10^{-2}$ cm/s, pro trumpų (14 CH jungčių) hidrofobinių grandinėlių sritis iki 5×10^{-3} cm/s pro ilgų (24 CH jungtys) hidrofobinių grandinėlių sritis (Paula ir kt., 1996).

Vienos krypties integriniai baltymai praleidžia tik tam tikros rūšies hidrofiline molekules ar jonus į ląstelės vidų arba išorę pagal koncentracijos arba elektrocheminį gradientą (White, 2017).

Transportiniai baltymai – jonų „kanalai“ (ang. *voltage-gated channels*, *ligand-gated channels*, *mechanically-gated channels*) veikia kaip atsakas į išorinį dirgiklį (osmosinis slėgis, garso bangos, prisilietimas, gravitacija, tempimas, lenkimas) ir pagreitina tam tikros rūšies jonų (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^-) judėjimą pagal elektrocheminį gradientą. Šie baltymai yra aukšto atrankumo tam tikram jonui, gali staiga atsiverti ir užsiverti, o vienas baltyminis kanalas per sekundę gali praleisti apie 100 milijonų tam tikros rūšies jonų. Šių baltymų vykdoma pernaša yra greičiausias iš visų iki šiol atrastų ir vykdomų pernašos mechanizmų tarp biologinės ląstelės vidaus ir išorės (Alberts ir kt., 2015). Užsitęsęs išorinis elektrinis arba cheminis stimuliavimas daugumą baltymų kanalų išveda į neaktyvią būseną – baltymas „užsidaro“ ir sustabdo jonų srauto judėjimą. Baltyminis kanalas pradeda normaliai funkcionuoti ir grįžta į aktyvią būseną tik pasibaigus šiam užsitęsusiam stimuliavimui (Alberts ir kt., 2015). Elektriniam stimului jautrūs baltymai „kanalai“ dažniausiai aptinkami gyvūnų raumenų ar nervų įvairiuose mikroorganizmuose bei tam tikrų augalo organų ląstelėse, vykdančiose mechaninį judėjimą. Šie integriniai baltymai taip pat egzistuoja bei veikia ląstelėse, kurios nėra jautrios elektriniam stimului (Alberts ir kt., 2015). Tai buvo įrodyta taikant *Patch-clamp* metodą, atliekant Na^+ katijonų srovės matavimus. Pastebėta, kad Na^+ baltymai kanalai atsidaro ir užsiveria labai greitai, todėl katijonų srauto judėjimo greitis pasiekia didžiausią galimą vertę iš karto baltymui atsidarius, o baltymui užsidarius šių katijonų judėjimas tuojau pat nutrūksta (Karp, 2013).

Voltage-gated K^+ kanalai augaluose padeda išlaikyti tam tikrą druskų ir vandens balansą – taip reguliuojamas ląstelės tūris. Augalinių ląstelių membranos turi daug skirtingų K^+ baltymų-

kanalų, kurie atsidaro ir užsidaro, atsižvelgiant į tam tikros vertės transmembraninį potencialų skirtumą (Karp, 2013).

1.1.6. Aktyvi molekulių ir jonų pernaša per protoplasto membraną

Aktyvi pernaša yra skirstoma į pirminę ir antrinę. Pirminės pernašos metu membranos baltymai „siurbliai“ per membranos lipidinį dvisluoksnį perneša tam tikrus jonus arba mažas, hidrofilines molekules prieš elektrocheminį gradientą, pasinaudodami laisva energija, išsiskyrusia po ATP hidrolizės. O antrinę aktyvią pernašą vykdo baltymai simporteriai (ang. *symporters*) ir antiporteriai (ang. *antiporters*), kurie nenaudoja ATP energijos. Baltymai simporteriai paskatina, katalizuoja tam tikros hidrofilinės molekulės arba jono (White, 2017) judėjimą į ląstelę prieš koncentracijos gradientą, pasinaudodami H⁺ jonų (augaluose) judėjimu į ląstelę pagal elektrocheminį gradientą. H⁺ jonai, simporteriais judėdami į augalinę ląstelę pagal elektrocheminį gradientą, kartu įneša sacharozę, amino rūgštis ir nitratus (Lodish ir kt., 2013).

Baltymas antiporteris katalizuoja tam tikros hidrofilinės molekulės arba jono (White, 2017) judėjimą iš ląstelės prieš koncentracijos gradientą, pasinaudodamas H⁺ jonų (augaluose) judėjimu į ląstelę pagal elektrocheminį gradientą.

1.1.7. Tonoplasto ir ląstelės membranos transmembraninių potencialų evoliucija

Nustatyta, kad ant gyvūnų ląstelių membranų esantis transmembraninio ramybės potencialo dydis didžiaja dalimi priklauso nuo Na⁺/K⁺ baltymų „siurblių“ ir K⁺ baltymų „kanalų“. Šie baltymai „siurbliai“, panaudodami ATP energiją, iš ląstelės citoplazmos į ląstelės tarpląstelinį skystį (Na⁺ koncentracijos gradiento didėjimo kryptimi) išneša Na⁺ jonus, o į ląstelės citozolį įneša K⁺ jonus, taip priverstinai sukurdami didesnę K⁺ koncentracijos gradientą ląstelės viduje, o ne jos išorėje. Kiekvienas aktyvus Na⁺/K⁺ baltymas „siurblys“ vieno ciklo metu iš ląstelės išneša 3 Na⁺ jonus, į ląstelę įnešdamas 2 K⁺ jonus, todėl po tam tikro laiko kalio jonų koncentracijos gradiento kryptis pasikeičia, t. y. K⁺ jonų koncentracija ląstelėje tampa didesnė nei jos išorėje, o šių jonų srautas K⁺ jonų baltymus „kanalus“ priverčia judėti priešinga kryptimi (pagal K⁺ koncentracijos gradientą) į ląstelės išorę. Ši kalio ir natrio jonų pernaša vyksta iki to momento, kol abipus membranos pasiekama K⁺ jonų koncentracijos gradientų pusiausvyros būseną. Na⁺/K⁺ baltymai „siurbliai“ citoplazmoje kuria teigiamų krūvininkų deficitą (3 Na⁺ jonai į ląstelės išorę, 2 K⁺ jonai į ląstelės vidų), todėl bendra ląstelės citoplazmos teigiamų jonų koncentracija ciklo pabaigoje tampa mažesnė nei neigiamų, o ląstelės citoplazma įgyja neigiamą krūvį, tada tarpląsteliniam skystyje teigiamų krūvininkų lieka daugiau nei neigiamų ir sukuriamas teigiamas potencialas.

Natrio ir kalio jonų pernaša per ląstelės membranos baltymus „siurblius“ ir jonų kanalus itin veikia ramybės potencialo susidarymą ant gyvūnų ląstelių membranų. Augalų, grybų ir bakterijų

ląstelių atveju šis potencialų skirtumą labiausiai nulemia H^+ jonų judėjimas iš ląstelės vidaus į jos išorę (Lodish ir kt., 2013).

Laisvųjų vandenilio jonų pernašą per ląsteles ir jos vakuolės membranas vykdo ATP energiją naudojančys $V-H^+$ baltymai „siurbliai“ (V – nuo žodžio vakuolinis) ir pirofosfatą sintetinantys H^+ baltymai „siurbliai“ (vakuolėse); literatūroje šie baltymai dar vadinami „protonų siurbliais“. H^+ jonų pernašos iš citoplazmos į tarpląstelinį skystį atveju, kiekvienas $V-H^+$ baltymas „siurblys“ iš citoplazmos į ląstelės išorę, vieno ciklo metu, išneša 2 H^+ jonus, o pernašos procesas vyksta iki momento, kol, susidarius koncentracijos gradientų skirtumui, prireikia tokio laisvosios ATP energijos kiekio, kurio ląstelė jau negali užtikrinti. Tada laisvųjų krūvininkų deficitas citoplazmoje sukuria sąlygą susidaryti neigiamam ramybės potencialo skirtumui ant augalo membranos. Pastebėta, kad, augalinių ląstelių membranų atveju, ramybės potencialų skirtumas dažnai būna šiek tiek didesnis nei gyvūnų ląstelėse ir matuojamas intervale nuo -80 iki 230 mV. Manytina, kad šis skirtumas gaunamas dėl didesnių ląstelių ir ląstelių viduje esančio didesnio laisvųjų krūvininkų skaičiaus.

Ramybės potencialų skirtumas ant vakuolės membranos (tonoplasto) yra sukuriamas $V-H^+$ baltymų „siurblių“ ir pirofosfatą sintetinančių H^+ baltymų – „siurblių“, kurie perneša H^+ jonus (vienas $V-H^+$ baltymas „siurblys“ ciklo metu perneša 2 H^+ jonus, o vienas pirofosfatą sintetinantis H^+ baltymas „siurblys“ perneša 1 H^+ joną) iš ląstelės citoplazmos į vakuolės vidų (Lodish ir kt., 2013). Šis procesas vyksta analogiškai protonų pernašai per ląstelės membraną tol, kol, vakuolės viduje susidarius H^+ koncentracijai, prireikia didelių ATP energijos kiekių H^+ pernašai į vakuolės vidinę erdvę. Tada ląstelių membranose yra indentifikuojami trys protonų siurblių tipai: plazminės membranos $P-H^+-ATP$ fazė, vakuolės $V-H^+ATP$ fazė ir vakuolės H^+ pirofosfazė (Palmgren, 2001). Kiek mažiau membranos ir tonoplasto ramybės potencialų skirtumo susidarymą veikia anijonų kanalai, Cl^- ir NO_3^- .

1.1.8. Elektroporacijos proceso biofizikinis mechanizmas

Jarozeski ir kt. (2000) manymu, išorinis elektrinis laukas membranoje sukuria potencialų skirtumą. Šis potencialų skirtumas nėra vienodas visame membranos paviršiuje. Didžiausias potencialų skirtumas pasiekiamas tose membranos vietose, kurios yra arčiau elektrodų paviršiaus (Teissie, 2013). Tam įtakos turi ir ląstelės orientacija elektrinio lauko linijų atžvilgiu. Nustatyta, kad kuo didesnė ląstelė yra veikiama IEL, tuo didesnis jos paviršiaus plotas būna elektroporuojamas (Kinosita ir Tsong, 1980). Taigi, didesnės ląstelės yra jautresnės apdorojimui elektriniu lauku, o indukuoto potencialo dydis priklauso nuo ląstelės skersmens. Į šiuos aspektus būtina atsižvelgti parenkant išorinio elektrinio lauko stiprumą.

Indukuotas transmembraninis potencialų skirtumas ant sferos formos ląstelės homogeniškame elektriniame lauke, kurio apdorojimo trukmė ilgesnė nei keli šimtai mikrosekundžių, išreiškiamas Švano lygtimi (Schwan, 1957):

$$\Delta\Phi_m = f \cdot R \cdot E \cdot \cos(\theta); \quad (1.13)$$

čia E – išorinio elektrinio lauko stipris ($V \cdot m^{-1}$); R – ląstelės spindulys (μm); θ – kampas, matuojamas tarp elektrinio lauko krypties ir ląstelės normalės ($0-0^\circ$, $0-180^\circ$). Konstanta f – geometrinis faktorius, kuris sferos formos ląstelėms lygus 1,5, o cilindrinės formos ląstelėms lygus 1.

Norint apskaičiuoti transmembraninį potencialą sferos formos ląstelėms, kai elektriniam laukui sukurti naudojamas sinusinis signalas (impulso užaugimo greitis $<1s$), kurio dažnis mažesnis nei 1 MHz arba stačiakampis impulsas, kurio trukmė didesnė nei $1\mu s$, naudojama pirmos eilės Schwano lygties išraiška (Pauly ir Schwan, 1959):

$$\Delta\Phi_m = f \cdot R \cdot E \cdot \cos \theta \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right)\right); \quad (1.14)$$

čia τ_m – laiko konstanta, apibrėžianti membranos užsikrovimo trukmę:

$$\tau_m = \frac{R \cdot \varepsilon_m}{2 \cdot d \cdot \frac{\sigma_i \cdot \sigma_e}{\sigma_i \cdot 2 \cdot \sigma_e} + R \cdot \sigma_m} \quad (1.15)$$

čia σ_i , σ_e , σ_m – ląstelės citoplazmos, ląstelės membranos ir terpės, kurioje yra ląstelė, savitasis elektrinis laidumas; ε_m – ląstelės membranos dielektrinė skvarba; d – membranos storis; R – ląstelės spindulys.

Membranos įsikrovimo laiko konstanta priklauso nuo ląstelės spindulio. Kai ląstelės spindulys matuojamas mikro metrais, tai $\tau_m < 1\mu s$, kai ląstelės didesnės, tai $\tau_m > 1\mu s$ (Tsong 1991).

Tam tikroje ląstelės membranos vietoje transmembraniniam potencialui pasiekus kritinę vertę, įvyksta elektroporacijos reiškinys (Bernhardt ir Pauly, 1973). Įvairiais skaičiavimais kritinė potencialų skirtumo riba svyruoja nuo 0,4 iki 1V (Teissie, 1993; Weaver, 2003). Transmembraninio potencialo amplitudinė vertė susideda iš ramybės potencialo ir išorinio elektrinio lauko sukulto indukuoto potencialo sumos (Teissie, 2013). Ramybės potencialo susidarymas priklauso nuo teigiamų ir neigiamų jonų tam tikro santykio biologinės ląstelės viduje bei kitų mechanizmų, kurie plačiau aptarti poskyryje 1.1.7. Šio potencialo dydis gyvūnų ląstelių citoplazmoje svyruoja nuo -20 mV iki -120 mV (Alberts ir kt., 2015), o augalų ląstelių citoplazmoje – nuo -80 mV iki -230 mV. Pažymėtina, kad ramybės potencialo elektroneigiamumas yra bendrai priimtas atsižvelgiant į ląstelės išorėje esantį potencialą. Tyrimai parodė, kad ramybės potencialas, esantis ant žinduolių ląstelių mitochondrijų membranų, yra apie du kartus didesnis nei ant ląstelės membranos ir gali svyruoti nuo -150 mV iki -200 mV (Palmeira ir Wallace, 1997; Leducq ir kt., 1998). Tai suponuoja prielaidą, kad, norint pasiekti kritinį

elektroporacijos potencialą ant mitochondrijos membranos, galima indukuoti silpnesnį išorinį elektrinį lauką. Eksperimentiškai išmatavus žaliųjų dumblių ląstelės membranos ir tonoplasto ramybės potencialo vertes paaiškėjo, kad šie potencialai yra gana panašūs ir beveik nesiskiria, atitinkamai -109 mV ir -111 mV (Bethmann ir kt., 1995). Panašūs duomenys buvo gauti išmatavus ramybės potencialus ant miežio sėklos ląstelės membranos ir tonoplasto. Išsiaiškinta, kad ląstelės membranos ramybės potencialas yra apie -103 mV, o tonoplasto – apie -84 mV (Walker, 1976). Todėl labai tikėtina, kad, priešingai nei gyvūnų ląstelių atveju, augalinių ląstelių vidiniam organoidui vakuolei, norint pasiekti elektroporaciją, reikia panašaus impulsinio elektrinio lauko stiprumo, kaip ir išorinei ląstelės membranai.

Elektroporacijos proceso kinetika yra aiškinama tuo, kad, gyvą biologinę ląstelę veikiant trumpais (ns – ms) elektriniais impulsais, jos membranoje formuojasi hidrofiliinės fosfolipidų poros (Šatkauskas ir kt., 2012). Manoma, kad hidrofiliinės poros susiformuoja iš hidrofobinių porų, kurios spontaniškai atsiranda dėl ląstelės membranos fosfolipidų svyravimų. Hidrofobinės poros virsta hidrofiliinėmis, kai porų energijų santykis pasiekia tam tikrą vertę (Saulis ir Venslauskas, 1993). Remiantis šiuo modeliu teigiama, kad hidrofobinių porų virtimas hidrofiliinėmis priklauso nuo išorinio elektrinio lauko sukkelto indukuoto transmembraninio potencialo didumo.

Porų formavimasis susidaro iš trijų etapų: porų susidarymas, porų plėtimasis ir porų užsivėrimas. Teigiama, kad laikinos laidžiosios struktūros plečiasi išilgai elektrinio lauko kampu, kurį sutartinai priimta žymėti raide θ . Vadinasi, hidrofiliinių porų formavimosi kryptingumą elektriniame lauke apibūdina sąryšis (Wang ir kt., 2013):

$$E \cdot \cos(\theta) > E_S; \quad (1.16)$$

čia E – elektrinio lauko stipris, E_S – ribinė elektrinio lauko stiprio vertė, sukelianti ląstelės membranos pralaidumą, θ – kampas, matuojamas tarp elektrinio lauko krypties ir ląstelės normalės.

Tarek teigimu, porų formavimasis prasideda iš karto paveikus ląstelę išoriniu elektriniu lauku (Tarek, 2005). Jeigu elektrinis laukas išlieka ilgiau nei kelias mikro sekundes, tada prasideda porų plėtimasis. Stiprus elektrinis laukas lipidinėje poroje poliarizuoja vandens molekules, kurios vėliau stabilizuoja ir kartu ją išplečia (Pliquett, 2017). Kai elektrinis laukas nustoja veikti, sukeltas potencialas išnyksta. Tada poros pradeda užsitraukinėti ir grįžta į pradinę būseną (Neumann ir kt., 1998). Temperatūra taip pat veikia porų užsivėrimą. Kuo temperatūra aukštesnė, tuo greičiau poros išnyksta. Pagal porų dydį skiriami trys užsidarymo etapai: staigus poros užsivėrimas (< 1 s), lėtas poros užsivėrimas (~ 2 – 10 min) ir visiškas poros užsivėrimas (> 10 min) (Weaver ir Chizmadzhev, 1996).

Porų užsivėrimas patvirtina, kad elektroporacija gali būti grįžtamas procesas, tad parinkus atitinkamas elektrinio lauko sąlygas, galima išsaugoti ląstelių gyvybingumą net ir po aukšto elektrinio intensyvumo impulsų taikymo. Tačiau kai sukkeltojo potencialo reikšmė itin viršija transmembraninio potencialo vertę, nuo kurios prasideda porų formavimasis, arba kai didelio intensyvumo elektriniai impulsai veikia ląstelę per ilgai, tada įvyksta membranos dezintegracija ir ląstelės mirtis. Porų dydžiui ir jų skaičiui viršijus tam tikrą kritinę vertę, ląstelės membrana pažeidžiama negrįžtamai. Šis procesas apibūdinamas kaip negrįžtama elektroporacija.

Negrįžtama elektroporacija – tai biofizikinis procesas, nulemiantis paveiktų ląstelių mirtį, kai išorinio elektrinio stimulo sukelti membranos pakitimai iš esmės sutrikdo elektrocheminę pusiausvyrą ir negrįžtamai sustabdo biomolekulių ir jonų pernašos mechanizmus (Rubinsky, 2007). Tačiau sąlygos, dėl kurių šis procesas tampa negrįžtamu, vis dar nėra iki galo iširtos, taip, kaip ir pats elektroporacijos fenomenas (Cebrián, 2016). Apibendrinus iki šiol atliktų tyrimų rezultatus, galima teigti, kad negrįžtama elektroporacija dažniausiai yra pasiekama, kai IEL stiprumas yra intervale nuo 0,5 iki 3 kV cm⁻¹ (Toepfl, 2006; Jäger, 2013).

1.2. Technologiniai elektroporacijos veiksniai

1.2.1. Impulsinio elektrinio lauko stiprumas

Remiantis Puertolas ir kt. tyrimų duomenimis, galima teigti, kad elektrinio lauko stiprumas nuo 0,5 iki 2 kV cm⁻¹ yra labiau tinkamas ląstelėms, kurių dydis svyruoja nuo 40 iki 200 μm, o elektriniai laukai nuo 12 iki 20 kV cm⁻¹ yra labiau tinkami mažoms ląstelėms ir mikro organizmams, kurių dydis keičiasi intervale nuo 1 iki 10 μm (Puertolas ir kt., 2016). Kuo stipresnis elektrinis laukas naudojamas, tuo mažesnio suteiktos specifinės energijos kiekio reikia norint pasiekti norimą augalinių ląstelių dezintegraciją (Töpfl, 2006). Kuo elektriniai impulsai yra ilgesni arba kuo didesnė elektrinė srovė teka tarp elektrodų, tuo sunkiau yra užtikrinti elektrinio lauko homogeniškumą (Loste ir kt., 1998). Atliekant elektroporacijos eksperimentus buvo pastebėta, kad elektrinio lauko stiprumas mažos koncentracijos mielių ląstelių suspensijoje buvo homogeniškesnis nei didelės koncentracijos suspensijoje (Zakhem ir kt., 2006).

1.2.2. Impulsinio apdorojimo trukmė ir suteiktos specifinės energijos kiekis

Atliekant augalinio audinio elektroporaciją, impulso(-ų) trukmės taip pat turi būti parenkamos pagal elektrinio lauko stiprumą, siekiant išvengti energijos nuostolių ir žalingo terminio apdorojimo (Puertolas ir kt., 2016). Kai minkštųjų augalinių audinių elektroporacija atliekama naudojant elektrinio lauko stiprumą iki 1 kV cm⁻¹, tada efektyvus suminis impulsų sekos laikas yra intervale nuo 100 iki 10 000 μs, bet stipresnių (1–10 kV cm⁻¹) elektrinių laukų atveju visiškai audinių dezintegracijai galima naudoti kur kas trumpesnę (< 100 μs) apdorojimą

(Puertolas ir kt., 2012). Didesnis IEL impulsų skaičius turi didesnę įtaką arčiau elektrodo esančių ląstelių elektroporacijos efektyvumui, todėl padidinus atstumą tarp elektrodų, būtinas didesnis impulsų skaičius, norint pasiekti tokį patį elektroporacijos efektyvumą visame veikiamos struktūros tūryje (Teissie, 2013).

1.2.3. Elektrinio impulso parametrų įtaka elektroporacijos procesui

Impulso trukmė. Tyrimais nustatyta, kad, naudojant ilgesnius elektrinius impulsus, elektroporacijai pasiekti reikia mažesnės impulso amplitudės, o prie tos pačios impulso įtampos vertės ilgesni impulsai elektroporuoja didesnių ir didesni skaičių fosfolipidinių porų (Pastushenko ir kt., 1987; Glaser ir kt., 1988). Luengo ir kt. (2016), atlikę betalainų ekstrakcijos iš šviežių raudonųjų burokėlių tyrimus, nustatė, kad elektroporacija, pasiekta su mikro sekundžių impulsais, buvo efektyvesnė nei su mili sekundžių impulsais. Impulsų trukmė, kaip reikšmingas elektroporacijos efektyvumo faktorius, buvo patvirtintas tiriant įvairių fermentų aktyvumą (Martin-Belloso, 2006). Ištirta, kad, naudojant ilgesnius elektrinius impulsus, suintensyvėja elektrocheminės reakcijos su elektrodų paviršiumi (Pataro ir kt., 2015). Tuo atveju, kai elektroporacijai pasiekti yra naudojama mažai elektrinių impulsų, pvz., nuo 1 iki 10, elektroporacijos proceso efektyvumą kur kas labiau lemia impulso trukmės, nei naudojant didelį skaičių, pvz., nuo 10 elektrinių impulsų (Kotnik ir kt., 2003). Išaiškinta, kad, atliekant mikro organizmų inaktyvaciją, elektrinio lauko stiprumas turi būti parenkamas atsižvelgiant į elektrinių impulsų trukmę (Wouters ir kt., 1999). Ištyrus elektrinių impulsų trukmės įtaką gyvūnų ląstelės vidinių organelių membranų elektroporacijai, nustatyta, kad impulsai, kurių trukmės yra nuo 11 iki 100 ns, labiau veikia apdorojimo efektyvumą nei impulsai, kurių trukmės yra nuo 1 iki 10 ns. Tačiau kiti šio tyrimo rezultatai parodė, kad impulsų trukmės nuo 101 iki 999 ns savo efektyvumu iš esmės nesiskiria nuo mikro ir mili sekundžių impulsų (Napotnik ir kt., 2016).

Impulso forma. Taikant elektroporaciją, dažniausiai naudojami prietaisai, galintys generuoti eksponentinius ir stačiakampius elektrinius impulsus (Reberšek, 2017). Tam yra dvi priežastys. Pirmiausia, žvelgiant iš techninės perspektyvos, eksponentinių impulsų generatoriai turi paprastą veikimo principą ir yra lengviau projektuojami. O stačiakampiai impulsai padeda geriau valdyti šias technologines elektroporacijos proceso sąlygas: apdorojimo trukmę, suteiktos specifinės energijos kiekį ar veikiamos medžiagos temperatūrą. Impulso užaugimo greitis yra pagrindinis parametras, apibūdinantis stačiakampio impulso formą (statumą). Tačiau rezultatai, gauti naudojant impulsus su skirtingais jų užaugimo greičiais, turi būti lyginami labai atsargiai dėl skirtingai vykstančios membranų poliarizacijos (Neumann, 1992). Kai impulsų užaugimo laikas yra labai mažas (kelios nano sekundės), tada biologinės ląstelės membranoje (1 impulso atveju) yra elektroporuojama mažiau fosfolipidinių porų. Tai lemia didesnę kritinį

transmembraninį potencialą ir gali paveikti ląstelių gyvybingumą (Pliquett, 2017). Pastebėta ir tai, kad impulsų forma veikia fermentų inaktyvacijos procesus (Yeom ir kt., 2002). Tačiau kitais tyrimais atskleista, kad impulsų užaugimo greitis nuo 2 iki 100 μ s neturi reikšmingos įtakos elektroporacijos efektyvumui (Kotnik ir kt., 2003).

Impulsų pasikartojimo dažnis. Pasitelkus optinę mikroskopiją, buvo įrodyta, kad žemo dažnio (< 10 Hz) elektrinių impulsų seka augalines ląsteles elektroporuoja efektyviau nei aukštų dažnių (nuo 10 Hz iki 5 kHz) seka (Asavasanti ir kt., 2011). Ši išvada taip pat buvo patvirtinta matuojant ekstrakto savitąjį elektrinį laidumą. Didesnė bioaktyvių junginių išeiga, kaip ir ekstrakto savitasis elektrinis laidumas, buvo pasiekta naudojant žemą impulsų pasikartojimo dažnį (Lebovka ir kt., 2002; Chalermchat ir kt., 2004). Tačiau trūksta tyrimų, kurie paaiškintų, ar skirtinga trukmė tarp impulsų jų sekoje paveikia elektroporacijos proceso efektyvumą (Teissie, 2013). Anot Raso ir kt., aukštas impulsų pasikartojimo dažnis greičiau pakelia terpės temperatūrą. Šis veiksnys dažniausiai yra neigiamas ir daro žalą paveiktos biologinės struktūros kokybei (Raso ir kt., 200). Kiti rezultatai atskleidė, kad aukštas impulsų pasikartojimo dažnis teigiamai veikė fermentų inaktyvaciją (Bendicho ir kt., 2002). Ši įtaka gali būti aiškinama tuo, kad fermentai yra jautresni apdorojimui IEL, esant aukštesnėms temperatūroms (Jäger ir Knorr, 2017; Martin-Beloso, 2016). Pataro ir kt. nustatė, kad elektrocheminės reakcijos su elektrodų paviršiumi, esant aukštesniems dažniams, vyksta intensyviau – tai lemia trumpesnę elektrodų tarnavimo laiką ir didesnę terpės užterštumą metalų jonais (Pataro ir kt., 2015). Remiantis atliktų tyrimų rezultatais, galima teigti, kad biologinių ląstelių elektroporacijai geriausiai tinka impulsų pasikartojimo dažnis intervale nuo 0,5 iki 10 Hz (Vernhes ir kt., 1999; Pucihar ir kt., 2002; Pavlin ir kt., 2005).

Impulsų poliarumas. Bipoliarūs impulsai elektroporuoja didesnę ląstelės membranos paviršiaus plotą nei monopoliarūs (Teissie, 2013). Todėl, naudojant bipoliarus impulsus, kritinis elektroporacijos potencialas yra pasiekiamas naudojant žemesnės amplitudės impulsus. Grįžtamos elektroporacijos atveju tai leidžia pasiekti kur kas geresnius ląstelių gyvybingumo rodiklius (Miklavčič ir kt., 2015). Kita vertus, bipoliarių impulsų generatorių projektavimui būtinos bent du kartus didesnės finansinės investicijos. Bipoliarių impulsų naudojimas jį taikant, yra efektyvesnis nei monopoliarių. Bipoliariais impulsais paveikus pomidorus, jų sultys turėjo didesnę likopeno kiekį nei monopoliarų impulsų atveju (Odrizola-Serrano ir kt., 2007). Bipoliariais impulsais taip pat buvo pasiekti geresni apelsinų sultyse esančio fermento (pectino melisterazės) inaktyvacijos rezultatai, nei naudojant monopoliarių impulsų sekas (Elez-Martinez ir kt., 2007). Naudojant bipoliarus impulsus, sumažėja elektrocheminių reakcijų intensyvumas su elektrodų paviršiumi (Bushnell ir kt., 1995), neatsižvelgiant į medžiagą, iš kurios yra pagaminti elektrodai (Kotnik ir kt., 2001).

1.2.4. Pagrindiniai elektroporacijos metodo trūkumai

Laštelių rūšis, cheminė sudėtis ir struktūriniai biologinio audinio ypatumai nulemia augalinės žaliavos savitąjį elektrinį laidumą. Kuo savitasis elektrinis laidumas yra didesnis, tuo didesnė elektrinė srovė tekės tarp elektrodų, esant tam tikrai impulso įtampai. Kuo daugiau elektrinės srovės prateka tarp kameros elektrodų per laiko vienetą, tuo didesnis elektrinės energijos kiekis yra suteikiamas augalinei žaliai.

Iširta, kad elektrinio lauko stiprumas augalinėje žaliavoje susilpnėja ir neatitinka nominalios vertės tose srityse, kuriose yra įsiterpusių oro burbuliukų (Gongora-Nieto ir kt., 2003). Dažniausiai dujų mikro burbuliukai augalinėje žaliavoje susiformuoja dėl kylančios temperatūros arba ant elektrodų paviršiaus vykstančių elektrocheminių reakcijų (Gad ir kt., 2012b; Pataro ir kt., 2014). Elektroporacijai panaudojus bipoliarus impulsus, oro burbuliukų formavimosi ant elektrodų paviršiaus pavyksta išvengti dėl sumažėjusio elektrocheminių reakcijų intensyvumo (Blanckaert ir kt., 20016). Taip įvyksta todėl, kad dujų elektrinio pramušimo įtampa yra mažesnė nei skysčiuose. Dėl mažo skersmens (mm – μm) šie burbuliukai elektriškai „užsitrupina“, kai elektrinio lauko stiprumas išilgai burbuliukų skersmens viršija kritinę ribą. Impulsinio elektrinio apdorojimo metu vykstantys atskiri dujų burbuliukų elektriniai pramušimai mažina bendrą apdorojimo terpės atsparumą pramušimui, kuris gali įvykti tarp kameros elektrodų (Kuffel ir kt., 2000). Buvo pasiūlyta elektrinio lauko stiprumą sferos formos dujų burbuliuko viduje apskaičiuoti pagal formulę (Alston 1968; Kreuger 1989):

$$E_b = \frac{3 \cdot \epsilon_{pvt} \cdot E_{pvk}}{2 \cdot \epsilon_{pvt} + 1} \quad (1.17)$$

čia E_b – elektrinio lauko stiprumas dujų burbuliuko viduje, $V\ m^{-1}$, E_{pvk} – elektrinio lauko stiprumas tarp apdorojimo kameros elektrodų, $V\ m^{-1}$, ϵ_{pvt} – apdorojimo terpės dielektrinė skvarba, F/m. Tačiau, remiantis šia hipotetine išraiška, elektrinio lauko stiprumas apskaičiuojamas neatsižvelgiant į dujų burbuliuko skersmenį, kuris yra vienas svarbiausių faktorių, nulemiančių elektrinio lauko stiprumą burbuliuko viduje.

Kuo didesnis laštelių kiekis yra veikiamas, tuo labiau tikėtina, kad elektrinio lauko stiprumas bus mažiau homogeniškas (Susil ir kt., 1998).

1.3. Impulsinio elektrinio lauko įtaka sulčių išėgai ir antocianinų ekstrakcijai iš mėlynių uogų (*Vaccinium myrtillus* L.)

Mėlynių uogos plačiai aptinkamos gamtoje ir vertinamos dėl didelio antocianinų kiekio (Može ir kt., 2011; Riihinen ir kt., 2008). Daugiausiai šių polifenolinių junginių aptinkama odelėje (Lee ir Wrolstad, 2004) nokimo fazės metu (Foster ir Blumenthal, 2012). *V. myrtillus* rūšies vaisiuose aptinkama 15 skirtingų antocianinų, kurių pagrindiniai – delfinidinas, cianidinas,

petunidinas, peonidinas ir malvidinas (Lätti ir kt., 2008). Šie junginiai ne tik suteikia uogoms mėlyną spalvą, bet dėl aukšto antioksidacinio aktyvumo įgyja priešvėžinių, priešmikrobinių ir priešuždegiminių savybių bei gali padėti išvengti hipoglikemijos (Chu ir kt., 2011).

Didžiausi mėlynių uogų kiekiai pramoniniu būdu užauginami JAV, Kanadoje ir Europos Sąjungoje. Remiantis 2012 metų statistika, Europoje buvo užauginta 19,5 t *Vaccinium* rūšies vaisių. Daugiausiai šių vaisių prekybai paruošiama Lenkijoje (10 t), Rytų Europoje (Lietuva, Rusija, Rumunija, Ukraina) bei Šiaurės Europos (Švedija, Suomija, Norvegija) šalyse (6 t) (Brazelton, 2012).

Didžioji dalis mėlynių uogų dėl įrodyto teigiamo poveikio žmogaus sveikatai yra sunaudojama sulčių gamybai (Barba ir kt., 2012). Tačiau po sulčių spaudimo lieka nepanaudotas didelis kiekis šalutinių perdirbimo produktų – vaisių odelių bei sėklų. Dėl šios priežasties mėlynių uogų išspaudose gausu antocianinų ir kitų fenolinių junginių (Khanal ir kt., 2010; Bobinaité ir kt., 2015a; Lee ir kt., 2004), kurie galėtų būti panaudoti natūralių maistinių dažų arba nutraceutikų gamybai (Lee ir Wrolstad, 2004). Platesni tyrimai parodė, kad *V. myrtillus* rūšies vaisių išspaudose lieka daugiau nei 80 % antocianinų, palyginti su šviežiomis uogomis prieš sulčių spaudimą (Laaksonen ir kt., 2010). Ištirta, kad *V. myrtillus* rūšies vaisių sultys turi iki 3,2 karto mažiau antocianinų nei jų lieka išspaudose po sulčių spaudimo (Dinkova ir kt., 2012).

Atsižvelgiant į tai, kad mėlynių uogų išspaudose lieka didžioji dalis naudingųjų medžiagų, pastaraisiais metais maisto pramonėje vis aktyviau pradedamos diegti inovatyvios maisto perdirbimo technologijos. Naujausių technologinių priemonių tikslas – pasiekti kuo didesnę antocianinų ir kitų polifenolinių junginių koncentraciją vaisių sultyse ir efektyviai panaudoti šalutinius perdirbimo produktus: juose esantį didelį kiekį biologiškai aktyvių junginių nukreipti į natūralių maistinių dažų arba nutraceutikų gamybą (Lee ir Wrolstad, 2004; Govindaraghavan, 2014).

IEL panaudojimas prieš mechaninį sulčių spaudimą parodė kur kas didesnę bioaktyvių junginių ekstrakciją iš augalinės žaliavos bei šalutinių perdirbimo produktų (Barba ir kt., 2015; Donsi ir kt., 2010b).

Apdorojant IEL, ant augalinių ląstelių membranų yra indukuojamas kritinis transmembraninis potencialas ir pasiekama ląstelių elektroporacija. Šis procesas mokslinėje literatūroje taip pat gali būti vadinamas ląstelių permeabilizacija. Buvo pastebėta, kad susidarę laikini (grįžtama elektroporacija) arba nuolatiniai (negrįžtama elektroporacija) ląstelių membranų (fosfolipidų) pažeidimai pagreitina ekstrakcijos procesą ir padidina biologiškai aktyvių junginių išėigą (Barba ir kt., 2015).

Kiek anksčiau apdorojimas IEL buvo sėkmingai pritaikytas siekiant padidinti sulčių išėigą iš šviežių obuolių, morkų, vynuogių ir mėlynių uogų (Barba ir kt., 2015; Bobinaite ir kt., 2015a;

Carbonel-Capella ir kt., 2016; Donsi ir kt., 2010b; Grimi ir kt., 2011; Jaeger ir kt., 2012). Apdorojimas IEL taip pat padidino natūralių pigmentų ir antioksidantų ekstrakcijos efektyvumą iš įvairių antrinių perdirbimo produktų – vynuogių išspaudų (Barba ir kt., 2015b; Corrales ir kt., 2008), raudonos spalvos kaktuso vaisiaus žievelės (Koubaa ir kt., 2016), apelsino žievelės (Luengo ir kt., 2013), papajos žievelės (Parniakov ir kt., 2014), mango vaisiaus odelės (Parniakov ir kt., 2016) ir kt.

Bobinaitės ir kt. (2015a) teigimu, *V. myrtilus* rūšies vaisius apdorojant IEL, ženkliai padidinama ne tik sulčių išeiža, bet pagerinami ir šių sulčių kokybės rodikliai. IEL pritaikius sulčių išspaudoms, gauti labai panašūs rezultatai, kaip ir šviežių uogų atveju (Bobinaitė ir kt., 2015a). Tačiau šio tyrimo metu buvo keičiamas tik IEL stiprumas ($1\text{--}5\text{ kV cm}^{-1}$), nors kitas, svarbus IEL parametras – suteiktos SEK – visų eksperimentų metu išliko nuolatinis (10 kJ kg^{-1}). Šio tyrimo metu nebuvo atlikta kokybinė bioaktyvių junginių analizė (ESC).

Šio tyrimo tikslas buvo ištirti IEL metu suteiktos specifinės energijos kiekio įtaką mėlynių sulčių išeiagai ir po IEL apdorojimo išspautų sulčių kokybei, kai elektrinio lauko stiprumas buvo nuolatinis (3 kV cm^{-1}), o parenkant skirtingą impulsų skaičių buvo nustatoma skirtinga apdorojimo energija ($1; 5; 10\text{ kJ kg}^{-1}$). Buvo tiriama ir IEL apdorojimo įtaka biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijos efektyvumui iš mėlynių uogų išspaudų. IEL paveiktų mėginių kokybinė analizė buvo atlikta panaudojant efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodą, kartu ištiriant antioksidacinį mėlynių sulčių ir išspaudų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą.

1.4. Impulsinio elektrinio lauko įtaka kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos efektyvumui iš aitriųjų paprikų „Habanero“ (*Capsicum annum* L.)

Paprikų gentis *Capsicum* (šeima *Solanaceae*) apima apie 20–27 (Walsh ir kt., 2001) skirtingų rūšių ir daugiau nei 200 skirtingų veislių (Contreras-Padilla ir kt., 1998). Pagrindinis *Capsicum* genties išskirtinumas – biologiškai aktyvių junginių kapsaicinoidų sintezė (Govindarajan ir kt., 1987; Govindarajan ir Sathyanarayana, 1991). Itin daug kapsaicinoidų aptinkama *Capsicum chinense* Jacq veislių grupės vaisiuose, augančiuose Pietų Amerikos žemyne ir pietinėje Šiaurės Amerikos žemyno dalyje (Sarpras ir kt., 2016). Iš 18 didžiausių šių junginių koncentraciją turinčių genotipų intensyviausiai kultivuojama ir dažniausiai naudojama praktikoje veislė „Habanero“ (Canto-Flick ir kt., 2008).

Atlikus tyrimus nustatyta, kad didžiausią dalį (60–90 %) iš visų alkaloidų, aptinkamų aitriosios paprikos vaisiuje, sudaro kapsaicinas ir dihidrokapsaicinas (Govindarajan ir kt., 1991; Zewdie ir kt., 2001; Barbero ir kt., 2008; Barbero ir kt., 2016). Taip pat ištirta, kad šie junginiai vaisiaus organose nėra pasiskirstę tolygiai. Didžiausia kapsaicino ir dihidrokapsaicino koncentracija yra vaisiaus placentoje, kurioje šie junginiai sintetinami (Reyes-Escogido ir kt.,

2011), ji reikšmingai mažesnė sėklose, mezokarpe ir egzokarpe (Govindarajan ir kt., 1986; Li ir kt., 2014). Šių kapsaicinoidų kiekis atskiruose vaisiaus organuose taip pat priklauso nuo vaisiaus brandimo stadijos (Govindarajan ir kt., 1986) ir klimato sąlygų augalo kultivavimo periodu (Phimchan ir kt., 2012).

Atliktų tyrimų rezultatai atskleidė, kad išdžiovinta (+60 °C temperatūroje) paprika „Habanero“ pasižymėjo palyginti didžiausia kapsaicino ir bendra kapsaicinoidų, bet mažiausia dihidrokapsaicino koncentracija. Nustatyta, kad užšaldyti (-24 °C temperatūroje) ir atitirpinti (natūrali konvekcija, +22 °C) „Habanero“ vaisiai turėjo mažiausią kapsaicinoidų kiekį, palyginti su išdžiovintomis ir šviežiomis paprikomis. O švieži „Habanero“ vaisiai turėjo didžiausią dihidrokapsaicino koncentraciją, palyginti su užšaldytais ir atitirpintais bei išdžiovintais (Contreras-Padilla ir kt., 1998). Todėl galima daryti prielaidą, kad, norint pasiekti didžiausią kapsaicino ir kartu dihidrokapsaicino ekstrakcijos efektyvumą, kaip žaliavą būtina naudoti šviežias „Habanero“ paprikas.

Kapsaicinoidai yra netirpūs vandenyje (Barbero ir kt., 2006b), todėl šių alkaloidų ekstrakcija iš aitriųjų paprikų vaisių dažniausiai yra atliekama naudojant organinius tirpiklius (Stoica ir kt., 2016), dažniausiai – metanolis ir etanolis (Barbero ir kt., 2006b; Kirschbamm-Titze ir kt., 2002; Williams ir kt., 2007), tačiau, atsižvelgus į ekstrakcijos metodą, gali būti naudojami ir kiti: acetonitrilas, acetonas, heksanas, chloroformas (Barbero ir kt., 2008; Peusch ir kt., 1997; Wesołowska ir kt., 2011). Papildomai buvo tiriama metanolio, etanolio ir acetono įtaka kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos efektyvumui. Gauti rezultatai neparodė statistiškai patikimų šių junginių išeigos skirtumų, tačiau dėl savo mažesnio toksiškumo etanolis buvo pasiūlytas kaip labiau tinkantis platesniam ultragarsinės ekstrakcijos taikymui (Barbero ir kt., 2006). Bandyta įrodyti, kad efektyvi kapsaicinoidų ekstrakcija gali būti vykdoma ir tada, kai etanolis tam tikru santykiu yra skiedžiamas su distiliuotu vandeniu (Rostagno ir kt., 2003). Tačiau vėlesniais tyrimais nenustatytas didesnis kapsaicinoidų ekstrakcijos ultragarsu efektyvumas naudojant etanolio ir vandens tirpalus (Barbero ir kt., 2006b).

Atliktas mechaninės ekstrakcijos ultragarsu ir Soksleto ekstrakcijos vertinimas kapsaicino stabilumui. Džiovinti „Habanero“ vaisiai buvo apdoroti mechanine ekstrakcija (ekstrakcijos laikas 30 min., kapsaicino išeiga 16,9 mg/g), ekstrakcijos ultragarsu (ekstrakcijos laikas 30 min., kapsaicino išeiga 19,9 mg/g) ir Soksleto ekstrakcija (ekstrakcijos laikas 225 min., kapsaicino išeiga 22 mg/g). Nustatyta, kad ekstrakcija ultragarsu ir mechaninė ekstrakcija kapsaicino stabilumui įtakos neturėjo, o atliekant Soksleto ekstrakciją, šio junginio degradacija prasidėjo praėjus 45 minutėms nuo proceso pradžios (Martins ir kt., 2017). Išsiaiškinta, kad kapsaicinoidai pradeda degraduoti tik tada, kai ekstrakcijos tirpiklio temperatūra tampa viršija +150 °C (Barbero ir kt., 2006b; Si ir kt., 2014).

Martins ir kt. teigimu, kapsaicinoidų ekstrakcijos efektyvumas priklauso nuo organinio tirpiklio rūšies, temperatūros, laiko ir ekstrakcijos metodo parinkimo (Martins ir kt., 2017). Mokslinėje metodologijoje aptinkami šie kapsaicinoidų ekstrakcijos iš paprikų vaisių metodai: mechaninė ekstrakcija (Contreras-Padilla ir kt., 1998), maceracija (Kirschbaum-Titze ir kt., 2002), Soksleto ekstrakcija (Korel ir kt., 2002), ekstrakcija ultragarsu (Karnka ir kt., 2002), ekstrakcija superkritiniais skysčiais (Daood ir kt., 2002) ir slegiamo skysčio ekstrakcija (ang. *pressurized liquid extraction*) (Barbero ir kt., 2006a). Tačiau mokslinės literatūros šaltinių analizės metu nebuvo nustatyta atvejų, kurių metu kapsaicinoidų ekstrakcija iš *Capsicum annum* L. rūšies vaisių būtų vykdoma panaudojant apdorojimą IEL.

Praktikoje kapsaicinoidų turintys ekstraktai yra naudojami maisto pramonėje kaip padožai, suteikiantys aitrumo pojūtį (Barbero ir kt., 2015), tačiau kur kas reikšmingiau šie biologiškai aktyvūs junginiai yra pritaikomi medicinoje. Kapsaicinoidų preparatai klinikinėje praktikoje naudojami siekiant sumažinti periferinį neuralginį skausmą (Chung ir kt., 2016). Kapsaicinas pasižymi medžiagų apykaitos produktų metabolizmą skatinančiu (Han ir Isoda, 2009) ir gastroprotekciniu apdorojimu (Mózsik ir kt., 2005) bei gali sumažinti gliukozės kiekį kraujyje (Yuan ir kt., 2016). O dihidrokapsaicinui būdingas neuroprotekcinis apdorojimas (Srinivasan ir kt., 2016). Janyou ir kt. (2017) atlikto tyrimo metu buvo modeliuojamos išeminio insulto sąlygos pelių smegenų audiniuose. Gauti rezultatai atskleidė, kad dihidrokapsaicinas reikšmingai sumažino tiek smegenų audinio, tiek kapiliarų (ang. *blood-brain-barrier*) pažeidimus.

Teigtina, kad, siekiant sukurti klinikinius preparatus, sujungiančius moksliniais tyrimais įrodytas ir žmogaus sveikatai naudingas kapsaicinino ir dihidrokapsaicino savybes, būtų tikslinga sukurti ekstrakcijos metodą, kurį pasitelkus, būtų galima pasiekti kuo didesnę šių junginių ekstrakcijos sinergiją.

Šio tyrimo metu pirmą kartą kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcija iš *Capsicum annum* L. rūšies vaisių buvo vykdoma pritaikant IEL apdorojimą.

1.5. Impulsinio elektrinio lauko įtaka betalainų ekstrakcijos efektyvumui iš šviežių burokėlių (*Beta vulgaris* L.)

Iš visų gamtoje aptinkamų ir betalainų savo sudėtyje turinčių augalų rūšių, raudonieji burokėliai pasižymi didžiausiais šio biologiškai aktyvaus junginio kiekiais (Esatbeyoglu ir kt., 2015). Šie vandenyje tirpūs ir azoto savo sudėtyje turintys junginiai pagal struktūrą ir spalvą yra skirstomi į 18 skirtingų betacianinų ir 12 betaksantinų (Sawicki ir kt., 2016). Betacianinų spalva, pagal burokėlio rūšį, būna raudona arba violetinė, o betaksantinų – geltona arba oranžinė (Sawicki ir kt., 2016). Didžiausią visų burokėlyje aptinkamų betacianinų dalį (75–95 %) sudaro biologiškai aktyvus junginys betaninas (E162). Šis betacianinas kaip natūralus maistinis dažiklis buvo

pritaikytas ir yra iki šiol naudojamas maisto pramonėje (Delgado-Vargas ir kt., 2000; Fincan ir kt., 2004; Esatbeyoglu ir kt., 2015). Taip pat buvo įrodytos teigiamos betanino savybės žmogaus sveikatai. Tyrimai atskleidė, kad betaninas slopina lipidų peroksidaciją (Kanner ir kt., 2001), padeda apsaugoti ląsteles nuo deoksiribonukleorūgšties pažeidimų (Zielińska-Przyjemska ir kt., 2012) ir indukuoja antioksidantus (Krajka-Kuźniak ir kt., 2013; Esatbeyoglu ir kt., 2014). Juo labiau, buvo ištirta, kad betaninas dalyvauja uždegimą slopinančiuose (Reddy ir kt., 2005), priešvėžiniuose (Kapadia ir kt., 2003; Zhang ir kt., 2013b; Lecher ir Stoner, 2019), priešmikrobiniuose ir priešvirusiniuose procesuose (Sturzoiu ir kt., 2011). Iki šiol atlikti tyrimai parodo, kad betalainai, išgauti iš burokėlių, nesukelia šalutinių alerginių reakcijų (Miguel, 2018).

Įrodžius, kad betaninas yra saugus žmogaus sveikatai ir tinkamas naudoti maisto pramonėje (The German Federal Ministry of Justice and Consumer Protection, 1998), šis biologiškai aktyvus junginys kaip natūralus dažiklis buvo pradėtas naudoti ir vis dar yra pasitelkiamas konditerijoje bei maisto papildų gamyboje, juo dažomi sausi mišiniai ir pieno produktai (Stinzing ir kt., 2008a, Stinzing ir kt., 2008b; Georgiev ir kt., 2010). Betanino spalvos intensyvumas, palyginti su sintetiniais dažikliais, yra iki trijų kartų didesnis. Todėl jis taip pat naudojamas vaistų ir kosmetikos pramonėje (Dornenburg ir Knörr, 1996; El-Tantawy ir Eisa, 2009). Betaninui, kaip ir kitiems betalainams, būdingas spalvos stabilumas vandenilio potencialo (pH) ribose nuo 3 iki 7. O antocianinai (E163), kurie taip pat gali būti naudojami raudonų maistinių dažų gamybai, spalvos stabilumu nepasižymi tada, kai vandenilio potencialo vertė tampa didesnė nei 3. Atkreiptinas dėmesys, kad betaninas kaip natūralus raudonos spalvos maistinis dažiklis nėra optimaliai pritaikomas: dėl raudonos spalvos atspalvių įvairovės, kuri priklauso nuo burokėlių genotipo, dėl degradavimo esant aukštesnei nei kambario temperatūrai, dėl specifinio „žemės“ kvapo ir pasenusių bei šiuolaikinių gamtosaugos reikalavimų neatitinkančių ekstrakcijos metodikų (Luque de Castro ir Garcia-Ayuso, 1998; Cai ir kt., 1998; Mamidipally ir Liu, 2004; Esatbeyoglu ir kt., 2015). Todėl tyrimai, kurių metu būtų optimizuojama pigmentų betalainų ekstrakcija iš burokėlių žaliavos, yra aktualūs ir turi praktinę perspektyvą.

Betalainai yra kaupiami ląstelių vakuolėse, todėl šių junginių ekstrakcijos efektyvumas didžiaja dalimi priklauso nuo augalinės struktūros dezintegracijos laipsnio ir pasirinkto ekstrakcijos metodo. Siekiant padidinti išeigos laipsnį ir sumažinti ekstrakcijos laiką, būtina padidinti tirpiklio ir augalinės žaliavos sąlyčio plotą. Tada betalainų ekstrakcija kambario ar aukštesnėje temperatūroje gali būti vykdoma vandenyje, metanolyje ar etanolyje (Delgado-Vargas ir kt., 2000). Tačiau didesniu betalainų stabilumu pasižymi vandeniniai ekstraktai (Escribano ir kt., 2002; Strack ir kt., 2003). Pabrėžtina, kad visiems tradiciniams ekstrakcijos metodams, kurių metu kaip tirpiklis gali būti naudojamas vanduo, būdinga ilga ekstrakcijos trukmė, maža betalainų ekstrakcijos išeiga, ekstrakto tarša, dideli energijos ir ekstrahuojamų

junginių nuostoliai (Tiwari ir Cullen, 2013). Pastaruoju metu mokslinėje literatūroje vis dažniau publikuojami ekstrakcijos rezultatai, gauti panaudojus žaliavos apdorojimą IEL, slegiamo skysčio ekstrakciją, ekstrakciją superkritiniais skysčiais, ekstrakciją ultragarsu ir žaliavos smulkinimą iki nanometrinių dalelių. Manoma, kad ekstrakcija IEL turi didžiausią pritaikymo potencialą betalainų ekstrakcijai iš šviežių burokėlių dėl trumpo ekstrakcijos laiko, ypač mažų energijos sąnaudų, saugesnio vartoti ir aukštesnės kokybės galutinio produkto (Tiwari ir Cullen, 2013).

Augalinės žaliavos apdorojimas IEL – tai neterminis, nepasižymintis žalingu terminiu apdorojimu ir energijos nuostoliais, metodas, kurio metu trumpi, mikrosekundžių eilės impulsai yra paduodami į augalinę struktūrą taip, kad ant biologinių ląstelių membranų yra indukuojamas kritinis transmembraninis potencialas, sukeliama ląstelių elektroporacija ir reikšmingai padidinamas membranų laidumas įvairaus dydžio molekulėms (Donsi ir kt., 2010b). Šis abiotinis (biologiniu požiūriu) stresorius į augalinę struktūrą yra paduodamas naudojant specialias apdoravimo kameras (Heinz ir kt., 2001). Atsižvelgiant į apdoravimo kameroje sukuriama elektrinio lauko homogeniškumo laipsnį ir elektrinio lauko stiprumą, IEL apdorojimas gali sukelti tiek grįžtamą, tiek negrįžtamą ląstelių elektroporaciją. Įvykus grįžtamai elektroporacijai, kai elektrinio lauko stiprumas mažesnis nei 1 kV cm^{-1} , praėjus tam tikram laikui po apdoravimo membranų, fosfolipidinės poros užsidaro. O negrįžtamos elektroporacijos atveju, kai elektrinio lauko stiprumas didesnis nei $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$, yra sutrikdoma ląstelės homeostazė ir poros lieka pralaidžios (Toepfl, 2006; Jäger, 2013).

Elektroporacijos proceso pobūdis priklauso nuo biologinių veiksnių – ląstelės dydžio, jos formos, orientacijos elektriniame lauke, augalinės žaliavos arba apdoravimo terpės pH, apdorojamos žaliavos temperatūros, jos savitojo elektrinio laidumo ir apdorojamos žaliavos heterogeniškumo (Raso ir Heinz, 2007).

Betalainų ekstrakcija iš šviežių burokėlių, panaudojant žaliavos apdorojimą IEL, buvo tiriama kelis kartus (Chalermchat ir kt., 2004; Fincan ir kt., 2004; Lopez ir kt., 2009; Loginova ir kt., 2011; Luengo ir kt., 2016) tačiau gauti rezultatai detaliam nepaiškino, kaip betalainų ekstrakcijos efektyvumą veikia pagrindiniai IEL metodo parametrai: elektrinio lauko stiprumas, suteiktos SEK ir į žaliavą paduotų impulsų skaičius.

Taigi, šio tyrimo tikslas buvo įvertinti kiekvieno IEL parametro svarbą betalainų ekstrakcijos efektyvumui ir nustatyti reikšmingus šių parametru sąryšio dėsnumus.

1.6. Elektroporuotos ląstelės matematinis modelis

Daržovių, vaisių audinių ląstelių vakuolėse dažniausiai yra saugomas didžiausias biologiškai aktyvių junginių kiekis (Wayne ir kt., 2019). Įvertinus tai, tampa akivaizdu, kad, norint pasiekti efektyvią šių junginių ekstrakciją, būtina dezintegruoti ne tik atitinkamo audinio ląstelių

membranas, bet kartu ir vakuolių tonoplastus. Vienas iš efektyviausių būdų šiam tikslui pasiekti yra elektroporacijos metodas, kuris dėl savo teigiamų aspektų pradedamas vis plačiau taikyti maisto pramonėje (Puértolas ir kt., 2016).

Siekiant geriau suprasti transmembraninio potencialo dinamiką elektrinio impulso metu, ant ląstelės membranos ir tonoplasto esant skirtingam gretimų sričių (ląstelės išorinė terpė, citozolis, vakuolė) savitojo elektrinio laidumo dydžiui, buvo sukurtas augalinės ląstelės baigtinių elementų modelis (BEM). Jis buvo suprojektuotas panaudojant „Comsol Multiphysics“ programinį paketą. Pirmiausia sukurta geometrinė struktūra buvo analizuojama pritaikant elektrinių srovių programinį modulį. Šiame modulyje gali būti analizuojamas elektrinės srovės tekėjimas skirtingo savitojo elektrinio laidumo (σ) ir dielektrinės skvarbos (ϵ) medžiagomis bei kartu tiriamas elektrinio lauko stiprumo pasiskirstymas. Tačiau šio modulio aplinkoje matematiniai skaičiavimai galimi tik tada, kai teisingai aprašomi elektrinio lauko potencialai, kurie leidžia išpildyti būtinąją sąlygą – tiriamoji medžiaga privalo būti apdorojama elektriniu lauku (E) tam tikrą laiką. Kita vertus, atliekant matematinius skaičiavimus, negalima įvertinti laidininko paviršiuje tekančių srovių įtakos.

Pagrindinis matematinio elektroporutos ląstelės modelio uždavinys buvo sukurti biologinės ląstelės modelį, kurį pasitelkus, būtų galima įvertinti savitojo elektrinio laidumo įtaką indukuoto transmembraninio potencialo dydžiui ant ląstelės ir jos vakuolės membranų. Tokio pobūdžio teorinės žinios leistų geriau suprasti elektroporacijos proceso mechanizmą, iš anksto parinkti optimalius IEL elektrinius parametrus, taip pat sumažinti eksperimentinių tyrimų apimtį, padidinti metodo efektyvumą.

2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

2.1. Tyrimų objektų parinkimas

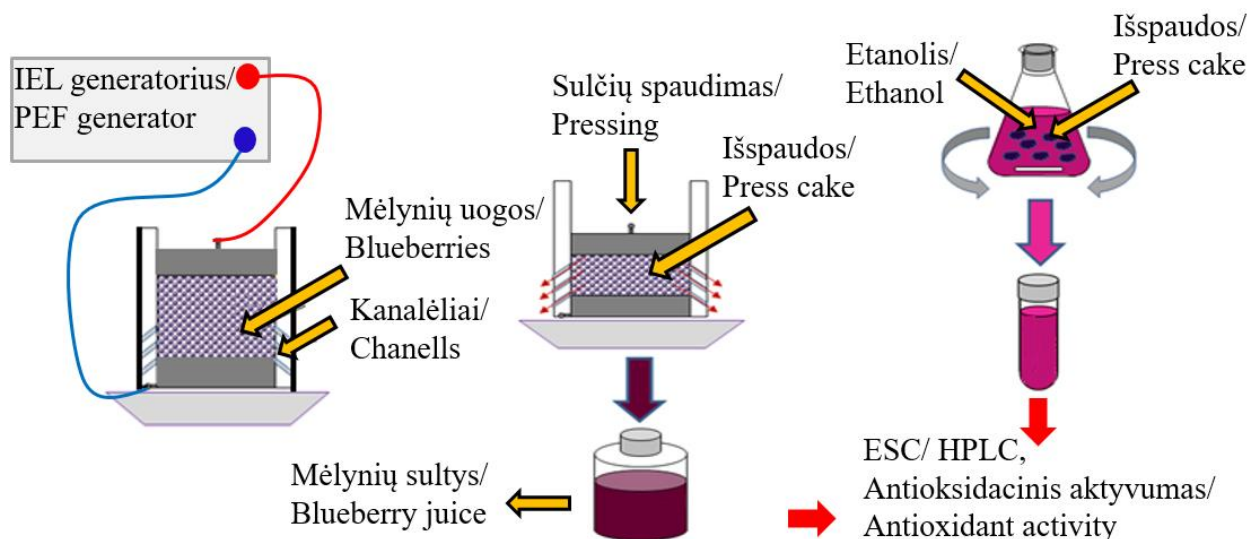
Mėlynių uogos (*Vaccinium myrtillus* L.). Tyrimų metu buvo nustatyta, kad, taikant tradicinius augalinės žaliavos perdirbimo metodus, mėlynių išspaudose lieka didžioji dalis žmogaus sveikatai naudingų biologiškai aktyvių junginių antocianinų (Lee ir kt., 2004; Khanal ir kt., 2010; Bobinaitė ir kt., 2015a). Atsižvelgus į šiuos rezultatus, buvo nuspręsta pritaikyti apdorojimą IEL, siekiant efektyvesnės antocianinų ekstrakcijos iš mėlynių uogų, ir sumažinti šių junginių kiekį mėlynių uogų išspaudose.

Aitriosios vienmetės paprikos (*Capsicum annum* L.). Tyrimais buvo įrodytas teigiamas kapsaicinoidų poveikis žmogaus sveikatai (Mózsik ir kt., 2005; Han ir Isoda, 2009; Chung ir kt., 2016; Janyou ir kt., 2017). Tačiau atlikus mokslinės literatūros šaltinių analizę, nebuvo nustatyta atvejų, kurių metu kapsaiciną ir dihidrokapsaiciną iš aitriųjų paprikų būtų bandoma ekstrahuoti apdorojant IEL. Todėl šiame darbe pirmą kartą buvo siekiama optimizuoti kapsaicinoidų ekstrakciją iš aitriųjų paprikų vaisių, pritaikius IEL metodą.

Raudonieji burokėliai (*Beta vulgaris* L.). Iš visų gamtoje aptinkamų augalų rūšių, turinčių savo sudėtyje betalainų, raudonieji burokėliai pasižymi didžiausiais šių biologiškai aktyvių junginių kiekiais (Esatbeyoglu ir kt., 2015). Tačiau dėl aplinkai žalingų tradicinių bei iki šiol nepritaikytų inovatyvių ekstrakcijos metodų, raudonieji burokėliai vis dar nėra optimaliai perdirbami (Luque de Castro ir Garcia-Ayuso, 1998; Cai ir kt., 1998; Mamidipally ir Liu, 2004; Esatbeyoglu ir kt., 2015). Todėl šiame darbe buvo siekiama padidinti betalainų ekstrakcijos efektyvumą iš raudonųjų burokėlių, pritaikius IEL metodą.

2.2. Mėlynių uogų apdorojimas impulsiniais elektriniais laukais

Tyrimo metu mėlynių uogų apdorojimas IEL buvo atliekamas naudojant cilindro formos apdorojimo kamerą, sudarytą iš vertikalios polikarbonatinio izoliatoriaus ir dviejų diskinės formos poliruotų nerūdijančio plieno elektrodų (žr. 2.1 pav.). Atstumas tarp elektrodų visų eksperimentų metu buvo 5 cm, vamzdinio izoliatoriaus apačia perforuota 0,5 mm diametro skylutėmis specialiai pritaikant kamerą sulčių spaudimui. Elektrodo paviršiaus plotas 9,1 cm². Elektriniai impulsai į augalinę žaliavą buvo paduodami naudojant aukštos įtampos impulsų generatorių (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden). Kiekvieno IEL apdorojimo metu impulsų įtampa ir srovė buvo matuojama naudojant Rogovskio ritę (2–0.1 Stangenes, Inc., USA) bei skaitmeninį osciloskopą (Tektronix, TDS 3034B, Wilsonville, OR, USA).



2.1 pav. Mėlynių uogų apdorojimo IEL struktūrinė schema (Pataro ir kt., 2017)

Fig. 2.1. Schematic representation of the PEF pre-treatment of blueberry fruits. Adopted from Pataro et al. (2017)

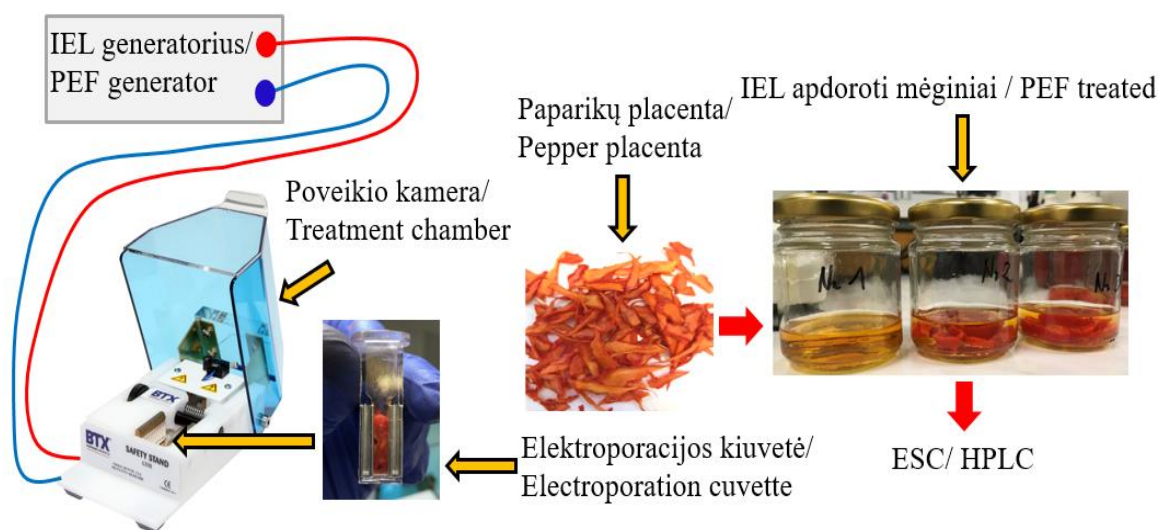
Tyrimo metu buvo naudojamos šviežios mėlynių uogos, kurios buvo saugomos +4 °C temperatūroje ne ilgiau nei 5 dienas prieš eksperimentą. Kiekvieno eksperimento pakartojimo metu buvo sunaudojama 10 g šviežių mėlynių uogų. Pirmiausia uogos buvo nuplaunamos distiliuotu vandeniu, vėliau padalijamos peiliu į dvi dalis ir patalpinamos į apdorojimo kamerą. Visų tyrimo eksperimentų metu elektrinio lauko stiprumas tarp apdorojimo kameros elektrodų buvo nuolatinis (3 kV cm⁻¹), tačiau keičiant impulsų skaičių, buvo keičiamas mėginiui suteiktos SEK (1, 5 ir 10 kJ kg⁻¹). Stačiakampių impulsų trukmė (20 μs) ir jų pasikartojimo dažnis (10 Hz) tyrimo metu nebuvo keičiami.

Kiekvienas IEL apdorotas mėginys buvo spaudžiamas 8 min 132 kPa slėgiu. Po sulčių spaudimo gauta skysta masė buvo centrifuguojama (ALC PK 130R, DJB Labcare Ltd, Newport, UK) 10 minučių esant 5000 aps./min greičiui ir +5 °C temperatūrai. Išgrynintos sultys buvo pasveriamos, gautas svoris perskaičiuojamas į santykinus masės vienetus (g/100 g šviežių uogų).

Po sulčių spaudimo gautos mėlynių uogų išspaudos buvo įdėtos į 50 ml talpos plastikinius indelius, pasvertos ir užpiltos etanolio (50 %, v/v) ir druskos (0,5 %, v/v) tirpalu, išlaikant tirpiklio ir išspaudų masės santykį 6:1 (ml/g). Tada konteineriai buvo užsandarinami aliuminio folija ir dedami į inkubatorių (S150, PBI International, Milan, Italy). Ekstrakcijos procesas buvo vykdomas 24 valandas kambario temperatūroje, bendrą masę maišant vienodu greičiu (150 aps./min). Gauti ekstraktai buvo filtruojami popieriniu filtru (Whatman No. 1) ir Biuchnerio piltuvu su akytu disku, tada saugomi +4 °C temperatūroje ir analizuojami ne vėliau nei tą pačią dieną po eksperimento atlikimo.

2.3. Aitriųjų vienmečių paprikų apdorojimas impulsiniais elektriniais laukais

Tyrimo metu aitriųjų paprikų apdorojimas IEL buvo atliekamas naudojant standartinę 4 mm elektroporacijos kiuvetę (BTX, Holliston, MA, USA), sudarytą iš dviejų vienas kitam lygiagrečių aliuminio elektrodų (žr. 2.2 pav.). Elektriniai impulsai į augalinę žaliavą buvo paduodami naudojant aukštos įtampos impulsų generatorių (BTX T 820, Holliston, MA, USA). Kiekvieno IEL apdorojimo metu impulsų srovė ir įtampa buvo matuojama naudojant aukštos įtampos zonďą (Pintek PA – 622, Pintek Electronics Co, Taiwan) ir skaitmeninį osciloskopą (Rigol DS2072A, Rigol Technologies Inc., USA), prijungtą prie apdorojimo kameros.



2.2 pav. Aitriosios paprikos placentos apdorojimo IEL struktūrinė schema

Fig. 2.2. Schematic representation of the PEF pre-treatment of chili pepper placenta

Tyrimo metu buvo naudojamos šviežios „Habanero“ (*Capsicum annum* L.) veislės paprikos (UAB Sanitex, Kaunas), kurios iki eksperimento buvo laikomos +4 °C temperatūroje. Prieš eksperimento atlikimo pradžią paprikos buvo nuplautos distiliuotu vandeniu, supjaustytos į keturias lygias dalis ir skalpeliu atskirtos nuo vaisių placentos. Kiekvieno eksperimento pakartojimo metu buvo panaudojama 0,5 g šviežios paprikų placentos. Tyrimo eksperimentų metu elektrinio lauko stiprumas (1; 2; 2,5; 3 kV cm⁻¹) tarp apdorojimo kameros elektrodų buvo keičiamas generatoriaus valdymo skyde nustatant skirtingą impulso įtampos amplitudę (400; 800; 1000; 1200 V). Keičiant impulsų skaičių, buvo keičiamas mėginiui suteiktos SEK (0,01, 1,1; 10; 12,8 kJ kg⁻¹). Stačiakampių impulsų trukmė (100 μs) ir jų pasikartojimo dažnis (1 Hz) tyrimo metu nebuvo keičiami.

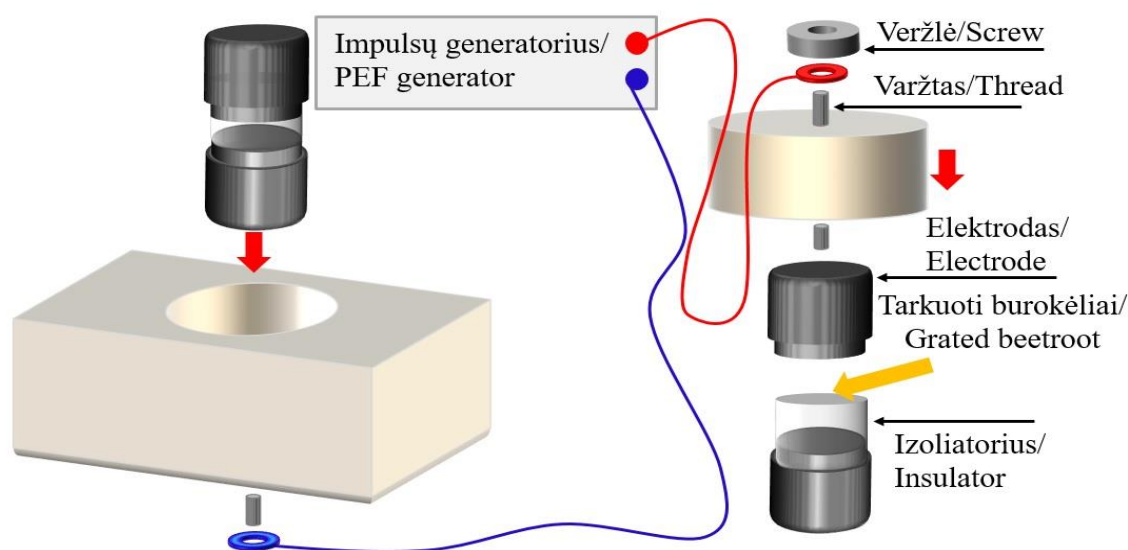
Iš karto po apdorojimo IEL mėginys buvo įdedamas į 25 ml talpos stiklinį indelį ir, atsižvelgiant į eksperimento tolimesnę eigą, užpilamas 5 ml etanolio (95 %, v/v) tirpalu arba distiliuotu vandeniu (pH 5,8). Tada stiklainis buvo užsandarinamas dangteliu ir kambario temperatūroje 5 min buvo vykdoma kapsaicinoidų ekstrakcija. Vėliau gauti ekstraktai buvo

centrifuguojami 5 min 500 aps./min greičiu centrifugoje. Tada centrifugatas buvo filtruojamas per 0,45 μm porų skersmens polivinilidenfluorido (PVDF) filtra, o gautas mėginys buvo naudojamas ESC analizei.

2.4. Raudonųjų burokėlių apdorojimas impulsiniais elektriniais laukais

Tyrimo metu raudonųjų burokėlių apdorojimas IEL buvo atliekamas naudojant cilindro formos apdorojimo kamerą, sudarytą iš vertikalaus akrilinio izoliatoriaus ir dviejų diskinės formos poliruotų nerūdijančio plieno elektrodų (žr. 2.3 pav.). Atstumas tarp elektrodų visų eksperimentų metu buvo 1 cm. Elektrodo paviršiaus plotas 24 cm^2 . Elektriniai impulsai į augalinę žaliavą buvo paduodami naudojant aukštos įtampos impulsų generatorių (BTX T 820, Holliston, MA, USA). Kiekvieno apdorojimo metu impulsų srovė ir įtampa buvo matuojama naudojant aukštos įtampos zondą (Pintek PA – 622, Pintek Electronics Co, Taiwan) ir skaitmeninį osciloskopą (Rigol DS2072A, Rigol Technologies Inc., USA) prijungtą prie apdorojimo kameros.

Tyrimo metu buvo naudojami švieži Kestrel H veislės burokėliai (LAMMC), kurie iki eksperimento buvo saugomi +4 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, tamsoje. Prieš eksperimento pradžią 20 šviežių burokėlių šakniagumbių buvo nuplauti distiliuotu vandeniu (pH 5,8) ir rankiniu būdu sutarkuoti buitine tarka, kurios griovelio ašmenys vienas nuo kito buvo nutolę 2 mm. Gauta tarkuota masė buvo sudedama į plastikinį indą ir rankiniu būdu maišoma 10 min. Kiekvienam apdorojimui IEL buvo naudojama 18 g tarkuotos masės. Tyrimo eksperimentų metu elektrinio lauko stiprumas (0,5; 1; 1,5; 2 kV cm^{-1}) tarp apdorojimo kameros elektrodų buvo keičiamas generatoriaus valdymo skyde nustatant skirtingą impulso įtampos amplitudę (500; 1000; 1500; 2000 V). Keičiant impulsų skaičių, buvo keičiamas mėginiui suteiktos SEK (0,04–97,86 kJ kg^{-1}). Stačiakampių impulsų trukmė (100 μs) ir jų pasikartojimo dažnis (1 Hz) tyrimo metu nebuvo keičiami.



2.3 pav. Raudonųjų burokėlių apdorojimo IEL struktūrinė schema

Fig. 2.3. Schematic representation of the PEF pre-treatment of beetroot

Iš karto po apdoravimo IEL 10 g paveikto mėginio buvo įdedama į 100 ml talpos stiklinį indelį ir užpilama 50 ml distiliuotu vandeniu (pH 5,8). Tada stiklainis buvo užsandarinamas dangteliu ir 60 min laikomas kambario temperatūroje, tamsoje. Gauti ekstraktai buvo filtruojami naudojant popierinį filtrą (Whatman No. 1), tada laikomi +4 °C temperatūroje, tamsoje ir spektrofotometriškai analizuojami ne vėliau nei 30 min. po eksperimento atlikimo.

2.5. Antocianinų nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Mėginio paruošimas. Po apdoravimo IEL gauti mėlynių sulčių ar jų išspaudų ekstraktai buvo atskiesti santykiu 1:10 naudojant 90 % skruzdžių rūgšties (10 %, v/v) ir 10 % acetonitrile ir metanolio tirpalą (85:15, v/v). Prieš ESC analizę paruošti mėginiai buvo filtruojami per 0,45 µm porų skersmens PVDF filtrą.

ESC analizė. Kokybinei ir kiekybinei antocianinų analizei buvo naudojamas chromatografas Waters 2695 su fotodiodų detektoriumi Waters 2998. Skirtingų antocianinų atskyrimui pasitelkta Excel 5 Super C18 kolonėlė (125 mm x 4,6 mm), porų dydis 5 µm. Analizių išplovimui naudoti du tirpikliai: eliuentas A – skruzdžių rūgštis (10 %) ir eliuentas B – ACN – MeOH (85:15 V/V). Injekcijos tūris 10 µl, eliuentų tėkmės greitis 1 ml/min, kolonėlėje palaikant +25 °C temperatūrą. Detekcija vykdoma esant 200–600 nm ultravioletinės šviesos bangos ilgiui, o antocianinai aptinkami esant 520 nm regimos šviesos bangos ilgiui 50 min (Wang ir kt., 2014).

Skirtingų antocianinų nustatymas. Etaloniniai tirpalai buvo ruošiami naudojant analitinį cianidin 3-gliukozidas standartą, atskiestą eliuente A (90 %, v/v) ir eliuente B (10 %, v/v).

Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei etaloninio junginio eliuacijos trukmės sutapimą. Vidutinis skirtingų antocianinų sulaikymo laikas etaloninių tirpalų chromatogramose buvo lyginamas su gautu prieš tai atliktų tyrimų metu (Lätti ir kt., 2008; Wang ir kt., 2014). Kiekybinis skirtingų antocianinų įvertinimas buvo atliktas naudojant standartinių tirpalų kalibracines kreives. Kalibracinės kreivės sudarymui buvo analizuojami 7 etaloniniai tirpalo skiedimai (nuo 1 iki 100 mg/l).

2.6. Kapsaicinoidų nustatymas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Mėginio paruošimas. Po IEL apdoravimo gauti etanoliniai arba vandeniniai tirpalai prieš ESC analizę buvo filtruojami per 0,25 µm porų skersmens PVDF filtrą.

ESC analizė. Kokybinei ir kiekybinei antocianinų analizei buvo naudojamas chromatografas Waters 2695 su fotodiodų detektoriumi Waters 996 (Waters Corporation, USA). Skirtingi kapsaicinoidai atskirti ACE C18 kolonėle (250 mm x 4,6 mm; Aberdeen, Scotland), porų dydis 5 µm (Dong ir kt., 2014).

Analičių išplovimui naudoti du tirpikliai: eliuentas A – trifluoracto rūgštis (0,1 %), eliuentas B – acetonitrilas. Injekcijos tūris 10 µl, o eliuentų tėkmės greitis 1 ml/min., kolonėlėje palaikant +25 °C temperatūrą. Detekcija vykdoma esant 280 nm ultravioletinės šviesos bangos ilgiui 16 min. (Dong ir kt., 2014).

Kapsaicino ir dihidrokapsaicino nustatymas. Etaloniniai tirpalai buvo ruošiami naudojant analitinius kapsaicino (≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich, Vokietija) ir dihidrokapsaicino (≥ 97,0 %, Sigma-Aldrich, Vokietija) standartus.

Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei etaloninio junginio eliacijos trukmės sutapimą. Vidutinis kapsaicino sulaikymo laikas etaloninių tirpalų chromatogramoje $8,314 \pm 0,0563$ min, o dihidrokapsaicino $11,060 \pm 0,081$ min. Kiekybinis kapsaicino ir dihidrokapsaicino įvertinimas buvo atliktas naudojant standartinių tirpalų kalibracines kreives. Sudarant kapsaicino kalibracinę kreivę, buvo analizuojami 6 etaloniniai tirpalo (0,255 mg/ml) skiedimai, o dihidrokapsaicino – 5 etaloninio tirpalo (0,242 mg/ml) skiedimai.

2.7. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas

Bendras antioksidacinis mėlynių sulčių ir išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas taikant laisvųjų radikalų surišimo (DPPH) ir geležies redukcinio aktyvumo (FRAP) nustatymo metodus.

DPPH metodu buvo įvertintas mėlynių sultyse ir išspaudų ekstraktuose esančių antioksidantų gebėjimas surišti DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) laisvuosius radikalus, o šis metodas buvo pritaikytas atsižvelgus į tyrimo metodiką, apibūdintą ankstesnių tyrimų autorių (Brand-Williams, 1995; Bobinaitė ir kt., 2015b).

FRAP metodas buvo pritaikytas remiantis Benzie ir Strain (1996) tyrimo metodika bei tam tikrais metodikos pakeitimais, atliktais siekiant tiksliau nustatyti mėlynių uogose esančių antocianų poveikį geležies redukciniam aktyvumui (Bobinaitė ir kt., 2015a). Gauti duomenys buvo palyginti su trolokso standartinių tirpalų kalibracine kreive.

Antioksidacinio aktyvumo apskaičiavimas. Mėlynių sulčių ir jų išspaudų ekstraktų antioksidaciniai aktyvumai apskaičiuoti pagal trolokso kalibravimo grafiką ir išreikšti trolokso ekvivalentu (TE, µmol) mikromoliais sulčių mililitrui ir gramui šviežios medžiagos. TE atitinka trolokso kiekį (µmol), kuris tokiomis pat tyrimo sąlygomis turi identišką antioksidacinį aktyvumą, kaip 1 g augalinės žaliavos. Tada TE apskaičiuojamas pagal formulę (Bobinaitė ir kt., 2015b):

$$TE = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_{band}(l)}{m_{band}(g)}, (\mu\text{mol/g}) \quad (2.1)$$

čia A – antioksidantiškai aktyvios analitės smailės plotas antioksidacinio aktyvumo chromatogramoje; a – nuolydis, b – nuokrypis iš trolokso kalibravimo grafiko regresijos lygties; V_{band} – tiriamos augalinės žaliavos ekstrakto bandinio tūris (l); m_{band} – tiriamo bandinio atsvertas kiekis (tiksliai masė, g).

2.8. Betalainų kiekybinis vertinimas spektrofotometrinio metodu

Betaksantinų ir betacianinų absorbcija buvo matuojama esant 485 nm ir 536 nm regimos šviesos bangos ilgiams, panaudojant DU-800 spektrofotometrą (Beckman Coulter Inc., Brea, California, USA), o šių junginių kiekis nustatytas pasitelkus lygtį (Wruss ir kt., 2015):

$$\text{Betaksantinai arba Betacianinai} = \frac{A \cdot DF \cdot MW \cdot 1000}{\epsilon \cdot i}, \text{ mg/l} \quad (2.2)$$

čia $A = A_{536 \text{ nm}} - A_{650 \text{ nm}}$ (betacianinų atveju) arba $A = A_{485 \text{ nm}} - A_{650 \text{ nm}}$ (betaksantinų atveju), DF – nufiltruoto ekstrakto skiedimo koeficientas, MW (molekulinė masė) = 550 g/mol (betacianinų) ir 308 g/mol (betaksantinų), ϵ ($L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) – molinis sugerties koeficientas. Šis koeficientas betacianinams yra 60 000, o betaksantinams 48 000. i – spektrofotometrinės kiuvetės plotis (1 cm). Gautas kiekis iš mg/l buvo perskaičiuotas į santykinius masės vienetus mg/100 g šviežio burokėlio.

2.9. Baigtinių elementų metodas

Baigtinių elementų metodas (BEM) – tai matematinis, skaitine algebra pagrįstas metodas, kuriuo yra apskaičiuojamas fizikinės sistemos pokyčio sprendinys konkrečiame kontinuumo taške (Logan, 2001). Pirmiausia geometrinis kūnas, kuriame bus ieškomi sprendiniai, yra suskaidomas į baigtinį skaičių elementų, kurie tarpusavyje jungiasi sąlyčio taškais arba briaunomis. Tada kiekvieno elemento srityje esančio nežinomojo pokytį aprašanti diferencialinė lygtis pakeičiama algebrinių lygčių sistema, o sujungus šias aprašančias lygtis į vieną skaitinę sistemą, yra gaunamas diferencialinės lygties sprendinio artinys (Reddy, 1984).

Kai elektrinis potencialas geometrinio kūno aplinkoje yra nurodomas kaip skaitinis algebrinis dydis, tada elektrinio krūvio poliarizacija elektriniame lauke gali būti aprašoma Omo dėsniumi, išpildant geometrinio kūno kontinuumo sąlygą (Tabatabaian, 2014):

$$J = \sigma \cdot E, \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot J = 0, \quad (2.4)$$

čia J – elektrinės srovės tankis, (A/m^2); σ – elektrinis laidumas, (S); E – elektrinio lauko stipris, ($V \cdot m^{-1}$); t – elektrinio lauko apdoravimo trukmė, (s); ρ – erdvinis krūvio tankis, (C/m^3); ∇ – Laplaso operatorius.

Krūvininkų poliarizacija taip pat gali būti aprašoma Gauso dėsnio:

$$\nabla \cdot (\varepsilon \cdot E) = \rho. \quad (2.5)$$

Sujungus abu dėsnius, galima išvesti diferencialinę lygtį, nurodančią homogeniškos medžiagos erdvinį krūvio tankį:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\sigma}{\varepsilon} \cdot \rho = 0, \quad (2.6)$$

kai šios lygties sprendinys:

$$\rho(t) = \rho_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (2.7)$$

tada elektrinį krūvį turinčių dalelių poliarizacijos elektriniame lauke laikas (ang. *charge relaxation time*):

$$\tau = \frac{\varepsilon}{\sigma}. \quad (2.8)$$

Jeigu $\tau \sim t$, tada laiko harmonikos kontinuumo sąlyga yra

$$\nabla \cdot J = \nabla \cdot (\sigma \cdot E + J^e) = -j \cdot \omega \cdot \rho, \quad (2.9)$$

čia $\nabla \cdot D = \rho$, išreiškiama elektrinio krūvio pasiskirstymo elektriniame lauke lygtimi:

$$\nabla \cdot J = \nabla \cdot (\sigma \cdot E + J^e) = \frac{\partial \rho}{\partial t}, \quad (2.10)$$

čia D – elektrinio krūvio poslinkis, (C/m^2), J^e – išorinio elektrinio lauko sukurtas srovės tankis, (A/m^2).

Tada bendroji krūvio laikinės analizės lygtis išreiškiama taip:

$$-\nabla \cdot d_{\partial t}^{\partial} ((\varepsilon_0 \cdot \nabla \cdot V + P) - \nabla \cdot (\sigma \cdot \nabla \cdot V - J^e)) = 0, \quad (2.11)$$

čia V – elektrinė įtampa, (V).

Atsižvelgiant į numanomą krūvininkų poliarizacijos laiką ir elektrinio lauko apdorojimo trukmę, yra nustatomas fizikinės analizės tipas. Galimi šie variantai:

- Kai $\tau > t$, tada elektrinio lauko apdorojimas yra per trumpas tam, kad orientuotų elektringąsias daleles elektriniame lauke ir tarp elektrodų pradėtų tekėti elektros srovė. Sprendžiami elektrostatikos uždaviniai nuolatinėje sistemoje.
- Kai $\tau < t$, tada elektringosios dalelės poliarizuojasi elektriniame lauke, o tarp elektrodų teka vienodo dydžio elektros srovė. Tokiu atveju simuliuojamas elektros srovės tekėjimas nuolatinėje sistemoje.
- Kai $\tau \sim t$, tada vyksta pereinamasis procesas, o tarp elektrodų tekančios srovės dydis priklauso nuo elektrinio lauko apdorojimo trukmės bei pobūdžio. Simuliuojamas elektrinės srovės tekėjimas dinaminėje sistemoje.

Atsižvelgiant į tai, kad matematinio modeliavimo metu buvo numatyta naudoti vieną elektros impulsą, kurio trukmė 100 μs , buvo pasirinktas laikinės analizės studijų tipas ($\tau \sim t$).

2.10. Impulsinio elektrinio lauko stiprumo ir suteiktos specifinės energijos kiekio apskaičiavimas

IEL stiprumas tarp stacionarios apdorojimo kameros elektrodų buvo apskaičiuotas išmatuotą elektrinio impulso amplitudinės įtampos reikšmę padalijus iš atstumo tarp elektrodų dydžio (Raso ir kt., 2016):

$$E = \frac{U_{amp}}{d}, \quad (2.12)$$

čia E – elektrinio lauko stiprumas, $V \text{ cm}^{-1}$; d – atstumas tarp apdorojimo kameros elektrodų, cm ; U_{amp} – impulso amplitudinė įtampa, V .

Elektrinio impulso metu augalinei žaliai suteiktos specifinės energijos (W_p) kiekis buvo apskaičiuotas impulso amplitudinės įtampos reikšmę padauginus iš šio impulso metu tarp apdorojimo kameros elektrodų pratekančios elektrinės srovės dydžio bei šio impulso trukmės (Raso ir kt., 2016):

$$W_p = U_{amp} \cdot I \cdot \tau, \quad (2.13)$$

čia W_p – impulso metu suteiktos SEK, $J \text{ kg}^{-1}$; U_{amp} – impulso amplitudinė įtampa, V ; I – impulso metu tarp apdorojimo kameros elektrodų pratekančios elektrinės srovės dydis, A ; τ – impulso trukmė, s . Bendras apdorojimo IEL suteiktos SEK (W_T) buvo apskaičiuojamas 1 impulso metu suteiktos energijos kiekį padauginus iš impulsų skaičiaus.

2.11. Ląstelių dezintegracijos lygio vertinimas

Ląstelių dezintegracijos indekso (Z_p) skaičiavimas. Pirmiausiai buvo matuojamas neapdoroto ir apdoroto IEL mėginio kompleksinės varžos dydis, kai tarp matavimo prietaiso (LCR-8105G, GW Instek America Corp., CA, USA) gnybtų yra paduodamas kintamos įtampos signalas. Matavimai atliekami signalą paduodant 1 kHz ir 5 MHz dažniu, kai signalo amplitudinė įtampa yra 1 V. Dezintegracijos indeksas apskaičiuojamas lygtimi (Donsi ir kt., 2010b):

$$Z_p = \frac{|Z_{untr(1kHz)}| - |Z_{tr(1kHz)}|}{|Z_{untr(1kHz)}| - |Z_{tr(5MHz)}|}, \quad (2.14)$$

čia Z_{untr} – IEL neapdoroto mėginio impedanso dydis, išmatuotas esant 1 kHz dažniui; Z_{tr} – IEL apdoroto mėginio impedanso dydis, išmatuotas esant 1 ir 5 kHz dažniui. Z_{tr} matuojamas praėjus 5 s po apdorojimo IEL. Kai augalinės žaliavos ląstelių membranos yra visiškai suardytos, dezintegruotos, tada $Z_p = 1$, o kai visiškai sveikos, tada $Z_p = 0$. Tyrimais buvo įrodyta, kad impedanso reikšmė, gaunama veikiant 5 MHz dažniu, atitinka augalinio audinio elektrines

savybes, kurios išryškėja tada, kai augalinis audinys yra užšaldomas ir atitirpinamas (Ade-Omowaye ir kt., 2000).

Betalainų ekstrakto savitojo elektrinio laidumo matavimas. Elektriniai betalainų ekstraktų laidumai yra matuojami iš karto po to, kai paruošiami spektrofotometrinės analizės analitiniai mėginiai. Matavimų metu savitojo elektrinio laidumo matavimo prietaiso (Meter Toledo Seven Compact pH meter S210, Merk KGaA, Germany) zondas yra panardinamas iki nurodytos žymos į ekstraktą, esantį 100 ml Erlenmejerio kolboje, ir po tam tikro laiko išsaugoma nusistovėjusi reikšmė. Po kiekvieno matavimo prietaiso zondas yra nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir nusausinamas minkštu popieriumi.

2.12. Programinė įranga

Matematinis elektroporuotos ląstelės modelis buvo sukurtas naudojant Comsol 5,2 *Multiphysics* programinį paketą (Comsol Inc., Stockholm, Sweden). Bandomosios versijos kodas: 9FFF3FFFF7F5–TYFI–160224–10073638–594017123.

2.13. Tyrimo duomenų statistinis įvertinimas

Kapsaicinoidų ESC ir betalainų spektrofotometrinės analizės metu gautų duomenų statistinis įvertinimas atliktas kompiuterine programa MS Excel (Microsoft, JAV). Mėlynių sulčių ekstrakcijos išeigos ir antocianinų kiekio duomenų statistinė analizė buvo atlikta naudojant kompiuterinę programą SPSS (SPSS Inc., Čikaga, JAV).

Statistiškai patikimi skirtumai tarp skirtingų ėminių buvo nustatyti atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę taikant daugkartinio palyginimo Turkey's HSD kriterijų. Skirtumai vertinti kaip statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$. Duomenys pateikti kaip 3 rezultatų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Antocianinų ekstrakcijos išeiga po apdorojimo impulsiniais elektriniais laukais

3.1.1. Impulsinio elektrinio lauko įtaka mėlynių sulčių išeigai

Sulčių išeiga iš IEL paveiktų mėlynių uogų buvo vidutiniškai 32 % didesnė nei iš IEL neapdorotų uogų (žr. 3.1 lent.).

3.1 lentelė. Mėlynių sulčių išeiga, redukcinis (FRAP) ir antioksidacinis (DPPH) mėlynių sulčių aktyvumai prieš (0 kJ kg^{-1}) ir po apdorojimo 3 kV cm^{-1} stiprumo IEL

Table 3.1. Blueberry juice yield, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and DPPH radical scavenging capacity (DPPH) of juice and press cake extracts of untreated (0 kJ kg^{-1}) and PEF treated (3 kV cm^{-1}) blueberry fruits

W _T (kJ kg ⁻¹)	Sulčių išeiga/ Juice yield	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP
	g/100 g	μmol TE/mL (sulčių/juice)		μmol TE/g (išspaudų/press cake)	
0	42,7±1,00 ^a ₁	2,9±0,15 ^a ₁	4,8±0,28 ^a ₁	16,4±2,20 ^a ₁	39,8±1,13 ^a ₁
1	55,9±1,77 ^b ₂	3,5±0,03 ^b ₂	5,5±0,38 ^b ₂	29,0±0,30 ^b ₂	55,9±0,38 ^b ₂
5	57,4±1,42 ^c ₂	3,7±0,10 ^c _{2,3}	6,2±0,38 ^c ₃	32,6±1,19 ^c _{2,3}	61,4±0,68 ^c ₃
10	56,3±1,57 ^d ₂	4,1±0,31 ^d ₃	6,5±0,58 ^d ₃	34,2±0,93 ^d ₃	68,0±1,48 ^d ₄

Pastaba: Tame pačiame stulpelyje esančios skirtingos raidės, neturinčios sutampantių skaitinių indeksų, žymi statistiškai patikimus ($p \leq 0,05$) skirtumus tarp tirtų grupių. Grupės, turinčios bent po vieną sutampantį indeksą, statistiškai patikimai ($p \leq 0,05$) nesiskiria.

Note. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p \leq 0,05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index).

Sulčių išeigos rezultatai, po apdorojimo IEL suteikto skirtingo specifinės energijos kiekio, neparodė statistiškai patikimų skirtumų. Galima teigti, kad mažiausias tyrimo metu naudotos suteiktos SEK buvo pakankamas padidinti sulčių ekstrakcijos efektyvumą, o didesni suteiktos energijos kiekiai (5 ir 10 kJ kg^{-1}) neturėjo reikšmingos įtakos ekstrakcijos procesui, palyginti su silpnesniu apdorojimu. Tokie rezultatai nekoreliuoja su ląstelių dezintegracijos indekso (Z_p) reikšmėmis, gautomis po mėlynių uogų elektroporacijos, panaudojus skirtingą IEL stiprumą (Bobinaitė ir kt., 2015a). Šio tyrimo metu buvo pastebėta, kad esant fiksuotam IEL stiprumui (3 kV cm^{-1}) ir keičiant suteiktos specifinės energijos kiekį (1 , 5 ir 10 kJ kg^{-1}), ląstelės dezintegracijos indeksas keitėsi nežymiai ($0,73$; $0,77$ ir $0,80$). Statistiškai patikimi skirtumai buvo tik tarp ląstelių dezintegracijos indeksų po 1 ir 10 kJ kg^{-1} poveikių. Jaeger ir kt. (2012) taip pat ištyrė, kad suteiktos specifinės energijos kiekiai, didesni nei 2 kJ kg^{-1} , neturėjo reikšmingos įtakos obuolių sulčių išeigai po apdorojimo IEL. Tačiau tokie rezultatai gali būti aiškinami tuo, kad per

stiprus IEL arba per didelis suteiktos SEK gali dezintegruoti augalinę struktūrą taip, kad gali pablogėti sulčių ištekėjimas iš spaudžiamos augalinės struktūros (Jaeger ir kt., 2012). Paprastai sulčių spaudimo efektyvumas priklauso nuo uogų sunokimo lygio ir audinio tekstūros savybių, spaudžiamos frakcijos dydžio, taip pat nuo sulčių spaudimo metodo (Jaeger ir kt., 2012).

Apibendrinant galima teigti, kad tyrime naudotas apdorojimas IEL, kurio metu buvo suteiktas 1 kJ kg^{-1} SEK, gana stipriai dezintegravo mėlynių uogų ląsteles ir kartu reikšmingai padidino mėlynių sulčių išėigą.

3.1.2. Impulsinio elektrinio lauko įtaka antocianinų ekstrahavimui iš mėlynių uogų

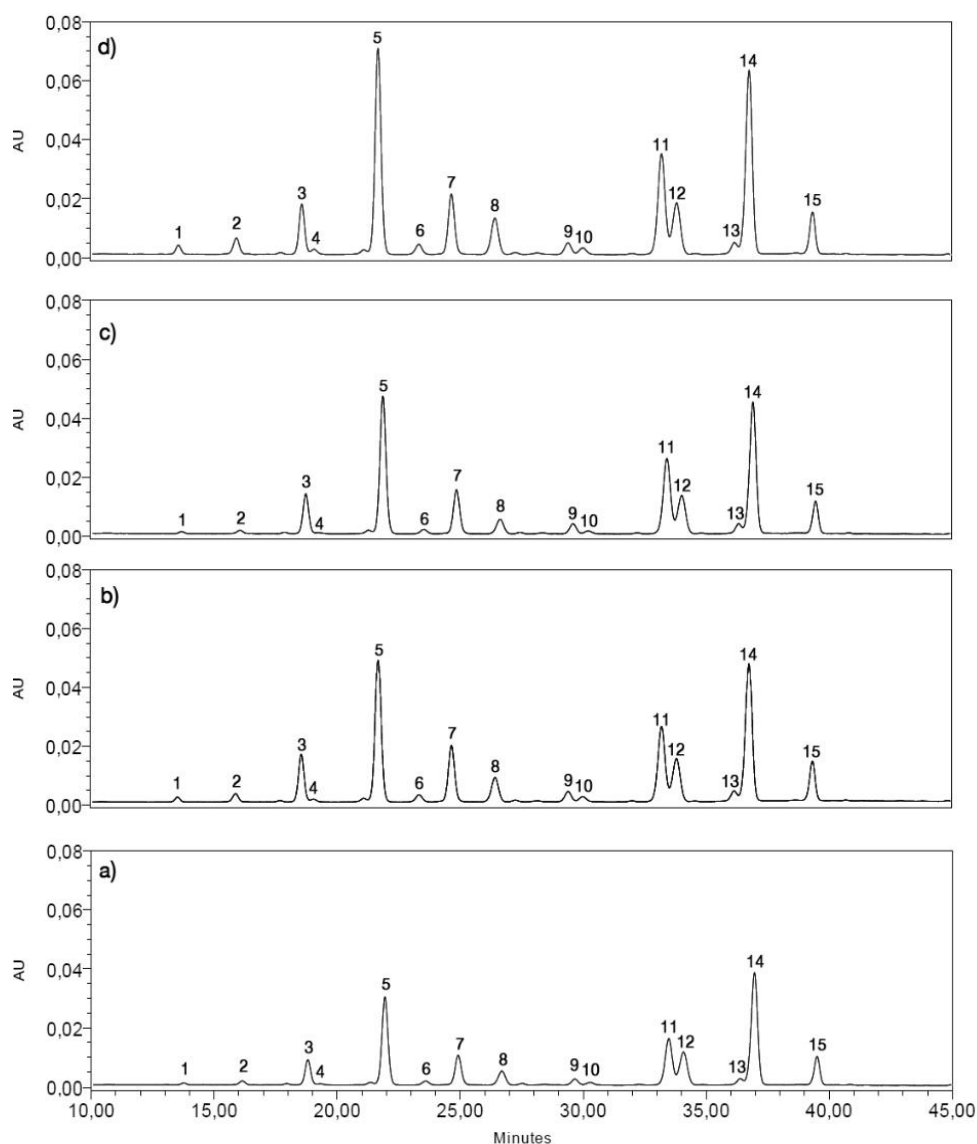
Mėlynių uogas paveikus skirtingo specifinio energijos kiekio IEL, buvo išspausintos sultys ir atlikta šių sulčių ESC.

Gauti rezultatai parodė (žr. 3.1 pav.), kad nei vienas iš tyrime naudotų apdorojimų IEL neturėjo neigiamos įtakos skirtingų antocianinų identifikavimui. Tai, kad tyrimas buvo atliktas korektiškai, patvirtina panašios mėlynių sulčių chromatogramos, gautos ir kitų autorių (Laaksonen ir kt., 2010).

Nustatyta, kad iš visų antocianidinų, aptiktų kontrolinių mėginių sulčių ekstraktuose, malvidinų (37,3 %) ir cianidinų (34,4 %) buvo aptikta daugiausiai, o peonidinų (16,3 %), petunidinų (7,8 %) ir delphinidinų (4,2 %) – mažiausiai. Išsiaiškinta, kad malvidin 3-gliukozidas ir cianidin 3-gliukozidas buvo pagrindiniai antocianinai. Be to, vidutinis antocianidino galaktozės ir arabinozės kiekis mėlynių sultyse buvo atitinkamai 3,1 ir 3,5 karto mažesnis nei antocianidino gliukozės (žr. 3.2 pav.).

Vertinant pateiktus duomenis (žr. 3.1 pav.), galima daryti išvadą, kad tiek nepaveiktų, tiek apdorotų IEL mėlynių sulčių chromatogramų atsikartojamumas yra panašus. Šis rezultatas patvirtina, kad apdorojimas IEL nesukėlė antocianinų degradacijos.

Labai panašūs rezultatai buvo gauti palyginus antocianinų chromatogramas, gautas ESC metodu, analizuojant vynuogių vyną, pagamintą iš neapdorotų ir apdorotų IEL vynuogių (Lopez ir kt., 2009).

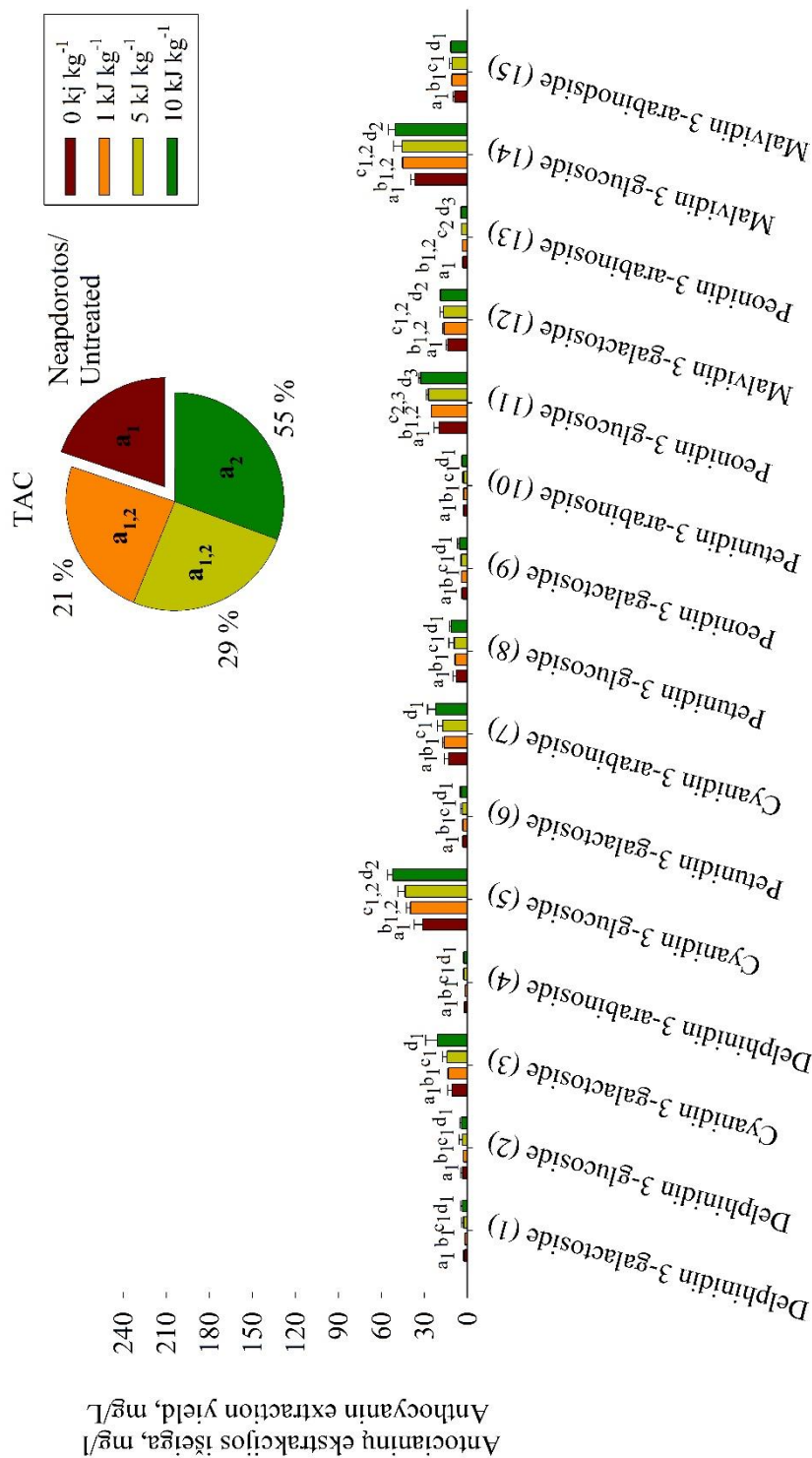


3.1 pav. ESC chromatogramos po skirtingų apdorojimų IEL: a) IEL neapdorotos uogos ir apdorotos, b) 1 kJ kg^{-1} , c) 5 kJ kg^{-1} ir d) 10 kJ kg^{-1}

Fig. 3.1. HPLC profiles of anthocyanins in juices of a) untreated, and PEF pre-treated (3 kV cm^{-1}) blueberry fruits of, b) 1 kJ kg^{-1} , c) 5 kJ kg^{-1} and d) 10 kJ kg^{-1}

Atkreiptinas dėmesys, kad IEL lauko sukelta mėlynių uogų elektroporacija selektyviai paveikė skirtingų antocianinų ekstrakcijos efektyvumą. Paveiksle (žr. 3.2 pav.) pateikti duomenys atskleidžia, kad po apdorojimo IEL statistiškai patikimai ($p \leq 0.05$) padidėjo malvidin 3-gliukozido, cianidin 3-gliukozido, peonidin 3-gliukozido, malvidin 3-galaktozės ir peonidin 3-arabinozės kiekiai mėlynių sulčių ekstrakto, o kitų antocianinų kiekio padidėjimas nebuvo statistiškai patikimas.

Šie rezultatai iš dalies sutampa su anksčiau atlikto tyrimo (Puertolas ir kt., 2013) išvadomis, kuriose teigiama, kad vyno gamybai panaudojus IEL apdorotas vynuogių išspaudas, paruoštas vynas turėjo statistiškai patikimai ($p \leq 0.05$) didesnę malvidin 3-gliukozido, peonidin 3-gliukozido ir cianidin 3-gliukozido kiekį.



3.2 pav. Skirtingų antocianinų koncentracija mėlynių uogų sultyse ir suminis šių junginių kiekis, gautas po skirtingų IEL apdorimų. Tame pačiame stulpelyje esančios skirtingos raidės, neturinčios sutampančių skaitinių indeksų, statistiškai patikimai ($p \leq 0.05$) nesiskiria tirtų grupių. Grupės, turinčios bent po vieną sutampanių indeksą, statistiškai patikimai ($p \leq 0.05$) nesiskiria

Fig. 3.2. Concentration of individual and total anthocyanins content of blueberry juice obtained after pressing of untreated and PEF treated berries. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

Rezultatai parodė, kad skirtingi apdorojimai IEL, kurių metu buvo suteikti 1, 5 ir 10 kJ kg⁻¹ specifinės energijos kiekiai, atitinkamai 21 %, 29 % ir 55 % padidino bendrą antocianinų kiekį (TAC) mechaniškai išspaustų mėlynių sultyse (žr. 3.2 pav.). Tačiau tik 10 kJ kg⁻¹ apdorojimas parodė statistiškai patikimai ($p \leq 0,05$) didesnę bendro antocianinų kiekio padidėjimą sultyse, palyginti su kontroliniais mėginiais.

Apibendrinant galima teigti, kad norint pasiekti efektyviausią antocianinų ekstrakciją iš mėlynių uogų, augalinei žaliavai IEL apdorojimo metu suteiktas specifinės energijos kiekis turi būti ne mažesnis nei 10 kJ kg⁻¹.

3.1.3. Impulsinio elektrinio lauko įtaka antocianinų kiekiui mėlynių uogų išspaustu ekstraktuose

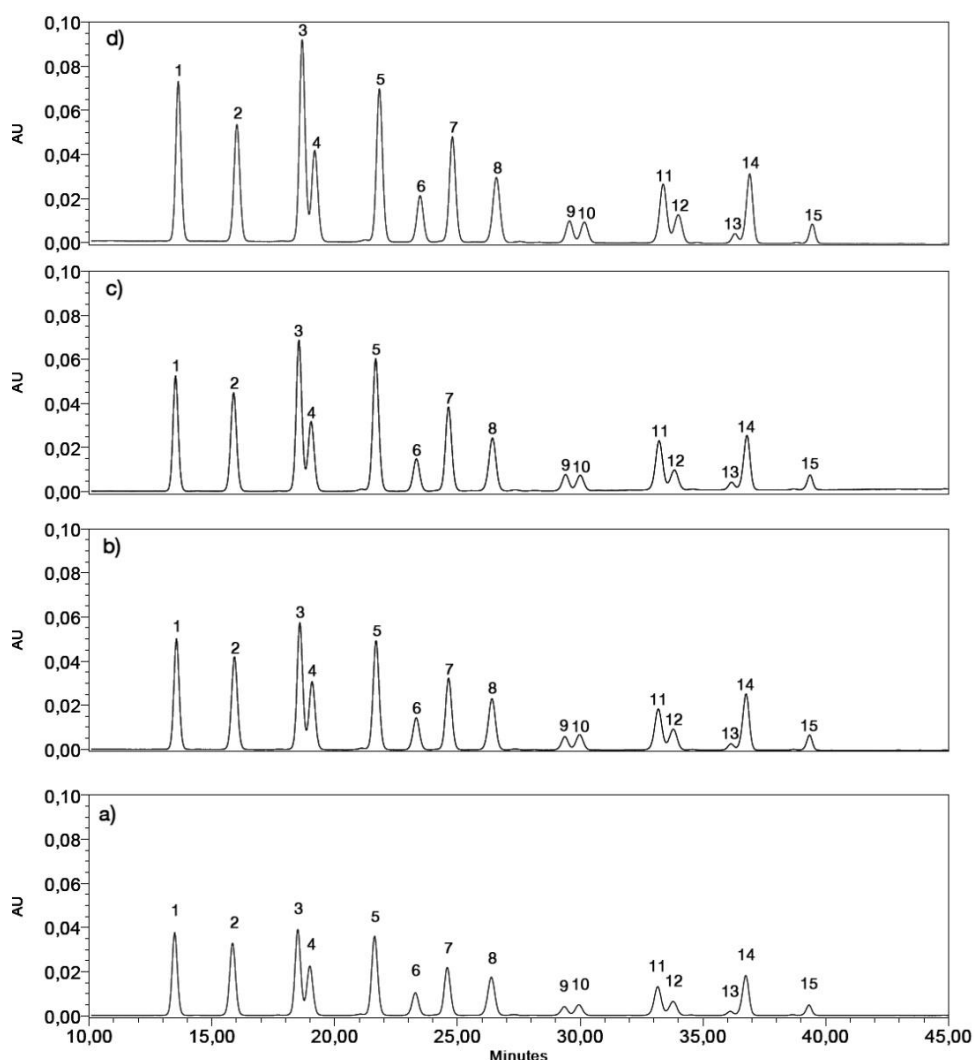
Atlikus ESC analizę prieš ir po apdorojimo IEL, mėlynių išspaustu ekstraktuose buvo identifikuota 15 skirtingų antocianinų (žr. 3.3 pav. ir 3.4 pav.). Ekstraktuose, kurie nebuvo apdoroti IEL, didžiausią kiekį sudarė antocianidiniai buvo cianidinas (34,2 %) ir delfinidinas (30,1 %), o mažiausiai buvo identifikuota petunidino (13,9 %), malvidino (12,8 %) ir peonidino (9,0 %). Matavimai parodė, kad pagrindines antocianinų cukrines dalis sudarė gliukozė ir galaktozė, o daugiausiai aptikta šių antocianinų: cianidin 3-galaktozido, cianidin 3-gliukozido, delfinidin 3-galaktozido ir delfinidin 3-gliukozido. Pažymėtina, kad išspaustu ekstrakte surastas didelis kiekis delfinidino yra ypač reikšmingas, žinant tai, kad delfinidino ir monogliukozido junginys pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu iš visų mėlynių uogose randamų antocianinų ir antocianinų (Kähkönen ir Heinonen, 2003).

Mėlynių išspaudas paveikus skirtingo specifinės energijos kiekio apdorojimais IEL, po ESC analizės buvo identifikuoti tie patys antocianinai. Kiekybinis vertinimas atskleidė, kad apdorojimai IEL statistiškai patikimai padidino visų nustatytų antocianinų kiekį ekstrakte (žr. 3.4 pav.). Gautus duomenis palyginus su kontrolės rezultatais, buvo pastebėta, kad naudoti IEL apdorojimai nustatytų antocianinų ekstrakcijos efektyvumą paveikė skirtingai. Pavyzdžiui, apdorojimas IEL, kurio metu buvo panaudota impulsų seka, atitinkanti 10 kJ kg⁻¹ specifinės energijos kiekį, delfinidino, cianidino, petunidino, peonidino ir malvidino kiekį ekstrakte, palyginti su kontrole, atitinkamai padidino 82,4 %, 76,9 %, 74 %, 63,6 % ir 62 %.

Kaip ir tyrimo, aptarto ankstesniame skyriuje metu, šie rezultatai taip pat patvirtina, kad apdorojimo IEL įvykusi ląstelių membranų elektroporacija sukėlė selektyvią antocianinų ekstrakciją. Kita vertus, seniau tyrimus atlikusių autorių darbuose nurodyta, kad identifikuotų fenolinių junginių skaičius ekstrakte iš esmės priklauso nuo šių junginių santykinės lokalizacijos ir didžiausio galimo kiekio tam tikroje audinio vietoje, taip pat cheminės struktūros ir stabilumo esant išoriniam poveikiui – audinio apdorojimui (Barba ir kt., 2015a; Corrales ir kt., 2008). Kitais tyrimais nustatyta, kad apdorojimas IEL kur kas labiau padidino tų antocianinų kiekį vynuogių

išspaudų ekstrakte, kurie buvo konjuguoti su monogliukozidais nei aciluoti su gliukozidais (Corrales ir kt., 2008). Barba ir kt. (2015b) pastebėjimu, vynuogių išspaudas apdorojus IEL, antocianinų ekstrakcija buvo kur kas efektyvesnė nei kitų fenolinių junginių. Autoriai pamini ir tai, kad po IEL apdoravimo malvidin 3-*O*-gliukozido koncentracija ekstrakte buvo pati didžiausia, palyginti su kitais nustatytais antocianiniais.

Kita vertus, būtina pažymėti, kad apdoravimo IEL metu augalinei žaliai suteikti dideli išorinės elektrinės energijos kiekiai gali lemti naudingų biologinių junginių degradaciją arba pabloginti šių junginių ekstrakcijos efektyvumą (Kahmič-Kalamiza ir kt., 2014). Tačiau, remiantis ankstesnių autorių (Luengo ir kt., 2013; Lopez ir kt., 2009) gautomis ESC metodo chromatogramomis ir šio tyrimo metu gautais rezultatais (žr. 3.3 pav.), galima teigti, kad impulsinio elektrinio lauko parametrai buvo parinkti tinkamai ir nesukėlė antocianinų degradacijos.



3.3 pav. ESC chromatogramos po skirtingų apdorojimų IEL: a) IEL neapdorotos uogos ir apdorotos, b) 1 kJ kg^{-1} , c) 5 kJ kg^{-1} and d) 10 kJ kg^{-1}

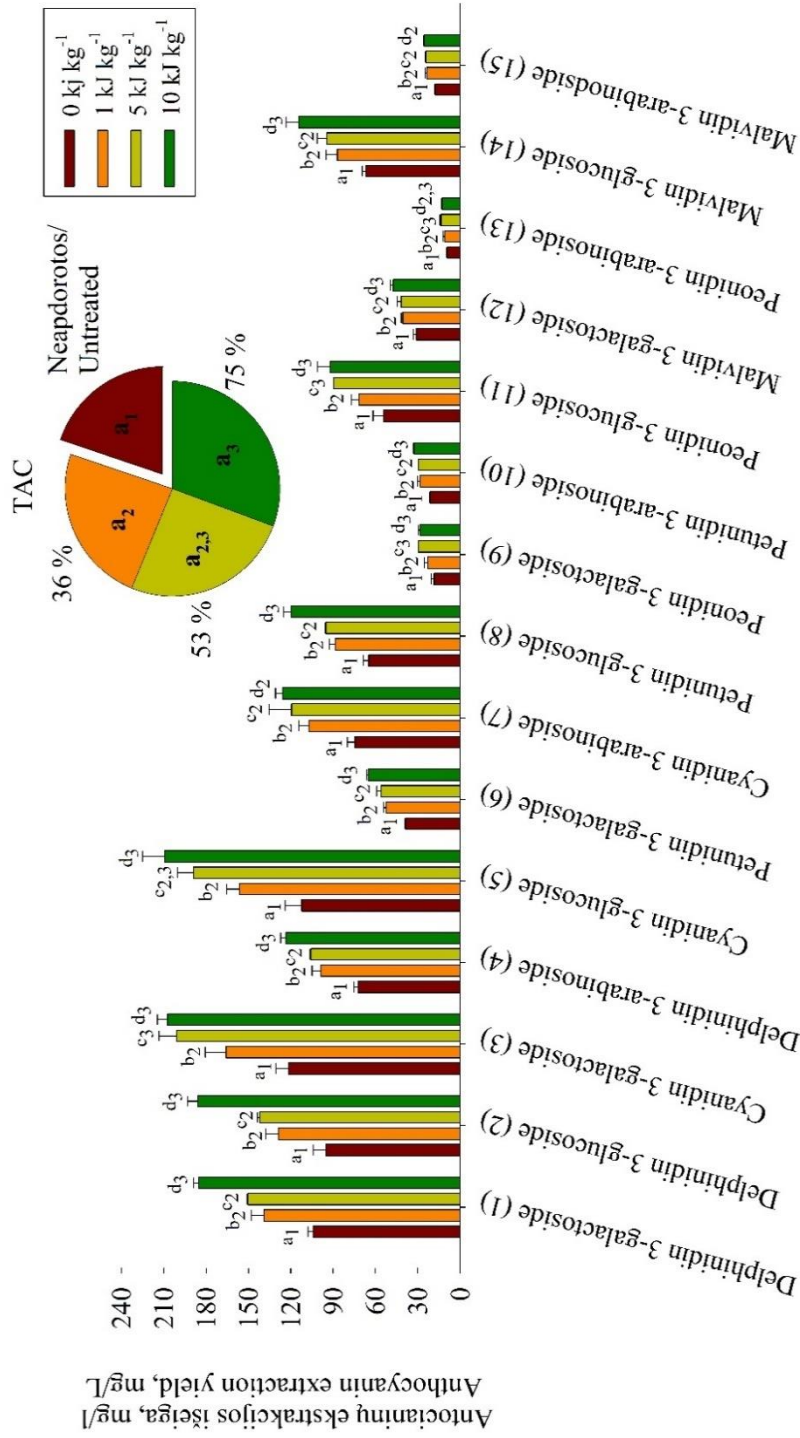
Fig. 3.3. HPLC profiles of anthocyanins in the extracts from press cakes obtained after pressing of the PEF of a) untreated, and PEF treated blueberry fruits at, b) 1 kJ kg^{-1} , c) 5 kJ kg^{-1} and d) 10 kJ kg^{-1}

Rezultatai atskleidžia (žr. 3.4 pav.), kad antocianinų ekstrakcijos efektyvumas po išspaudų apdoravimo IEL buvo kur kas didesnis, palyginti su kontroliniais mėginiais, – IEL apdorotos išspaudos (po ekstrakcijos) vis dar išlaikė didelį kiekį antocianinų. Panašius rezultatus ekstrahuojant antocianinus iš *V. myrtillus* uogų išspaudų, nenaudojant IEL, gavo ir kiti autoriai (Laaksonen ir kt., 2010).

Skirtingi (1; 5; 10 kJ kg⁻¹) apdorojimai IEL reikšmingai padidino (36 %, 53 %, 75 %) bendrą antocianinų kiekį (TAC) mėginių ekstraktuose, palyginti su nustatytu antocianinų kiekiu nepaveiktų išspaudų ekstraktuose, tačiau statistiškai patikimi ($p \leq 0.05$) skirtumai buvo rasti tik tarp kontrolės ir 10 kJ kg⁻¹ apdoravimo. Tai reiškia, kad apdoravimo IEL sukeltas ląstelių elektroporacijos reiškinys turėjo teigiamą įtaką antocianinų ekstrakcijai net ir iš mažų (apie 40 μm (Jäger, 2013) ląstelių esančių mėlynių odelėse. Apibendrinant rezultatus, gautus šio tyrimo metu, galima teigti, kad kai mėlynių išspaudų apdorojimui buvo panaudotas IEL, suteiktos specifinės energijos (1–10 kJ kg⁻¹) kiekis iš esmės nulėmė antocianinų ekstrakcijos efektyvumą.

Palyginus rezultatus, pateiktus paveikslėliuose (žr. 3.1 pav. ir 3.3 pav.), akcentuotina, kad chromatogramos, gautos analizuojant mėlynių sultis ir jų išspaudų ekstraktus, yra panašios, tačiau skiriasi nustatyti antocianidinų ir antocianinų kiekiai. Šie skirtumai gali būti aiškinami tuo, kad skirtingų antocianinų koncentracija mėlynių uogos audiniuose (odelė, mezokarpas) yra nevienoda, bei tuo, kad ekstrahuoti šiuos junginius iš ląstelių esančių odelėse yra kur kas sunkiau nei iš mezokarpo (Corrales ir kt., 2008; Barba ir kt., 2015a). Nustatyta, kad didžioji dalis antocianinų aptinkama būtent *V. myrtillus uogų* odelėse, o vakuolėse randami palyginti tik maži šių junginių kiekiai (Laaksonen ir kt., 2010). Išsiaiškinta ir tai, kad mėlynių uogos mezokarpo ląstelės yra kur kas didesnės (apie 140 μm), palyginti su ląstelėmis (apie 40 μm), kurios sudaro šių uogų odeles (Jaeger ir kt., 2012). Todėl, remiantis fundamentiniais elektroporacijos dėsniais, galima kelti prielaidą, kad, norint pasiekti efektyvią išspaudas sudarančių ląstelių elektroporaciją, būtinas stipresnis elektrinis laukas, nei tuo atveju, kai IEL yra veikiamos šviežios uogos.

Puertolas ir kt. teigimu, etanolis dezintegruoja ląstelių membranas tirpindamas jų fosfolipidus (Puertolas ir kt., 2013), todėl manytina, kad ilgesnis ekstrakcijos laikas tirpiklyje turėtų padėti kompensuoti per silpną impulsinio elektrinio lauko stiprumą ir padidinti antocianinų ekstrakcijos efektyvumą iš mėlynių uogų odelių.



3.4 pav. Skirtingų antocianinų koncentracija mėlynių išspaudų ekstraktuose ir suminis šių junginių kiekis, gautas po skirtingų IEL apdorimų.

Tame pačiame stulpelyje esančios skirtingos raidės, nurodintos sutampančių skaitinių indeksų, žymi statistiškai patikimus ($p \leq 0.05$) skirtumus tarp tirtų grupių. Grupės, turinčios bent po vieną sutampančių indeksą, statistiškai patikimai ($p \leq 0.05$) nesiskiria

Fig. 3.4. Concentration of individual and total anthocyanins content of extracts from bluberry press cake obtained after pressing of untreated and PEF treated berries. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no

significance between bars with the same index

3.1.4. Impulsinio elektrinio lauko įtaka mėlynių sulčių ir jų išspaudų ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui

Bendras mėlynių sulčių ir išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo vertinamas taikant DPPH ir FRAP metodus (žr. 3.1 lent.). Tyrimo metu nustatyta, kad tiek sulčių, tiek išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, įvertintas DPPH metodu, buvo mažesnis, nei nustatytas panaudojant FRAP metodą. Lyginant sultis, išspausťas iš neapdorotų ir apdorotų IEL ($1-10 \text{ kJ kg}^{-1}$) uogų, buvo pastebėta, kad sultys, gautos po apdoravimo IEL, pasižymėjo statistiškai patikimai ($p \leq 0.05$) didesniu antioksidaciniu aktyvumu, neatsižvelgiant į analizės metodą. Kai buvo taikomas DPPH metodas, antioksidacinis aktyvumas buvo didesnis, palyginti su kontrole nuo 17,2 % iki 40,5 %, o taikant FRAP metodą – nuo 15,2 % iki 36,1 %. Kai buvo lyginami sulčių antioksidaciniai aktyvumai tarp skirtingų apdoravimų IEL, pasitelkus tik DPPH analizės metodą, statistiškai patikimi skirtumai buvo gauti po visų naudotų apdoravimų IEL ($1-10 \text{ kJ kg}^{-1}$). Tačiau tada, kai apdoravimų IEL įtaka sulčių antioksidaciniam aktyvumui buvo vertinama FRAP metodu, statistiškai patikimi skirtumai buvo gauti tik lyginant sultis, gautas po 1 ir 10 kJ kg^{-1} apdoravimų.

Išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo nuo 6 iki 10 kartų didesnis, palyginti su išmatuojamu sulčių mėginuose. Palyginti su kontroliniais mėginiais, DPPH metodu išmatuotas išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas po apdoravimų IEL buvo didesnis nuo 76,3 % iki 108,6 %, o išmatuotas FRAP metodu – didesnis nuo 40,4 % iki 70,7 %. Abiem metodais išmatuoti išspaudų ekstraktų antioksidaciniai aktyvumai statistiškai patikimai ($p \leq 0,05$) skyrėsi nuo išmatuotų kontroliniuose mėginuose. Kai buvo lyginama skirtingų IEL poveikių įtaka antioksidacinio aktyvumo didumui, nustatyta, kad po DPPH analizės statistiškai patikimi ($p \leq 0,05$) skirtumai buvo tarp tokių pačių poveikių ($1-10 \text{ kJ kg}^{-1}$), kaip ir sulčių tyrimo atveju, o pritaikius FRAP metodą, ekstraktų antioksidacinis aktyvumas taip pat statistiškai patikimai ($p \leq 0,05$) skyrėsi po visų apdoravimų IEL (1 kJ kg^{-1} ; 5 kJ kg^{-1} ; 10 kJ kg^{-1}).

Tai, kad po augalinės žaliavos apdoravimo IEL gali padidėti sulčių ir nepanaudotų antrinių produktų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas, buvo teigiama ir kitų autorių tyrimų išvadose (Corrales ir kt., 2008; Donsi ir kt., 2010b; Grimi ir kt., 2011; Bobinaitė ir kt., 2015a).

Tikėtina, kad tyrimo metu matuotas mėlynių sulčių ir išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas didžiąja dalimi buvo nulemtas nevienodo fenolinių junginių ekstrakcijos efektyvumo, gauto dėl skirtingų apdoravimų IEL. Kaip nurodoma kitų autorių atliktų tyrimų rezultatuose (Wang ir kt., 2014), taip ir šio tyrimo atveju bendras fenolinių junginių kiekis stipriai koreliavo su išmatuotu antioksidaciniu aktyvumu mėlynių sultyse ($R^2 = 0,970$ – DPPH; $R^2 = 0,899$ – FRAP) ir išspaudų ekstraktuose ($R^2 = 0,925$ – DPPH; $R^2 = 0,988$ – FRAP).

Atkreiptinas dėmesys į tai, kad pastebimai didesnis išspaudų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas greičiausiai buvo susijęs su tuo, kad mėlynių uogų odelėse yra didžiausias antocianinų kiekis, o mezokarpe šių junginių yra mažiau. Tad, tikėtina, sulčių antioksidacinį aktyvumą labiau nulėmė ekstrakcijos proceso metu išsiskybę kiti fenoliniai (chlorogeno ar kumaro rūgštys) ir kiti junginiai, pvz., vitaminai, kurie ESC metodu nebuvo nustatyti. Tokią hipotezę patvirtina tai, kad Laaksonen ir kt. (2010), be 15 skirtingų antocianinų, *V. myrtillus* rūšies uogose papildomai nustatė 22 flavanoidus glikozidus ir 5 flavanoidus aglikonus.

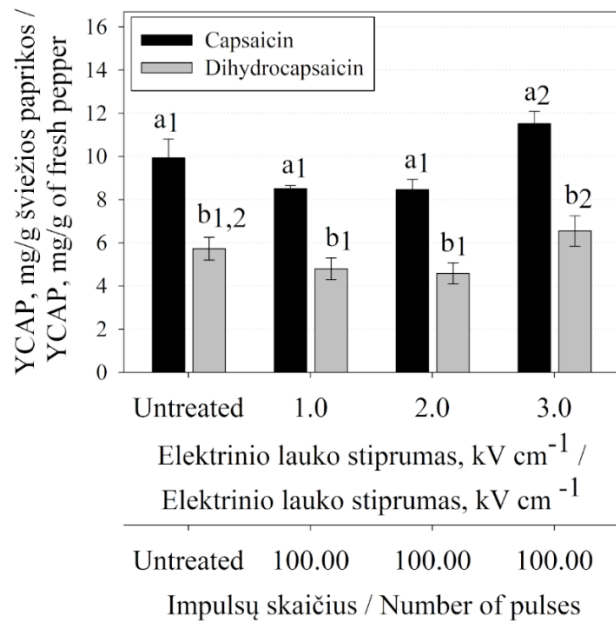
Apibendrinant gautus atliktų tyrimų rezultatų duomenis, galima teigti, kad apdorojimas IEL gali būti naudingas norint pasiekti didesnę mėlynių uogų ląstelių dezintegraciją ir efektyvią antocianinų ekstrakciją ne tik iš šviežių uogų, bet ir iš po sulčių spaudimo liekančių išspaudų. Gautos ESC chromatogramos parodė, kad apdorojimas IEL neturi neigiamos įtakos skirtingų antocianinų ekstrakcijai ir nesukelia šių biologiškai aktyvių junginių degradacijos. Nustatyta ir tai, kad skirtingi (1; 5; 10 kJ kg⁻¹) IEL protokolai turėjo selektyvų poveikį antocianinų ekstrakcijos efektyvumui.

3.2. Kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėiga po apdorojimo impulsiniais elektriniais laukais

3.2.1. Kiekybinis kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos vertinimas

Tyrimo pradžioje, siekiant sumažinti gautų rezultatų dispersiją, buvo atlikti kontroliniai bandymai su skirtingomis impulsų trukmėmis ir jų skaičiumi. Gauti rezultatai parodė, kad didžiausią įtaką kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėigai etanolyje turėjo 100 impulsų apdorojimas, kai 1 impulso trukmė buvo 100 μs. Vėliau buvo siekiama nustatyti IEL stiprumo įtaką kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėigai iš paprikos placentos. Šiam tikslui pasiekti mėginiai buvo paveikti 1, 2 ir 3 kV cm⁻¹ stiprumo bei 100 impulsų apdorojimais (žr. 3.5 pav.).

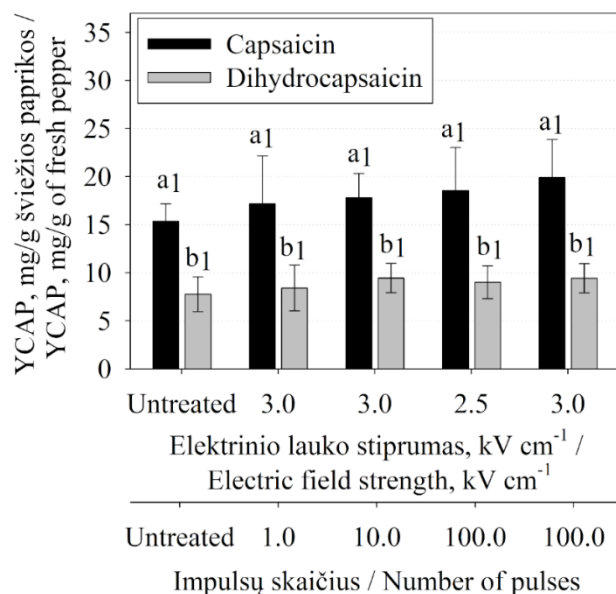
Gauti rezultatai atskleidė, kad tiek kapsaicino, tiek dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėiga po 3 kV cm⁻¹ stiprumo IEL apdorojimų buvo statistiškai patikimai ($p < 0.05$) didesnė, palyginti su kitų mėginių ekstraktais.



3.5 pav. Kaipsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeiga iš paprikos „Habanero“ placentos etanolyje (96 %, v/v) po skirtingų IEL poveikių. Untreated – kapsaicinoidų kiekis kontroliniame ekstrakte. YCAP – kapsaicino ir dihidrokapsaicino santykinis kiekis ekstrakte, mg/g. Vienodos raidės. turinčios skirtingus skaitinius indeksus. žymi statistiškai patikimus ($p < 0,05$) kapsaicino ir dihidrokapsaicino išeigos skirtumus tarp tirtų IEL poveikių

Fig. 3.5. Capsaicin and dihydrocapsaicin extraction (ethanol 96%) yields from placenta of Habanero pepper after different PEF treatments. Untreated – capsaicinoid extraction yield from unaffected samples. YCAP – capsaicin and dihydrocapsaicin yields in mg/g fresh Habanero pepper. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

Nustačius, kad 3 kV cm^{-1} elektrinio lauko stiprumo apdorojimas lemia didžiausią kapsaicinoidų ekstrakcijos išeigą, vėlesnių tyrimų metu buvo siekiama nustatyti optimalų IEL apdorojimo impulsų skaičių bei tuo metu suteiktos specifinės energijos kiekį. Pirmiausia, šviežių aitriųjų paprikų „Habanero“ placentos buvo apdorotos $2,5$ ir 3 kV cm^{-1} elektrinio lauko stiprumo ir 1 , 10 arba 100 impulsais. Iš rezultatų matyti, kad kaip tirpiklis naudotas etanolis (96 %, v/v) turėjo didesnę įtaką kapsaicinoidų išeigai nei skirtingi apdorojimai IEL, tačiau buvo pastebėta nežymi sąsaja tarp impulsų skaičiaus ir kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeigos dydžio (žr. 3.6 pav.).

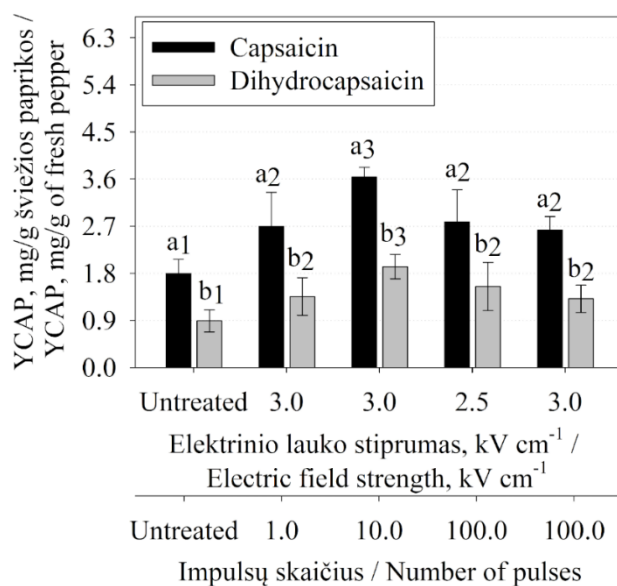


3.6 pav. Kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeiga iš paprikos „Habanero“ placentos etanolyje (96 %, v/v) po skirtingų IEL apdorojimų. Untreated – kapsaicinoidų kiekis kontroliniame ekstrakte. YCAP – kapsaicino ir dihidrokapsaicino santykinis kiekis ekstrakte, mg/g. Vienodos raidės, turinčios skirtingus skaitinius indeksus, žymi statistiškai patikimus ($p < 0,05$) kapsaicino ir dihidrokapsaicino išeigos skirtumus tarp tirtų apdorojimų IEL

Fig. 3.6. Capsaicin and dihydrocapsaicin extraction (ethanol 96 %) yields from placenta of Habanero pepper after different PEF treatments. Untreated – capsaicinoid extraction yield from unaffected samples. YCAP – capsaicin and dihydrocapsaicin yields in mg/g fresh Habanero pepper. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

Nustatyta, kad 3 kV cm⁻¹ stiprumo IEL ir 100 impulsų (impulso trukmė 100 μs) apdorotų mėginių etanoliniai ekstraktai pasižymėjo didžiausia kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeiga, kuri buvo atitinkamai 29 % ir 21 % didesnė nei kontroliniuose ekstraktuose, tačiau statistiškai patikimi ($p < 0,05$) skirtumai tarp kontrolės ir skirtingais IEL apdorotų mėginių ekstraktų išeigos nebuvo nustatyti.

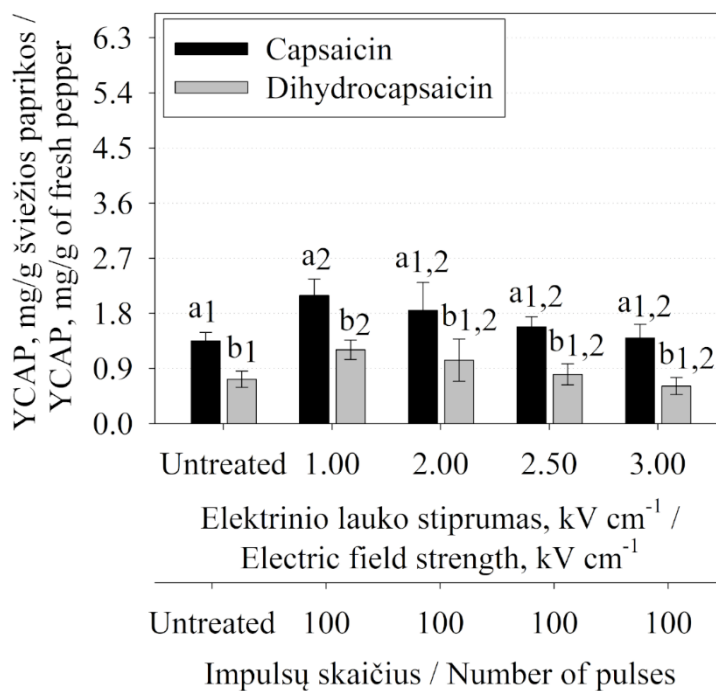
Didesnis impulsų skaičius (1–100) ir didesnis suteiktos SEK (0,01–12,8 kJ kg⁻¹) turėjo įtakos kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos efektyvumui, todėl buvo nuspręsta pakartoti tyrimą ir kaip tirpiklį panaudoti distiliuotą vandenį (pH 5,8) (žr. 3.7 pav.).



3.7 pav. Kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeiga iš paprikos „Habanero“ placentos distiliuotame vandenyje po skirtingų IEL poveikių. Untreated – kapsaicinoidų kiekis kontroliniame ekstrakte. YCAP – kapsaicinoidų santykinis kiekis ekstrakte, mg/g. Vienodos raidės, turinčios skirtingus skaitinius indeksus, žymi statistiškai patikimus ($p < 0,05$) kapsaicino ir dihidrokapsaicino išeigos skirtumus tarp tirtų IEL poveikių

Fig. 3.7. Capsaicin and dihydrocapsaicin extraction (distilled water) yields from placenta of „Habanero“ pepper after different PEF treatments. Untreated – capsaicinoid extraction yield from unaffected samples. YCAP – capsaicin and dihydrocapsaicin yields in mg/g fresh „Habanero“ pepper. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

Rezultatai parodė, kad 3 kVcm⁻¹ stiprumo IEL ir 10 impulsų (100 μs trukmės) apdorotų mėginių vandeniniai ekstraktai pasižymėjo didžiausia kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeiga, kuri buvo atitinkamai 200 % ir 211 % (2 kartai) ir statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo kitų mėginių kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeigos. Tačiau iš šių rezultatų negalima nustatyti IEL stiprumo įtakos kapsaicinoidų ekstrakcijai. Todėl papildomų tyrimų metu mėginiai buvo paveikti 100 impulsų ir skirtingo stiprumo apdorojimais (žr. 3.8 pav.).



3.8 pav. Kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išeiga iš „Habanero“ paprikos placentos distiliuotame vandenyje po skirtingų IEL poveikių. Untreated – kapsaicinoidų kiekis kontroliniame ekstrakte. YCAP – kapsaicinoidų santykinis kiekis ekstrakte, mg/g. Vienodos raidės, turinčios skirtingus skaitinius indeksus, žymi statistiškai patikimus ($p < 0,05$) kapsaicino ir dihidrokapsaicino išeigos skirtumus tarp tirtų IEL poveikių

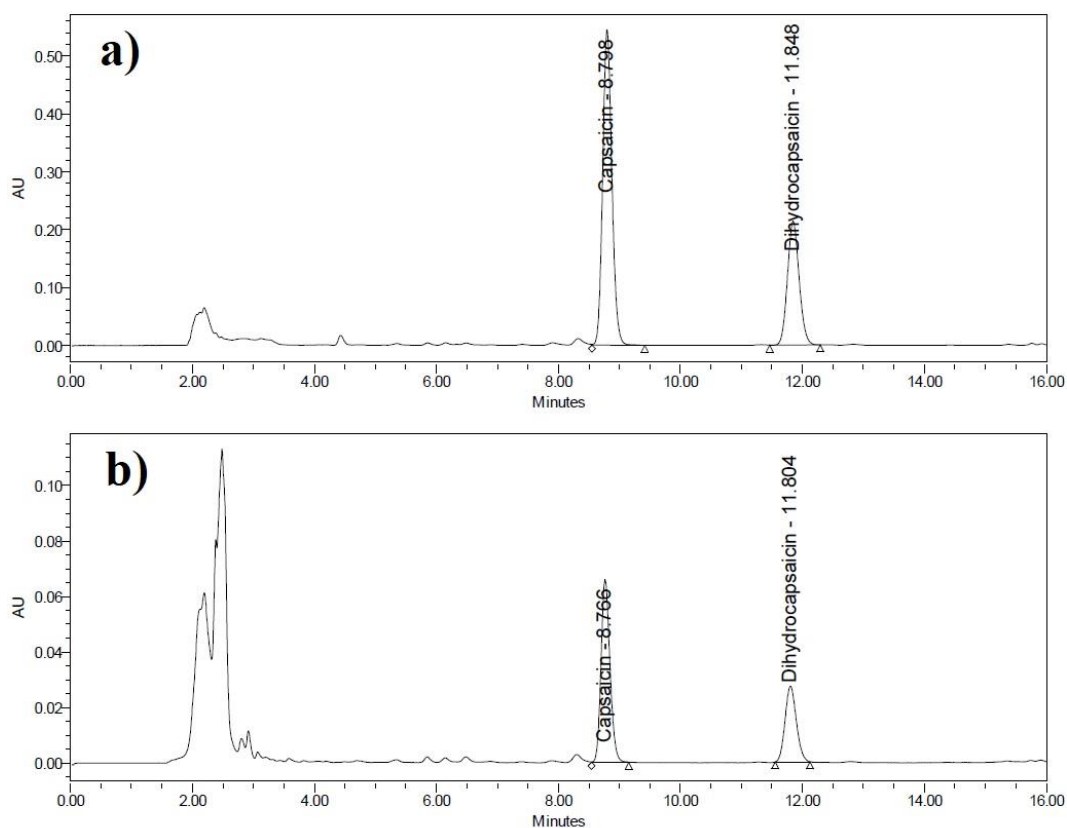
Fig. 3.8. Capsaicin and dihydrocapsaicin extraction (distilled water) yields from placenta of Habanero pepper after different PEF treatments. Untreated – capsaicinoid extraction yield from unaffected samples. YCAP – capsaicin and dihydrocapsaicin yields in mg/g fresh Habanero pepper. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

ESC rezultatai parodė, kad didžiausia kapsaicinoidų ekstrakcijos išeiga buvo gauta po 100 impulsų ($t_p = 100 \mu s$) ir 1 kVcm^{-1} apdorojimo, o mažiausia po 3 kVcm^{-1} apdorojimo (žr. 3.8 pav.). Atsižvelgius į tai, kad efektyviausia kapsaicinoidų ekstrakcija buvo pasiekta po 10 impulsų ir 3 kVcm^{-1} bei 100 impulsų ir 1 kVcm^{-1} apdorojimų, galima daryti išvadą, kad šių junginių ekstrakcijos efektyvumas labiausiai priklauso nuo suteiktos specifinės energijos kiekio arba IEL impulsų skaičiaus.

3.2.2. Kokybinis kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos vertinimas

Palyginus etanolinio ir vandeninio ekstraktų chromatogramas, nustatyta, kad kapsaicino ir dihidrokapsaicino sulaikymo laikai buvo tapatūs (žr. 3.9 pav.). Įvertinus tai, galima teigti, kad retais atvejais kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijai naudojamas vanduo (Barbero ir kt., 2006b) neturėjo neigiamos įtakos ESC metodo specifiškumui ir analičių atskyrimui ekstrakte.

Todėl galima daryti išvadą, kad kiekybinio vertinimo metu gauti rezultatai yra patikimi ir nepriklauso nuo ESC metodo specifiškumo.



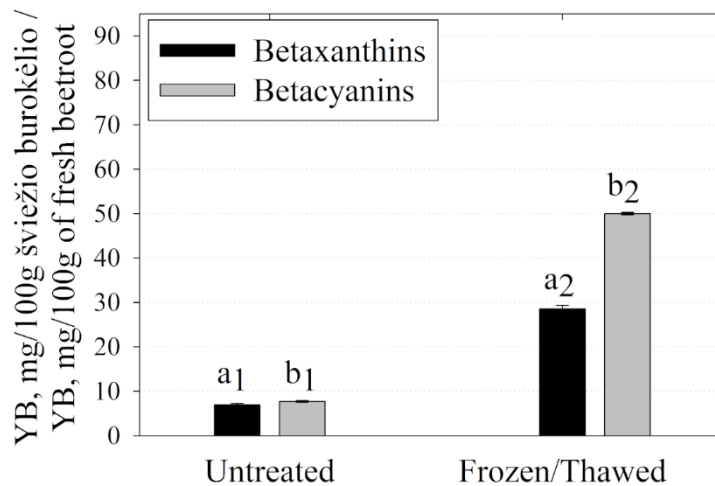
3.9 pav. Etanolinio ir a) vandeninio b) ekstraktų chromatogramos po paprikos „Habanero“ placentos apdorojimo 100 impulsų apdorojimo (impulso trukmė 100 μ s; elektrinio lauko stiprumas 3 kV cm^{-1})

Fig. 3.9. HPLC profiles of capsaicinoids after IEL treatments of 100 pulses ($t_p = 100 \mu s$; 3 kV cm^{-1}) and ethanolic a) and aqueous b) extraction

3.3. Betalainų ekstrakcijos išeiga po apdorojimo impulsiniais elektriniais laukais

3.3.1. Impulsinio elektrinio lauko įtaka betalainų ekstrakcijos efektyvumui

Siekiant nustatyti realų betalainų kiekį tyrimui naudojamuose mėginiuose, tarkuotų burokėlių masė buvo šaldoma šaldiklyje ($-24 \text{ }^\circ\text{C}$), atitirpinama kambario temperatūroje ($+22 \text{ }^\circ\text{C}$) ir smulkiai sutrinama pulverizatoriumi. Gauti rezultatai pateikti paveikslėlyje (žr. 3.10 pav.).



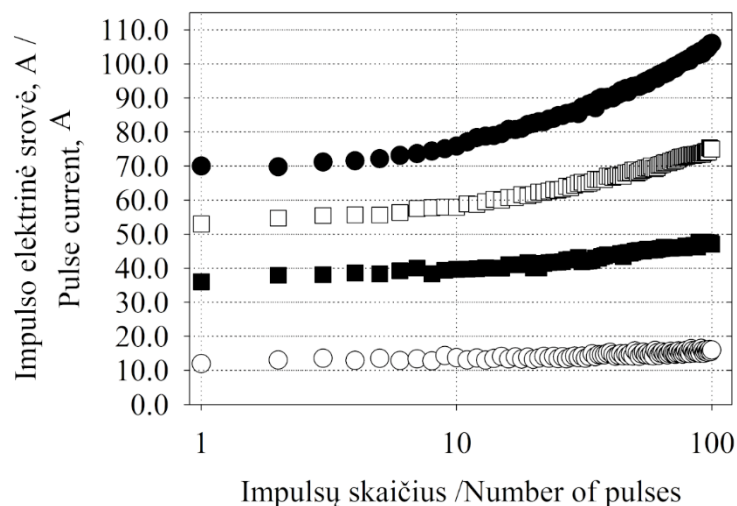
3.10 pav. *Betalainų ekstrakcijos (1 val. distiliuotame vandenyje) išeiga iš šviežių ir tarkuotų (Untreated) bei iš tarkuotų, užšaldytų, atitirpintų ir sutrintų burokėlių (Frozen/Thawed). Vienodos raidės, neturinčios sutampančių skaitinių indeksų, žymi statistiškai patikimus ($p < 0,05$) skirtumus tarp tirtų grupių. Grupės, turinčios bent po vieną sutampančią indeksą, statistiškai patikimai ($p < 0,05$) nesiskiria*

Fig. 3.10. *Betalain extraction yield (YB) from fresh grated beetroot. Untreated bars show the betaxanthin and betacyanin extraction yield from the freshly grated beetroot after 1 h of aqueous extraction. Frozen/Thawed bars show the betaxanthin and betacyanin extraction yield the grated beetroot after freeze/thaw and subsequently pulverization after 1 h of aqueous extraction*

Buvo nustatyta, kad eksperimentams naudoti burokėliai turėjo 28,5 mg/100 g betaksantinių ir 49,9 mg/100 g betacianinų. Šie betalainų kiekiai vėlesnių tyrimų metu buvo prilyginami 100 % ekstrakcijai ir vertinami su gautaisiais po skirtingų IEL apdorojimų. Išsiaiškinta, kad kontroliniai mėginiai, kurie nebuvo apdorojami betalainų ekstrakcijos išeiga, neviršijo 10 mg/100 g šviežio burokėlio.

3.3.2. Elektrinių impulsų skaičiaus ir impulsinės srovės priklausomybė

Norint geriau suprasti apdorojimo IEL parametru įtaką elektroporacijos proceso efektyvumui ir tyrimų metu gautus rezultatus palyginti su kitų autorių išvadomis, būtina apdorojimo IEL metu atlikti elektrinės srovės matavimus (Raso ir kt., 2016). Prieš tai atliktų betalainų ekstrakcijos iš šviežių burokėlių (*Beta vulgaris L.*) tyrimų (Chalermchat ir kt., 2004; Fincan ir kt., 2004; Lopez ir kt., 2009; Loginova ir kt., 2011; Luengo ir kt., 2016) rezultatuose, kurių metu buvo naudojamas apdorojimas IEL, šie svarbūs matavimai aptarti nebuvo. Todėl, šio tyrimo metu, siekiant geriau suprasti burokėlio (*Beta vulgaris L.*) audinio elektrinį atsaką į skirtingos trukmės impulsinį poveikį, kiekvieno impulso metu buvo matuojama elektrinė srovė. Impulsinės elektrinės srovės reikšmės, gautos mėginius apdorojus 0,5 (500 V); 1 (1000 V); 1,5 (1500 V); 2 (2000 V) kV cm⁻¹ elektrinio lauko stiprumais, yra pateiktos grafiškai (žr. 3.11 pav.).



3.11 pav. Impulsinės srovės priklausomybė nuo impulsų skaičiaus. Skirtingi simboliai vaizduoja skirtingą impulso įtampos amplitudę: ○ – 500 V, ■ – 1000 V, □ – 1500 V, ● – 2000 V

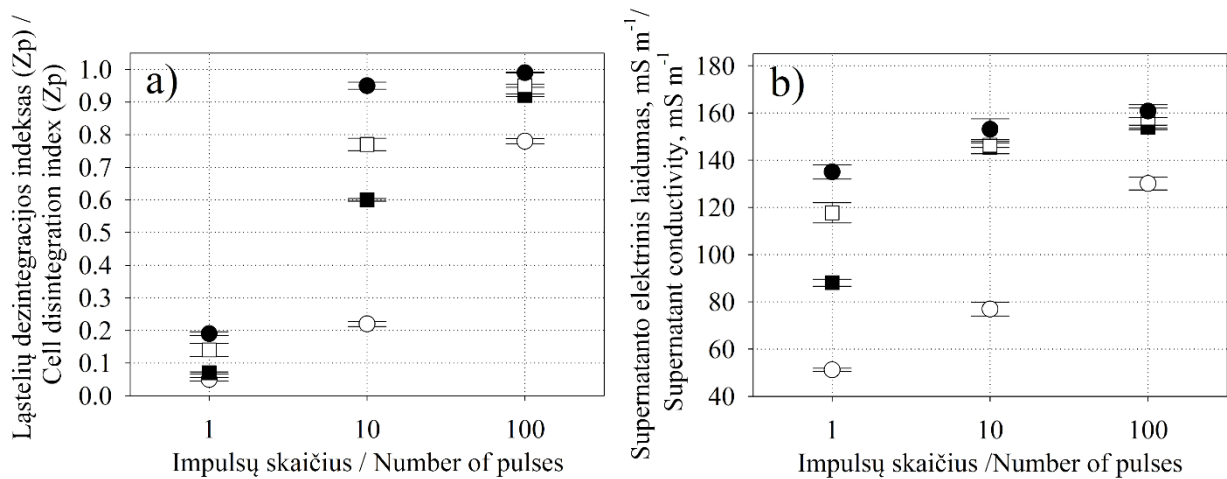
Fig. 3.11. The dependence of the electric current during pulsing on the number of applied pulses.

○ represents pulses of 500 V, ■ – 1000 V, □ – 1500 V, ● – 2000 V

Matavimų metu gauti rezultatai parodė, kad elektrinės srovės dydis, apdorojant IEL, tiesiogiai priklauso nuo impulso įtampos ir į terpę paduotų impulsų skaičiaus. Grafiniai rezultatai atskleidžia, kad 100 impulsų apdorojimo metu elektrinė srovė per tarkuoto burokėlio (*Beta vulgaris* L.) žaliavą didėjo netiesiškai. Kita vertus, nebuvo pastebėtas palyginti reikšmingas elektrinės srovės dydžio pokytis, kai impulsų įtampa buvo 500 V ($0,5 \text{ kV cm}^{-1}$). Kadangi elektrinės srovės dydis tiesiogiai priklauso nuo elektrinio medžiagos laidumo, galima teigti, kad $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ elektrinio lauko stiprumas buvo nepakankamas norint pasiekti negrįžtamą ląstelių elektroporaciją.

3.3.3. Ląstelių dezintegracijos indekso ir ekstrakto savitojo elektrinio laidumo palyginamasis vertinimas

Biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijos išėiga, ekstrakcijos laikas, tirpiklio ir energijos sąnaudos priklauso nuo augalinės žaliavos ląstelių membranų dezintegracijos lygio. Tad, norint tinkamai interpretuoti tam tikro apdorojimo įtaką ekstrakcijos efektyvumui, yra būtina tiksliai įvertinti šio apdorojimo sukeltą ląstelių membranų dezintegracijos lygį. Siekiant užtikrinti gautų išvadų patikimumą, šio tyrimo metu ląstelių dezintegracijos vertinimas buvo atliktas taikant skirtingus metodus. Pirmiausia buvo atliekami mėginių impedanso matavimai ir ląstelių dezintegracijos indekso (Z_p) skaičiavimai, vėliau buvo atlikti gautų vandeninių ekstraktų savitojo elektrinio laidumo matavimai (žr. 3.12 pav.).



3.12 pav. Ląstelių dezintegracijos indekso ir a) savitojo elektrinio laidumo matavimų b) rezultatai po 1, 10 ir 100 impulsų poveikių yra pateikti. Skirtingi IEL stiprumai vaizduojami simboliais:

0,5 kV cm⁻¹ (○), 1 kV cm⁻¹ (■), 1,5 kV cm⁻¹ (□), 2 kV cm⁻¹ (●)

Fig. 3.12. The dependence of cell disintegration index (Z_p) (a) and the conductivity of supernatant (b) on the total specific energy input. Different symbols represent electric field strength: 0.5 kV cm⁻¹ (○),

1 kV cm⁻¹ (■), 1.5 kV cm⁻¹ (□), 2 kV cm⁻¹ (●)

Rezultatai atskleidė, kad, mėginį paveikus 1 elektriniu impulsu, ląstelių dezintegracijos indekso skaitinė vertė reikšmingai nepadidėjo, neatsižvelgiant į sukurtą elektrinio lauko stiprumą. Tačiau kiek netikėta yra tai, kad reikšmingi Z_p skirtumai tarp skirtingų elektrinio lauko stiprumų (1 impulso atveju) nebuvo gauti, nepaisant to, kad suteiktos SEK 2 kVcm⁻¹ (0,76 kJ kg⁻¹) buvo net 19 kartų didesnis nei mėginį apdorojant 0,5 kVcm⁻¹ (0,04 kJ kg⁻¹). Tačiau mėginį paveikus 10 impulsų, palyginti dideli suteiktos energijos skirtumai (žr. 3.3 lent.) tarp skirtingų IEL nulėmė akivaizdžius burokėlio audinių impedanso (Z_{untr} ir Z_{tr}) skirtumus bei parodė tiesioginį sąryšį su dezintegracijos indeksu. Pavyzdžiui, po 10 impulsų (0.40 kJ kg⁻¹) ir 0,5 kV cm⁻¹ apdorojimo suskaičiuota Z_p reikšmė buvo 0,22, o toks pats kiekis paduotų impulsų (7,86 kJ kg⁻¹), sukuriant 2 kV cm⁻¹ elektrinio lauko stiprumą, galimai visiškai dezintegravo apdorojamo mėginio audinius ($Z_p = 0,95$).

Labai panašūs ląstelių dezintegracijos indekso rezultatai buvo gauti apdorojant IEL bulvių gumbų ir obuolių vaisių audinius (Knorr ir Angersbach, 1998; Toepfl, 2006). Todėl galima teigti, kad didesnis elektrinio lauko stiprumas, esant tam pačiam impulsų skaičiui, nulemia didesnę ląstelių membranų dezintegraciją.

3.2 lentelė. *Specifinės energijos kiekis, suteiktas po 1, 10 ir 100 impulsų apdorojimo IEL*

Table 3.2. *Specific energy inputs and electric field strengths during the PEF treatments of 1, 10, 100 pulses*

Elektrinio lauko stiprumas, kV cm ⁻¹ / Electric field strength, kV cm ⁻¹	Impulsų skaičius / Number pulses	Suteiktos specifinės energijos kiekis, kJ kg ⁻¹ / Total specific energy input, kJ kg ⁻¹	
		vidurkis/ mean	SD
0,5	1	0,04	0,001
	10	0,40	0,007
	100	4,37	0,115
1,0	1	0,21	0,007
	10	2,19	0,045
	100	24,05	0,379
1,5	1	0,43	0,013
	10	4,62	0,045
	100	54,25	0,537
2,0	1	0,76	0,008
	10	7,86	0,040
	100	97,86	1,662

Pastaba: Rezultatai pateikti su nurodytais standartiniais nuokrypiais (SD)

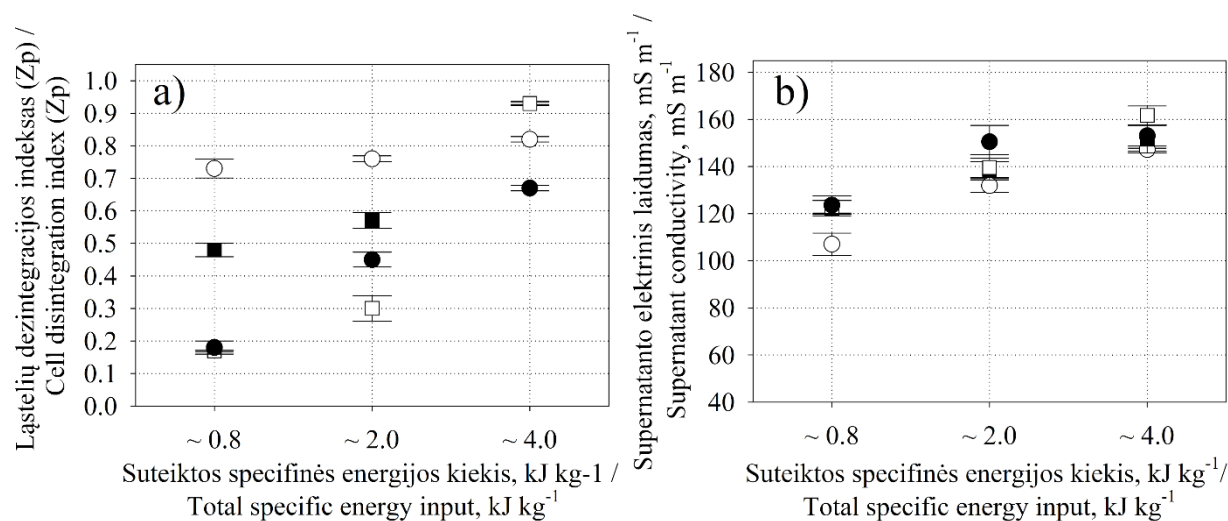
Note. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD)

Kai mėginiai buvo paveikti 100 pulsų, gautos Z_p reikšmės buvo dar didesnės nei po 10 impulsų ir beveik nesiskyrė prie 1; 1,5; 2 kV cm⁻¹ elektrinio lauko stiprumų. Tačiau po apdorojimo IEL, kurio metu 100 impulsų buvo paduota prie 0,5 kV cm⁻¹ elektrinio lauko stiprumo, nulėmė pastebimai mažesnę Z_p (0,78). Gauti Z_p rezultatai leidžia manyti, kad 100 impulsų metu suteiktas specifinės energijos kiekio ir elektrinio lauko stiprumo santykis sukėlė tiek grįžtamą, tiek negrįžtamą elektroporaciją, todėl tam tikras kiekis IEL apdorotų ląstelių liko nepažeistos. Nepaisant to, šios silpniausio apdorojimo sąlygos leido pasiekti labai panašų Z_p (0,78), palyginti su 10 impulsų ir 1,5 kV cm⁻¹.

Mokslininkų teigimu, apdorojant IEL, ant apdorojimo kameros elektrodų vyksta elektrocheminės reakcijos ir tam tikras kiekis metalų jonų yra atiduodama į apdorojimo terpę (Pataro ir kt., 2014). Išsiskyrusių jonų kiekis, pagal šių elektringųjų dalelių rūšį (Kandušer ir kt., 2008), gali pats savaime nulemti ląstelių membranų dezintegraciją arba dėl išaugusio terpės savitojo elektrinio laidumo padidinti tarp elektrodų pratekančios srovės dydį (Kramar ir kt., 2009). Elektrinis terpės laidumas gali pasikeisti dėl elektrinės srovės tekėjimo metu išaugusios temperatūros (Gerlach ir kt., 2008; Krauss ir kt., 2011). Tyrimų metu buvo įrodyta, kad elektroporacijos efektyvumą galima valdyti keičiant apdorojimo terpės savitąjį elektrinį laidumą (Ivorra ir kt., 2010). Todėl norint dar tiksliau įvertinti tirtų mėginių ląstelių membranų

dezintegracijos pokyčius, papildomai buvo atliekami gautų vandenių ekstraktų savitojo elektrinio laidumo matavimai (žr. 3.12b pav.).

Pamatavus ekstraktų, kurie buvo gauti mėginį paveikus vienu impulsu, elektrinius laidumus, nustatyta, kad elektrinio lauko stiprumas turėjo reikšmingą įtaką gautam rezultatui. Paveiksle (žr. 3.12b pav.) pateikti duomenys leidžia spręsti, kad didžiausia savitojo elektrinio laidumo reikšmė 135 mS m^{-1} buvo gauta po 2 kV cm^{-1} ($0,76 \text{ kJ kg}^{-1}$) apdorojimo, o mažiausia $51,2 \text{ (mS m}^{-1})$ – po $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ ($0,04 \text{ kJ kg}^{-1}$). Pažymėtina, kad šie rezultatai yra priešingi tiems, kurie buvo gauti atlikus impedanso matavimus ir Z_p skaičiavimus (žr. 3.12a pav.). Atsižvelgus į išmatuotas savitojo elektrinio laidumo reikšmes, galima daryti prielaidą, kad net ir 1 impulso atveju, esant atitinkamam suteiktos specifinės energijos kiekiui ir elektrinio lauko stiprumui, galima sukelti reikšmingą ląstelių dezintegraciją. Išsiaiškinta, kad 10 impulsų atveju po 1; 1,5 ir 2 kV cm^{-1} apdorojimų ekstraktų savitojo elektrinio laidumo dydžiai skyrėsi neženkliai ($145\text{--}153 \text{ mS m}^{-1}$) ir atitiko Z_p reikšmes nuo 0,6 iki 0,95 (žr. 3.12a pav.). Be to, 10 impulsų apdorojimas $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ ($0,40 \text{ kJ kg}^{-1}$) nulėmė mažiausią ekstraktų savitąjį elektrinį laidumą ($76,9 \text{ mS m}^{-1}$) ir atitiko 0,22 Z_p reikšmę. Jeigu po 10 impulsų apdorojimo savitojo elektrinio laidumo matavimo rezultatai (3.12b pav., 1; 1,5 ir 2 kV cm^{-1}) neatitiktum galima laikyti nereikšmingais, tai skirtumai tarp Z_p reikšmių (3.12a pav.) gali paskatinti klaidingas IEL apdorojimo efektyvumo interpretacijas.



3.13 pav. Ląstelių dezintegracijos indekso ir a) savitojo elektrinio laidumo matavimų b) rezultatai po skirtingo suteiktos specifinės energijos kiekio. Skirtingi IEL stiprumai vaizduojami simboliais:

$0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ (○), 1 kV cm^{-1} (■), $1,5 \text{ kV cm}^{-1}$ (□), 2 kV cm^{-1} (●)

Fig. 3.13. The dependence of cell disintegration index (a) and the conductivity of supernatant (b) on the total specific energy input. Different symbols represent electric field strength: $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ (○),

$1,0 \text{ kV cm}^{-1}$ (■), $1,5 \text{ kV cm}^{-1}$ (□), $2,0 \text{ kV cm}^{-1}$ (●)

Pabrėžtina, kad savitojo elektrinio laidumo rezultatai, gauti po 100 impulsų (žr. 3.13b pav.), koreliavo tiesiškai su Z_p reikšmėmis (žr. 3.13a pav.), gautomis po impedanso matavimų. Galbūt

galima išskirti tik tai, kad apdorojimas IEL esant 1,5 kV cm⁻¹ nulėmė didesnę ekstrakto savitąjį elektrinį laidumą nei apdorojimas esant 2 kV cm⁻¹.

Kai mėginiai buvo paveikti 0,8 kJ kg⁻¹ specifinės energijos kiekiu, gauti rezultatai atskleidė, kad Z_p labiausiai priklauso nuo impulsų skaičiaus, bet ne nuo sukurto elektrinio lauko stiprumo (žr. 3.13a pav.). Dėmesys atkreiptinas į tai, kad 0,5 kV cm⁻¹ elektrinio lauko stiprumas nulėmė kur kas didesnę Z_p (0,73), nei pasiektą po mėginių apdorojimo 2 kV cm⁻¹ (0,17). Tačiau ši tendencija sumenkėjo tada, kai mėginiai buvo apdoroti 2 kJ kg⁻¹. Nepaisant to, 50 impulsų apdorojimas, esant 0,5 kV cm⁻¹ IEL stiprumui, nulėmė didesnę dezintegracijos indeksą nei 4 impulsų apdorojimas esant 1,5 kV cm⁻¹ ir 3 impulsų apdorojimas esant 2 kV cm⁻¹. Akcentuotina, kad didesnis impulsų skaičius (4), esant 1,5 kVcm⁻¹ apdorojimui, nulėmė mažesnę dezntegracijos indeksą nei mažesnis impulsų skaičius (3), kai elektrinio lauko stiprumas buvo 2 kV cm⁻¹. Ši bendrosios tendencijos neatitikimą iš dalies galima paaiškinti tuo, kad paruošta tarkuotų burokėlių žaliava vis dar turėjo palyginti reikšmingą heterogeniškumą, kuris galėjo nulemti impedanso matavimo rezultatus (Z_{untr} ir Z_{tr}). Ši prielaida dar labiau tikėtina, patikrinus ją specifinės energijos skaičiavimo duomenimis (žr. 3.3 lent.).

3.3 lentelė. Impulsų skaičiaus ir suteiktos specifinės energijos kiekio protokolai

Table 3.3. Number of applied pulses and electric field strengths during PEF treatments of 0.8, 2, 4 kJ kg⁻¹

Elektrinio lauko stiprumas, kV cm ⁻¹ / Electric field strength, kV cm ⁻¹	Impulsų skaičius / Number of aplied pulses	Suteiktos energijos kiekis, kJ kg ⁻¹ / Total specific energy input, kJ kg ⁻¹	
		vidurkis/ mean	SD
0,5	26	0,86	0,036
	50	2,01	0,090
	100	4,42	0,106
1,0	5	0,81	0,024
	10	2,04	0,041
	25	4,43	0,098
1,5	2	0,83	0,011
	4	1,85	0,036
	10	4,20	0,167
2,0	1	0,83	0,007
	3	2,53	0,045
	5	4,26	0,074

Pastaba: Rezultatai pateikti su nurodytais standartiniais nuokrypiais (SD)

Note. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD)

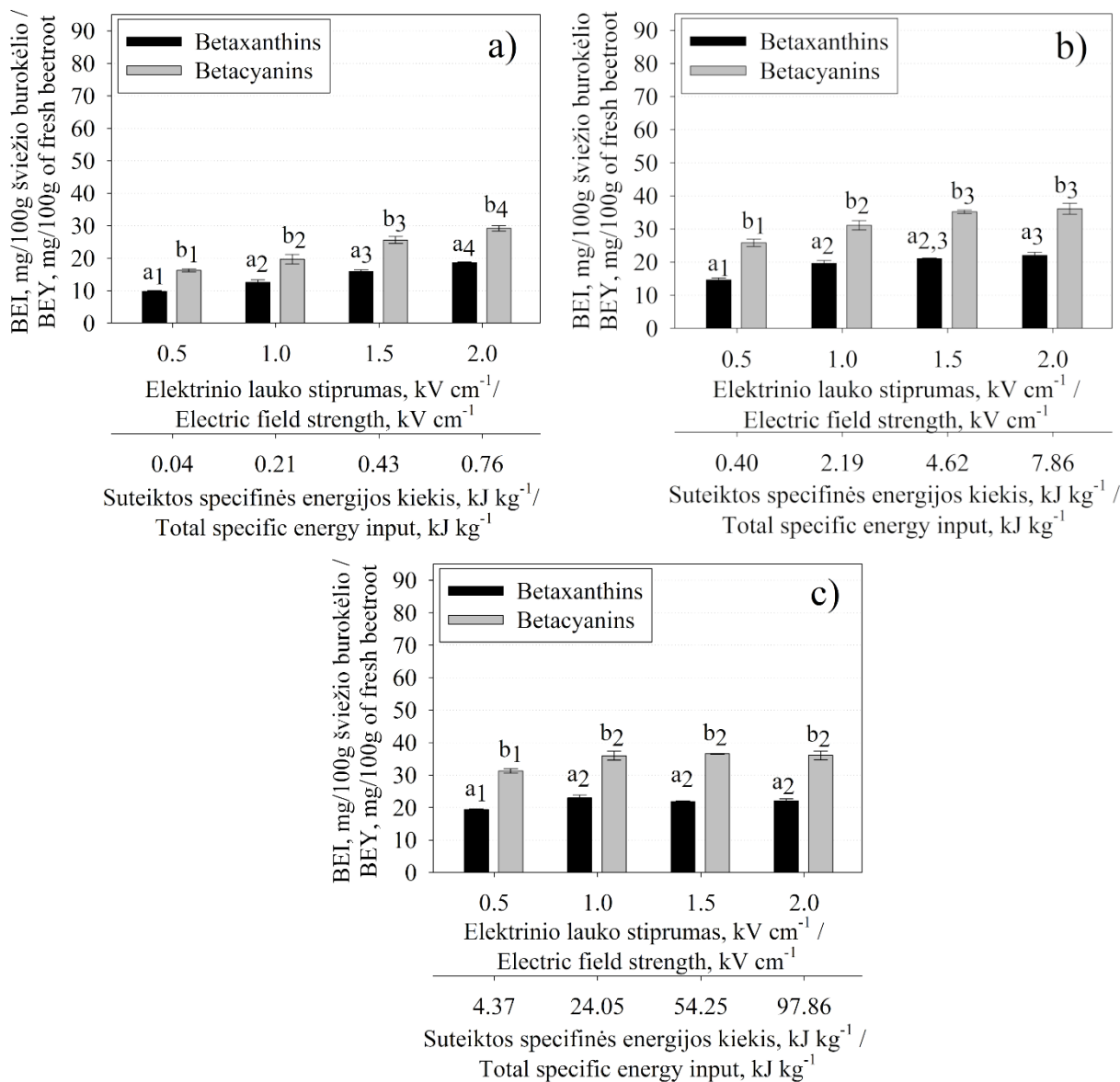
Įvertinus šiuos duomenis, galima spręsti, kad apdorojimo žaliavos paruošimo stadijoje atlikta maišymo procedūra turėtų tęstis ilgiau arba turi būti naudojami specializuoti prietaisai,

kurie padėtų užtikrinti didesnę mėginių homogeniškumą. Po to, kai mėginiai buvo apdoroti 4 kJ kg^{-1} ($1,5 \text{ kV cm}^{-1}$) specifine energija, didžiausia Z_p reikšmė buvo 0,93. Naudojant šio dydžio specifinės energijos kiekį, 25 impulsų apdorojimas prie 1 kV cm^{-1} ir 10 impulsų apdorojimas esant $1,5 \text{ kV cm}^{-1}$ galiausiai nulėmė didesnę dezintegracijos indeksą nei 100 impulsų apdorojimas esant $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ (žr. 3.13b pav.). Taigi, remiantis Z_p rezultatais, galima daryti išvadą, kad 2 kV cm^{-1} stiprumo apdorojimas, nepaisant didesnio nei ankstesnių sąlygų metu paduoto impulsų skaičiaus (5), mažiau dezintegravo mėginio audinių ląstelių membranas nei 100 impulsų apdorojimas esant $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$.

Po skirtingų apdorojimų išmatuotų elektrinių laidumų reikšmės buvo didžiausios tada, kai mėginiams buvo suteiktas 4 kJ kg^{-1} SEK (žr. 3.13b pav.). Atkreiptinas dėmesys į tai, kad, neatsižvelgiant į paduotų impulsų skaičių, savitojo elektrinio laidumo vertės buvo mažiausios tada, kai buvo taikomi $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ stiprumo apdorojimai. Iš savitojo elektrinio laidumo matavimo rezultatų galima spręsti, kad, neatsižvelgiant į suteiktos specifinės energijos kiekį, į mėginį paduotų impulsų skaičius neturėjo įtakos ląstelių dezintegracijos indekso dydžiui. Kuo didesnis IEL stiprumas buvo taikomas, tuo didesnė ląstelių dezintegracija buvo pasiekta (žr. 3.12b pav.).

3.3.4. Elektrinio lauko stiprumo ir suteiktos specifinės energijos kiekio įtaka betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijos efektyvumui

3.14 paveiksle pateikiami betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijos išėigos rezultatai po 1 (a), 10 (b) ir 100 impulsų (c) apdorojimų. Didžiausia betacianinų ekstrakcijos išėiga po 1 impulso buvo pasiekta taikant $0,76 \text{ kJ kg}^{-1}$ ir 2 kV cm^{-1} poveikį, mažiausia – po apdorojimo $0,04 \text{ kJ kg}^{-1}$ ir $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$. Tačiau ekstrakcijos išėigos rezultatai statistiškai patikimai ($p < 0,05$) skyrėsi po visų naudotų IEL poveikių (žr. 3.14a pav.). Betalainų ekstrakcijos rezultatai gauti po 10 impulsų apdorojimo (žr. 3.14b pav.) parodė, kad didesnė ekstrakcijos išėiga tiesiogiai priklausė nuo suteiktos specifinės energijos kiekio ir tarp elektrodų sukurto elektrinio lauko stiprumo, tačiau santykinis betalainų kiekio padidėjimas palyginti su gautu po 1 impulso poveikių buvo mažesnis. Palyginus betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijų išėigos rezultatus po 10 ir 100 impulsų (žr. 3.14c pav.), buvo pastebėta, kad didesnis impulsų skaičius nulėmė didžiausią bendrą ekstrakcijos efektyvumą, tačiau santykinis išėigos padidėjimas mažėjo, elektrinio lauko stiprumui didėjant nuo $0,5$ iki 2 kV cm^{-1} . Šie rezultatai gali būti aiškinami remiantis kitų tyrimų rezultatais, kurie atskleidžia, kad elektrinio lauko stiprumui esant pakankamam indukuoti kritinį transmembraninį potencialą ant ląstelių membranų, elektroporacijos efektyvumas priklauso tik nuo suteiktos specifinės energijos kiekio (Zimmermann ir kt., 1996; Donsi ir kt., 2010b; Jäger, 2013).



3.14 pav. Betalainų ekstrakcijos išeiga (BEI) po: a) 1, b) 10 ir c) 100 impulsų apdorojimo. Vienodos raidės, neturinčios sutampančių skaitinių indeksų, žymi statistiškai patikimus ($p < 0,05$) skirtumus tarp tirtų grupių. Grupės, turinčios bent po vieną sutampančią indeksą, statistiškai patikimai ($p < 0,05$) nesiskiria

Fig. 3.14. Betalain extraction yield (BEY) after the PEF treatment of 1 pulse a), 10 pulses b) and 100 pulses c) in dependence of electric field strength and total specific energy input. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

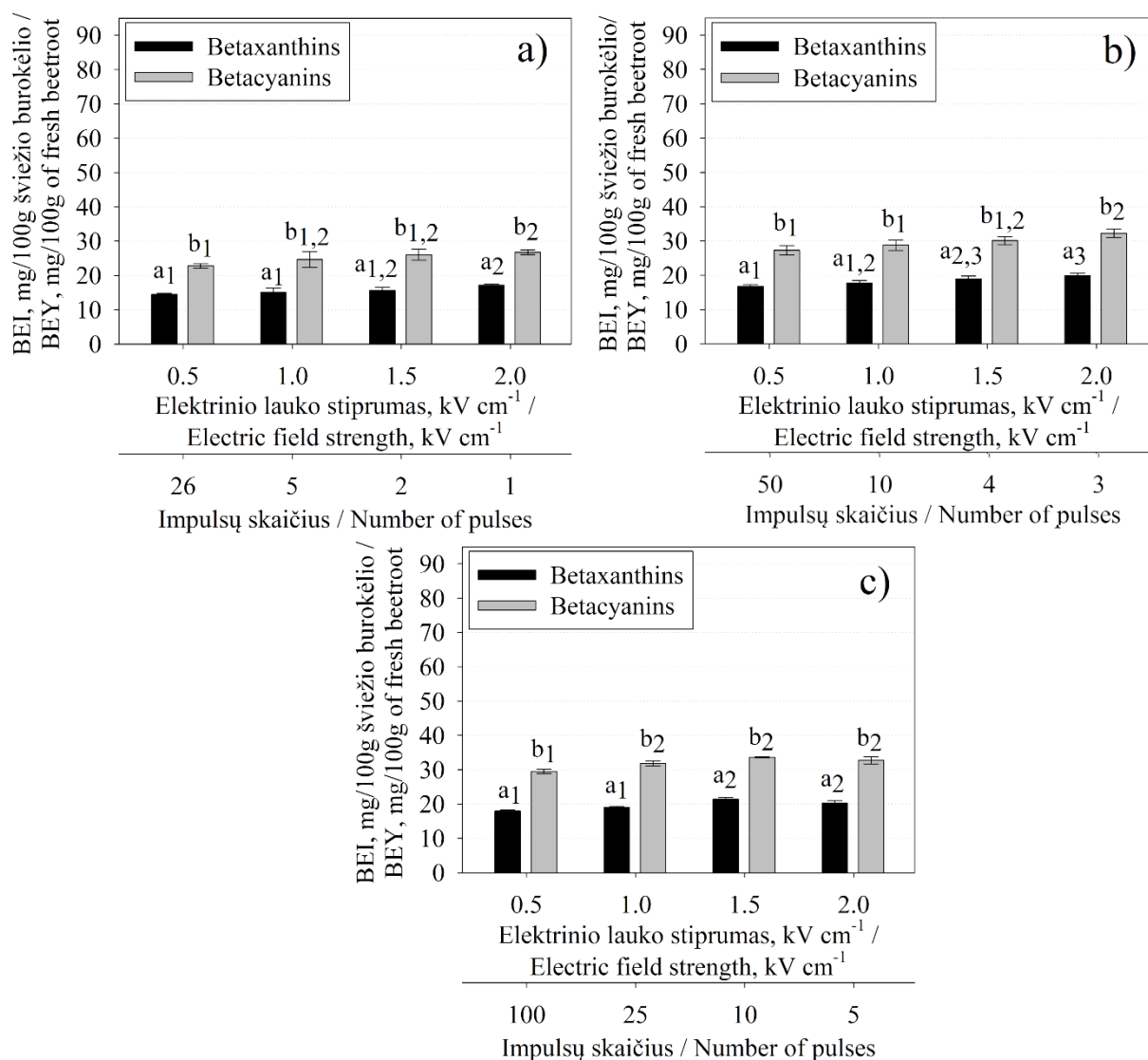
Pabrėžtina, kad betalainų ekstrakcijos rezultatai po 100 impulsų poveikių ir skirtingų IEL stiprumų neparodė statistiškai patikimų ($p < 0,05$) skirtumų tarp tirtų mėginių grupių, nepaisant to, kad poveikių energijos skyrėsi kartais (24.05, 54.25 ir 97.86 kJ kg⁻¹). Tačiau atkreiptinas dėmesys į tai, kad ekstrakcijos išeigos dydis po 100 impulsų apdorojimo prie 1 ir 1,5 kV cm⁻¹ elektrinio lauko stiprumų sutapo su betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijos išeiga po 2 kV cm⁻¹ apdorojimo.

Apibendrinus ekstrakcijos rezultatus po visų šiame tyrime naudotų apdorojimų, teigtina, kad betaksantinų ir betacianinų ekstrakcijų išėigos (atitinkamai 77 % ir 72 %), pasiektos po 10 impulsų, esant $7,86 \text{ kJ kg}^{-1}$ specifinės energijos veikimui (žr. 3.14b pav.), savo dydžiu buvo labai panašios į gautas po mėginių apdorojimo 24,05; 54,25 ir $97,86 \text{ kJ kg}^{-1}$ specifine energija (žr. 3.14c pav.). Šie rezultatai yra panašūs į kitų autorių nurodytuosius. Fincan ir kt. (2004) teigimu, 1 mm storio disko formos burokėlio mėginį apdorojus 1 kV cm^{-1} ir 7 kJ kg^{-1} , po 1 valandą trunkančios ekstrakcijos vandeniniame ($5 \text{ }\mu\text{S/cm}$) tirpale, galima pasiekti net iki 90 % siekiančia betalainų išėigą. Atlikus tyrimus su cikorių audiniais, nustatyta, kad IEL apdorojimai, kurių metu suteiktas SEK viršijo 7 kJ kg^{-1} , nepadidino mechaninės ekstrakcijos efektyvumo vandeniniame tirpale (Loginova ir kt., 2010). Taigi, galima teigti, kad rezultatai, gauti šio tyrimo metu, gali patvirtinti hipotezę, jog 7 kJ kg^{-1} SEK yra pakankamas norint pasiekti optimalią betalainų ekstrakciją vandeniniame tirpale iš šviežių burokėlių.

3.3.5. Elektrinio lauko stiprumo ir impulsų skaičiaus įtaka betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijos efektyvumui

Tikslūs elektrinės srovės matavimas, apdorojant IEL, yra svarbiausias veiksnys, leidžiantis teisingai paskaičiuoti apdorojimo metu suteiktos specifinės energijos kiekį (Raso ir kt. 2016). Tai vėliau leidžia tinkamai įvertinti apdorojimo IEL efektyvumą. Tačiau betalainų ekstrakcijos rezultatai, gauti ankstesnių tyrimų (Chalermchat ir kt., 2004; Fincan ir kt., 2004; Lopez ir kt., 2009; Loginova ir kt., 2011; Luengo ir kt., 2016) metu, dėl skirtingai atliktų elektrinės srovės matavimų, negali būti interpretuojami vienareikšmiai. Iš gautų rezultatų nėra aišku, kuris iš IEL lauko parametras labiau lėmė didesnę betacianinų ir betaksantinų ekstrakcijos išėigą. Todėl šio tyrimo metu buvo siekiama detaliau paaiškinti suteiktos specifinės energijos kiekio ir impulsų skaičiaus įtaką betalainų ekstrakcijos efektyvumui iš šviežių burokėlių. Siekiant šio tikslo, apdorojimai IEL buvo parinkti taip, kad prie skirtingų elektrinio lauko stiprumų ($0,5; 1; 1,5$ ir 2 kV cm^{-1}) suteiktos specifinės energijos kiekiai būtų fiksuoti ($0,8; 2$ ir 4 kJ kg^{-1}) ir reikšmingai nesiskirtų (žr. 3.15 pav. ir 3.4 lent.). Siekiant surasti tinkamą impulsų skaičių, kuris, esant tam tikram elektrinio lauko stiprumui, nulemtų atitinkamą specifinės energijos kiekį, prieš eksperimentus buvo atlikti kontroliniai tyrimai. Toks tyrimo metodo schemos parinkimas leido įvertinti elektrinio lauko stiprumo ir elektrinių impulsų skaičiaus įtaką betalainų ekstrakcijos proceso efektyvumui.

Po $0,8 \text{ kJ kg}^{-1}$ apdorojimo IEL, didžiausia pasiekta betaksantinų ekstrakcijos išėiga, palyginti su kontrolių mėginių ekstrakcijos rezultatais, buvo 60 %, betacianinų – 54 % (žr. 3.15a pav.). Tačiau statistiškai patikimi ($p < 0,05$) skirtumai buvo gauti tik tarp $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$ (26 impulsai) ir 2 kV cm^{-1} (1 impulsas) poveikių.



3.15 pav. Betalainų ekstrakcijos išeiga (BEI) po a) $\sim 0,8 \text{ kJ kg}^{-1}$, b) $\sim 2 \text{ kJ kg}^{-1}$ ir c) $\sim 4 \text{ kJ kg}^{-1}$ suteiktos energijos poveikių. Vienodos raidės, neturinčios sutampančių skaitinių indeksų, žymi statistiškai patikimus ($p < 0,05$) skirtumus tarp tirtų grupių. Grupės, turinčios bent po vieną sutampančią indeksą, statistiškai patikimai ($p < 0,05$) nesiskiria

Fig. 3.15. Betalain extraction yield (BEY) after the PEF treatment of $\sim 0.8 \text{ kJ kg}^{-1}$ a), $\sim 2 \text{ kJ kg}^{-1}$ b) and $\sim 4 \text{ kJ kg}^{-1}$ c). The same letters with different lowercase indexes represent means which are significantly ($p < 0.05$) different. No statistical significance was found in the groups having the same index

Lyginant kontrolinių ir IEL apdorotų mėginių betalainų ekstrakcijos išeigas, pastebėta, kad prie visų $0,8 \text{ kJ kg}^{-1}$ poveikių trukmių ir elektrinio lauko stiprumų betaksantiniai buvo ekstrahuojami lengviau nei betacianinai. Taip pat nustatyta, kad betalainų ekstrakcijos išeigos dydis po šių poveikių beveik atvirkščiai koreliavo su Z_p rezultatais (žr. 3.13a pav. ir 3.15a pav.). Iš grafikų matyti, kad mažiausios Z_p reikšmės (0,17 ir 0,18) buvo pasiektos po 2 impulsų ($1,5 \text{ kV cm}^{-1}$) ir 1 impulso (2 kV cm^{-1}) apdorojimų, o didžiausia Z_p reikšmė – po 26 impulsų ($0,5 \text{ kV cm}^{-1}$).

Atkreiptinas dėmesys, kad ekstraktų savitojo elektrinio laidumo matavimų rezultatai parodė, jog 50 impulsų apdorojimas, priešingai nei po Z_p skaičiavimų, yra pats silpniausias.

Skirtingų trukmių (žr. 3.4 lent.) IEL poveikiai po mėginių apdorojimo 2 kJ kg^{-1} energija nulėmė labai panašią betaksantinų ir betacianų ekstrakcijos išėigą (žr. 3.15b pav.). Tačiau šios ekstrakcijos išėiga po 3 impulsų (2 kV cm^{-1}) buvo statistiškai patikimai ($p < 0.05$) didesnė nei po 50 impulsų ($0,5 \text{ kV cm}^{-1}$) ir 10 impulsų (1 kV cm^{-1}). Kita vertus, 2 kV cm^{-1} stiprumo apdorojimas IEL suteikė ne 2 kJ kg^{-1} , bet $2,53 \text{ kJ kg}^{-1}$ energiją, todėl tikėtina, kad šis energijų skirtumas galėjo nulemti didesnę betalainų ekstrakcijos išėigą. $2,53 \text{ kJ kg}^{-1}$ (2 kV cm^{-1}) energijos kiekis leido pasiekti didžiausią betaksantinų (70 %) ir betacianų (65 %) ekstrakcijos išėigą.

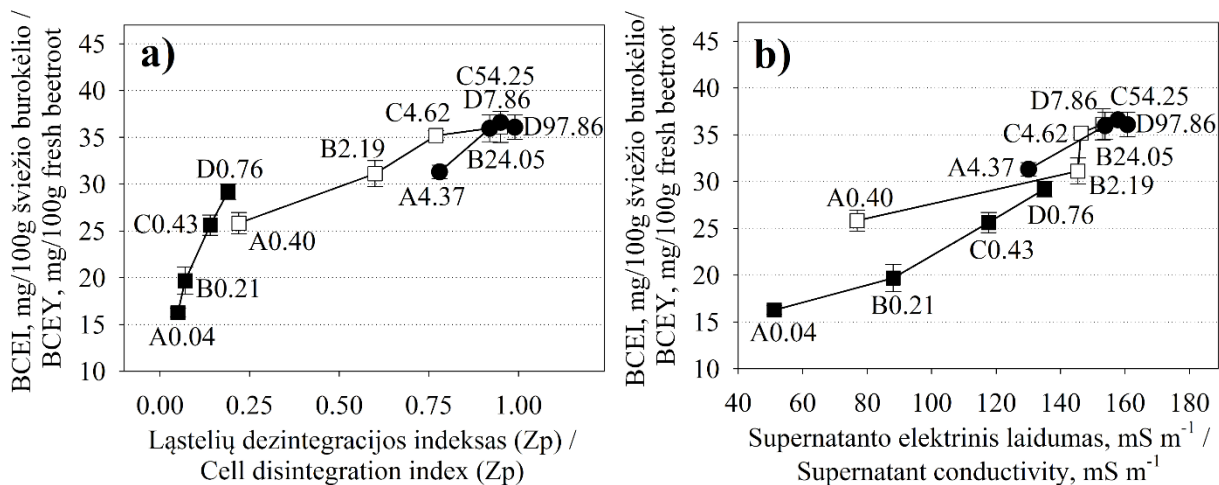
Atsižvelgus į anksčiau gautus Z_p rezultatus, galima teigti, kad betaksantinų ir betacianų ekstrakcijos išėigų dydžiai neturėjo tiesioginio ryšio su apskaičiuotais Z_p , o savitojo elektrinio laidumo vertės koreliavo tiesiogiai su šių betalainų ekstrakcijos rezultatais, gautais po apdorojimų 2 kJ kg^{-1} .

Pritaikius 4 kJ kg^{-1} specifinę energiją, nustatyta, kad didesnis impulsų skaičius neturėjo įtakos didesnei ekstrakcijos išėigai, nes didžiausia betacianinų ekstrakcijos išėiga buvo pasiekta taikant 5 (2 kV cm^{-1}) impulsų poveikį.

Ekstrakcijos rezultatai, gauti po apdorojimų 4 kJ kg^{-1} , palyginti su Z_p reikšmėmis. Teigtina, kad didžiausią betacianinų išėigą nulėmęs 5 impulsų (2 kV cm^{-1}) apdorojimas nepasižymėjo didžiausiu Z_p iš visų tirtų poveikių. O betacianinų išėigos rezultatai po 25 ir 10 impulsų apdorojimų koreliavo su apskaičiuotais Z_p .

Pastebėta, kad šios tyrimų grupės (4 kJ kg^{-1}) atveju gauti betaksantinų ir betacianinų išėigos rezultatai tiesiogiai koreliavo su skirtingų poveikių metu suteiktų impulsų skaičiumi.

Tyrimų metu gauti rezultatai iš dalies sutampa su Lopez ir kt. išvadomis (2009). Šie autoriai nustatė, kad impulsų skaičius neturi reikšmingos įtakos betalainų ekstrakcijos efektyvumui iš šviežių burokėlių, neatsižvelgiant į elektrinio lauko stiprumą. Šią išvadą patvirtina rezultatai, gauti tada, kai apdorojimo IEL metu buvo naudojamas mažas impulsų skaičius (žr. 3.15 pav.). Tačiau tyrimų metu paaiškėjo, kad silpnesnis elektrinio lauko apdorojimas ir didelis impulsų skaičius veikia betacianinų ekstrakcijos išėigą (žr. 3.16 pav.).



3.16 pav. Betacianinų ekstrakcijos išeigos (BCEI), ląstelių dezintegracijos indekso (a) ir supernatanto savitojo elektrinio laidumo (b) sąryšiai po skirtingų IEL poveikių: ■ – 1 impulsas, □ – 10 impulsų ir ● – 100 impulsų. Skirtingi elektrinio lauko stiprumai žymimi raidėmis: A – 0,5 kV cm⁻¹, B – 1 kV cm⁻¹, C – 1,5 kV cm⁻¹ and D – 2,0 kV cm⁻¹. Prie raidžių esantys skaičiai žymi suteiktos specifinės energijos kiekį (kJ kg⁻¹)

Fig. 3.16. The relationship between betacyanin extraction yield (BCEY), cell disintegration index (a) and the conductivity of supernatant (b) in different PEF conditions with constant number of pulses delivered.

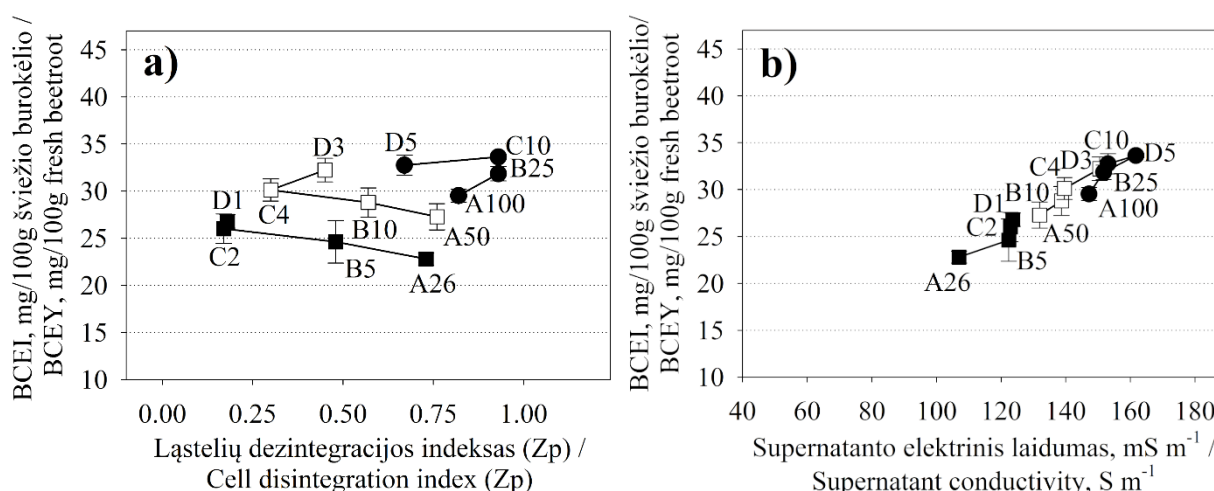
■ signifies 1, □ signifies 10 and ● signifies 100 pulses applied. The letter A represents electric field strength of 0.5 kV cm⁻¹, B – 1.0 kV cm⁻¹, C – 1.5 kV cm⁻¹ and D – 2.0 kV cm⁻¹. The numbers next to the letters represent the total specific energy input in kJ kg⁻¹

Rezultatai, pateikti 3.16 pav., parodo tiesioginį ryšį tarp betacianinų ekstrakcijos efektyvumo, ląstelių dezintegracijos indekso ir supernatanto savitojo elektrinio laidumo. Pabrėžtina, kad didėjant impulsų skaičiui, mažėja betacianinų ekstrakcijos išeigos skirtumai tarp skirtingų apdorojimų IEL.

Lebovka ir kt. (2002) ankstesniais tyrimais atskleidė, kad norint pasiekti didesnę elektroporacijos efektyvumą, esant silpniesiems elektriniams laukams, yra būtina naudoti didesnę impulsų skaičių. Panaši tendencija pastebima ir šio tyrimo metu, pavyzdžiui, IEL poveikiai: A0,40 (10 impulsų; 0,5 kV cm⁻¹) ir C0,43 (1 impulsas; 1,5 kV cm⁻¹) nulėmė panašų betacianinų ekstrakcijos efektyvumą. Ankstesniuose autorių tyrimuose detalai neatskleista priklausomybė tarp impulsų skaičiaus ir suteiktos specifinės energijos kiekio. Tačiau šių tyrimų metu gauti rezultatai parodo, kad betalainų ekstrakcijos efektyvumas gali būti valdomas parenkant mažiausią impulsų skaičių, esant didžiausią efektyvumą suteikiančiam energijos kiekiui ir taip ženkliai sumažinant proceso energijos nuostolius. Pavyzdžiui, apdorojimai IEL: A4,37 (100 impulsų; 0,5 kV cm⁻¹) ir B2,19 (10 impulsų; 1 kV cm⁻¹) pasižymėjo labai panašia betacianinų išeiga, nepaisant to, kad suteiktos SEK skyrėsi apie 2 kJ kg⁻¹.

Ankstesnių tyrimų rezultatuose teigta, kad, norint pasiekti didesnę augalinių audinių dezintegracijos laipsnį, efektyviau naudoti stipresnius elektrinius laukus (Toepfl, 2006; Jäger, 2013). Tačiau šių tyrimų metu gauti rezultatai atskleidė, kad apdorojimai IEL, sukuriantys silpnesnį elektrinį lauką ($<1 \text{ kV cm}^{-1}$), gali būti panašaus efektyvumo, kaip ir apdorojimai IEL, sukuriantys stipresnį elektrinį lauką ($>1 \text{ kV cm}^{-1}$), kai yra pasiekama tam tikra suteiktos specifinės energijos vertė. Pavyzdžiui, 3.16b pav. B24,05 (100 impulsų; 1 kV cm^{-1}) apdorojimas IEL lemia labai panašią betacianų ekstrakcijos išėigą, ląstelių dezintegracijos indeksą ir supernatanto elektrinį laidumą, palyginti su C54,25 (100 impulsų; $1,5 \text{ kV cm}^{-1}$) bei D97,86 (100 impulsų; 2 kV cm^{-1}) apdorojimais IEL. Tokie rezultatai aiškintini tuo, kad ląstelių elektroporacijos efektyvumas labiausiai priklauso nuo suteiktos energijos kiekio tada, kai elektrinio lauko stiprumas yra didesnis nei būtinas indukuoti kritinį TMP ant ląstelių membranų (Zimmermann ir kt., 1996).

Gauti rezultatai taip pat parodo, kad Z_p labiausiai priklauso nuo impulsų skaičiaus, bet ne nuo elektrinio lauko stiprumo ar suteiktos energijos kiekio tol, kol nėra pasiekama visiška audinių dezintegracija (žr. 3.17a pav.).



3.17 pav. Betacianinų ekstrakcijos išėigos (BCEEI), ląstelių dezintegracijos indekso (a) ir supernatanto savitojo elektrinio laidumo (b) sąryšiai po skirtingų apdorojimų IEL: ■ – $0,8 \text{ kJ kg}^{-1}$, □ – $2,0 \text{ kJ kg}^{-1}$ ir ● – $4,0 \text{ kJ kg}^{-1}$. Skirtingi elektrinio lauko stiprumai žymimi raidėmis: A – $0,5 \text{ kV cm}^{-1}$, B – 1 kV cm^{-1} , C – $1,5 \text{ kV cm}^{-1}$ and D – 2 kV cm^{-1} . Prie raidžių esantys skaičiai žymi impulsų skaičių

Fig. 3.17. The relationship between betacyanin extraction yield (BCEEY), cell disintegration index (a) and the conductivity of supernatant (b) at different PEF parameters preserving constant total specific energy of the pulses. ■ signifies specific energy input of 0.8 kJ kg^{-1} , □ – 2.0 kJ kg^{-1} , ● – 4.0 kJ kg^{-1} , the letter A represents pulses of 0.5 kV cm^{-1} , B - of 1.0 kV cm^{-1} , C – of 1.5 kV cm^{-1} , and D – of 2 kV cm^{-1} .

The numbers next to the letters represent the number of applied pulses

Tyrimais nustatyta, kad Z_p dydis labiau priklauso nuo suteiktų impulsų skaičiaus, o ne nuo specifinės energijos kiekio ar elektrinio lauko stiprumo. Šis atradimas nesutampa su Luengo ir kt. (2016) gautais rezultatais. Autoriai padarė išvadą, kad Z_p labiau priklauso nuo suteiktos specifinės energijos kiekio nei nuo elektrinio lauko stiprumo ar impulsų skaičiaus. Toks rezultatų neatitikimas gali būti aiškinamas tuo, kad Luengo ir kt. (2016) tyrimo metu buvo naudojami elektriniai laukai, stipresni nei 1 kV cm^{-1} , todėl šie autoriai galėjo nepastebėti elektrinio lauko stiprumo slenkstinės vertės, nuo kurios elektrinio lauko stiprumo didinimas paveikia mažiau.

Išsiaiškinta, kad po apdorojimų IEL, kurių metu buvo suteiktas vienodas energijos kiekis, gauti dezintegracijos indeksai klaidingai įvertino apdorojimo IEL efektyvumą (žr. 3.17a pav.). Dezintegracijos indeksai nekoreliavo su betacianų ekstrakcijos išeiga po 0,8; 2,0 ir 4,0 kJ kg^{-1} apdorojimų IEL (žr. 3.17a pav.). Supernatantų savitasis elektrinis laidumas atskleidė tiesioginį sąryšį su betacianų ekstrakcijos išeiga (žr. 3.16b ir 3.17b pav.). Tai galima paaiškinti keliais būdais. Labiausiai tikėtina, kad klaidingi Z_p galėjo būti gauti dėl padidėjusio ląstelių osmosinio slėgio ir sumažėjusių tarpląstelinių ertmių, nes mėginių impedansas buvo matuotas praėjus 5 s po apdorojimo IEL (Abidor ir kt., 1994). Ląstelių osmosinio slėgio įtaką Z_p buvo pastebėta matuojant ląstelių granulių Z_p vėliau nei 50 ms po apdorojimo IEL (Castellvi ir kt., 2016). Kita vertus, kai apdorojimai IEL turėjo vienodą impulsų skaičių, Z_p tiesiogiai koreliavo su betacianų ekstrakcijos išeiga (žr. 3.16a pav.). Ši priklausomybė paaiškintina tuo, kad stipresni elektriniai laukai lemia didesnes ląstelių membranų pažaidas (Teissie, 2017).

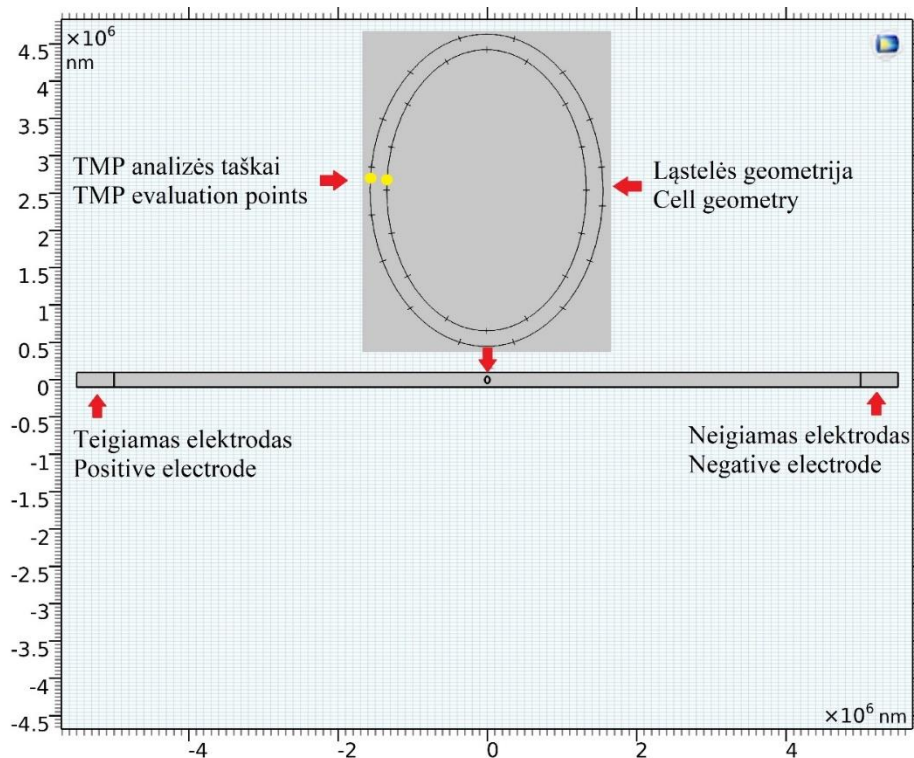
Apibendrinant tyrimų metu gautus rezultatus, galima teigti, kad betacianų ir betaksantinų ekstrakcijos efektyvumas labiausiai priklauso nuo elektrinio lauko stiprumo, suteiktos specifinės energijos kiekio. Tačiau, kai naudojami elektriniai laukai yra silpnesni nei 1 kV cm^{-1} , tada impulsų skaičius taip pat reikšmingai veikia betalainų ekstrakcijos efektyvumą. Nustatyta, kad, norint tiksliau įvertinti apdorojimo IEL metu sukeltą ląstelių dezintegraciją, būtina atlikti supernatanto savitojo elektrinio laidumo matavimus.

Betalainų ekstrakcijos rezultatai parodė, kad 3 impulsų ir 2 kV cm^{-1} apdorojimas IEL, kurio metu buvo suteiktas $2,53 \text{ kJ kg}^{-1}$ SEK, nulėmė apie 70 % betaksantinų ir betacianų ekstrakcijos išeigą bei buvo optimalus ekstrakcijos ir energijos sąnaudų atžvilgiu.

3.4. Matematinis elektroporuotos ląstelės modelis

3.4.1. Elektroporuotos ląstelės matematinio modelio projektavimas

Matematinis baigtinių elementų modelis buvo sudarytas iš 39 dvimačių geometrinių struktūrų (žr. 3.18 pav.).



3.18 pav. Elektroporuotos ląstelės modelio geometrijos vaizdas „Comsol Multiphysics“ programinio paketo aplinkoje

Fig. 3.18. Grafical view of the electroporated cell geometry in “Comsol Multiphysics”

Pirmiausia buvo suprojektuota apdorojimo kamera, kuri buvo sudaryta iš dviejų, vienas kitam lygiagrečių elektrodų, atskirtų ląstelės išorinę terpę imituojančios geometrijos. Tada kameros centre ($x=0$; $y=0$) buvo nubraižyti keturi ovalūs (sferos formos) apskritimai – dvi ląstelės membranos ir dvi vakuolės tonoplasto struktūros plokščiui apibrėžti. Po to išilgai ląstelės membranos struktūros, vienodais atstumais buvo įterpti stačiakampiai kanalėliai (16 vienetų) tam, kad būtų supaprastintai imituotos elektroporacijos metu susidarančios laidžiosios poros. Poros dydžio kinetikos tyrimai rodo, kad iš karto po apdorojimo IEL fosfolipidinės poros dydis gali siekti 10 nm ir daugiau (Sowers ir kt., 1986). Atsižvelgiant į tai, kanalėlio plotis buvo parinktas 15 nm. Analogiški pakeitimai buvo atlikti ir vakuolės tonoplasto geometrinėje struktūroje.

Atlikus literatūros šaltinių analizę, nepavyko rasti aiškaus atsakymo, kaip ląstelės sienelės buvimas nulemia transmembraninio potencialo susidarymą elektroporacijos proceso metu, todėl ši augalinės ląstelės sritis nebuvo įtraukta į matematinio modelio projektavimą. Siekiant optimizuoti matematinius skaičiavimus, prie skirtingų savitojo elektrinio laidumo modeliavimo

sąlygų (žr. 3.6–3.8 lent.) ląstelės geometriniai matmenys tyrimo metu nebuvo keičiami (žr. 3.4 lent.). Matematinio modelio elektriniai parametrai pateikti 3.5 lentelėje.

Siekiant ištirti indukuoto transmembraninio potencialo susidarymą, ant augalinės ląstelės membranų elektroporuotos ląstelės geometriniai matmenys buvo pasirinkti atsižvelgiant į eksperimentinių augalinės ląstelės dydžio matavimų duomenis (Kondorosi ir kt., 2000). Tačiau ląstelės forma nebuvo parinkta augalinei ląstelei labiau būdingos netaisyklingos „kampuotos“ formos, nes tada dėl didesnio stačių briaunų skaičiaus būtų netiksliai suformuojamas baigtinių elementų tinklelis ir neteisingai skaičiuojamos programiniame modulyje integruotos Laplaso lygtys (Teissie, 2017). Dėl tų pačių baigtinių elementų tinklelio apribojimų ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto pločiai buvo parinkti 3 kartus didesni (15 nm) nei nustatyti eksperimentinių matavimų metu (3–5 nm) ir naudojami standartinių transmembraninio potencialo modelių (Pauly ir Schwan, 1959) lygčių sprendiniuose (Kotnik ir kt., 1997). Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad, pasinaudojant „Comsol Multiphysics“ programiniu paketu ir sprendžiant Laplaso lygtis, galima matematiškai apskaičiuoti indukuoto transmembraninio potencialo dydį ant sferoidinės formos ląstelės membranos (Kotnik ir kt., 2009; Pucihar ir kt., 2009a).

3.4 lentelė. *Elektroporuotos ląstelės modelio geometriniai matmenys*

Table 3.4. *Geometrical parameters of the electroporated cell model*

Geometrinė struktūros pavadinimas / Name of geometrical structure	Matmens dydis, μm / Dimensions, μm
Vakuolė Vacuole	60 x 90
Ląstelė Cell	70 x 100
Išorinė terpė External medium	10000 x 200
Teigiamas elektrodas Positive electrode	500 x 200
Neigiamas elektrodas Negative electrode	500 x 200
Ląstelės membranos storis Cell membrane thickness	0,015
Tonoplasto storis Tonoplast thickness	0,015
Laidžiosioji pora Pore size	2 x 0,015

3.5 lentelė. Elektroporuotos ląstelės modelio elektriniai parametrai

Table 3.5. Electrical parameters of the electroporated cell model

Geometrinė struktūros pavadinimas / Name of geometrical structure	Reikšmės / Values
Vakuolės savitasis elektrinis laidumas (σ_v) Vacuole conductivity (σ_v)	3.6–3.8 lentelės Table 3.6–3.8
Tonoplasto savitasis elektrinis laidumas Tonoplast conductivity	$1 \cdot 10^{-8} \text{ S m}^{-1}$
Citozolio savitasis elektrinis laidumas (σ_c) Citozol conductivity (σ_c)	3.6–3.8 lentelės Table 3.6–3.8
Ląstelės membranos savitasis elektrinis laidumas Conductivity of cell membrane	$1 \cdot 10^{-8} \text{ S m}^{-1}$
Išorinės terpės savitasis elektrinis laidumas (σ_t) Conductivity of external medium (σ_t)	3.6–3.8 lentelės Table 3.6–3.8
Elektrodų savitasis elektrinis laidumas Conductivity of electrodes	$1,74 \cdot 10^6 \text{ S m}^{-1}$
Vakuolės dielektrinė konstanta (ϵ_r) Dielectrical constant of vacuole (ϵ_r)	80
Tonoplasto dielektrinė konstanta (ϵ_r) Dielectric constant of tonoplast (ϵ_r)	3,2
Citozolio dielektrinė konstanta (ϵ_r) Dielectric constant of citozol (ϵ_r)	80
Ląstelės membranos dielektrinė konstanta (ϵ_r) Dielectric constant of cell membrane (ϵ_r)	3,2
Išorinės terpės dielektrinė konstanta (ϵ_r) Dielectric constant of cell medium (ϵ_r)	80
Elektrodų dielektrinė konstanta (ϵ_r) Dielectric constant of electrodes (ϵ_r)	1
Elektrinio impulso įtampa Pulse voltage	1000 V

Pastaba. Prieš atliekant matematinį modeliavimą, ląstelės membranų elektrinių parametru dydžiai buvo parinkti taip, kad sutaptų su išorinės terpės elektriniais parametrais, o tonoplasto porų elektriniai parametrai – taip, kad sutaptų su ląstelės citozolio elektrinių parametru dydžiais.

Note. The electrical parameters of cell pores coincide with the parameters of external medium while the electrical parameters of tonoplast pores coincide with the parameters of cell citozol during all simulations.

Atliktų tyrimų rezultatai atskleidė, kad ant ląstelės membranos indukuoto TMP dydis tiesiogiai priklauso nuo ląstelės išorinės terpės savitojo elektrinio laidumo, tačiau iki šio nėra

atlikta tyrimų, apibrėžiančių sąsają tarp išorinės terpės savitojo elektrinio laidumo ir ant vakuolės tonoplasto indukuoto TMP dydžio (Pucihar ir kt., 2001; Pavlin ir Miklavčič, 2003; Schmeer ir kt., 2004; Pavlin ir kt., 2005). Kadangi tuoj pat po apdorojimo IEL per indukuotas laidžiąsias poras vyksta jonų ir mažų bei didelių molekulių difuzija tarp ląstelės išorinės terpės ir ląstelės citozolio aplinkų (Puc ir kt., 2003; Pucihar ir kt., 2008;), tad manytina, kad tai tiesiogiai veikia citozolio savitąjį elektrinį laidumą ir indukuotą TMP dydį ant vakuolės tonoplasto. Todėl tyrimo metu matematinio modeliavimo sąlygas apibrėžiantys savitojo elektrinio laidumo dydžiai (žr. 3.6–3.8 lent.) buvo empiriškai išskaidyti, siekiant imituoti tikėtinas elektrinių laidumų būsenas elektroporacijos proceso metu:

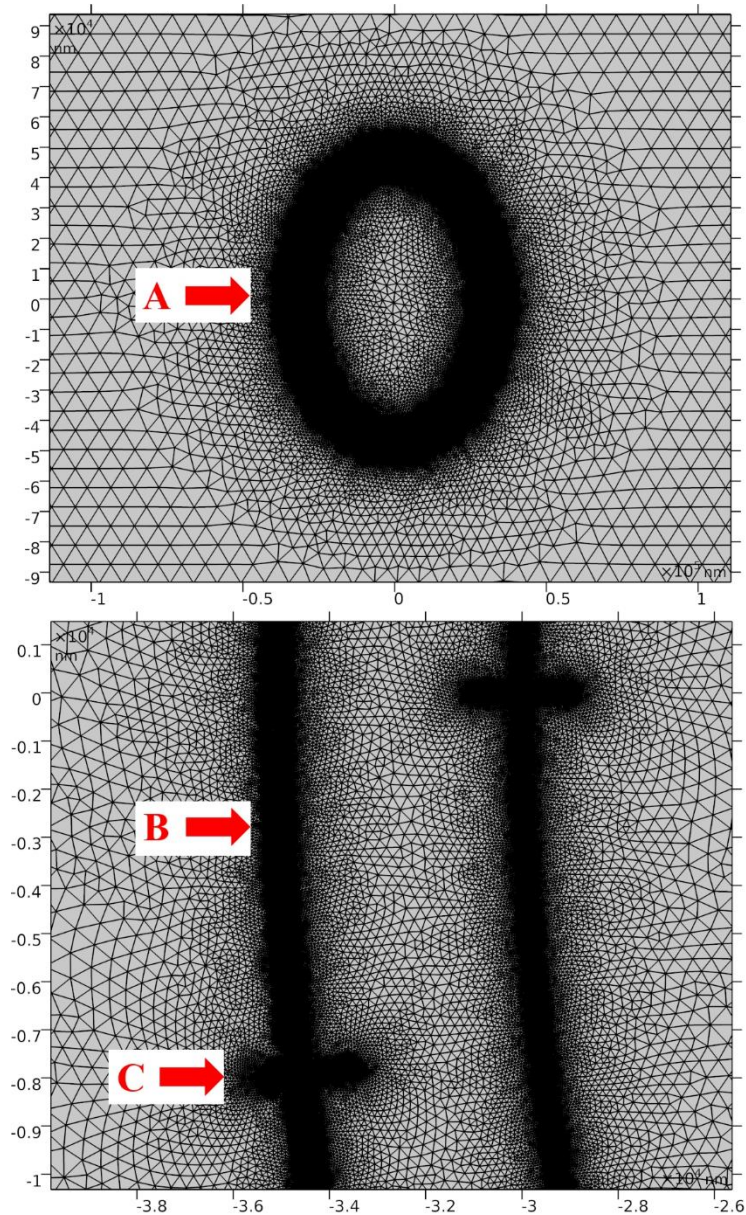
- A. $\sigma_{t1} = \sigma_{c1} = \sigma_{v1}$, (žr. 3.6 – 3.8 lent., Nr. 1, 7, 13)
- B. $\sigma_{t2} = \sigma_{t1} = \sigma_{c2} = \sigma_{c1}$; $\sigma_{v2} = \sigma_{v1}/3$, (žr. 3.6 – 3.8 lent., Nr. 2, 8, 14)
- C. $\sigma_{t3} = \sigma_{t1} = \sigma_{v3} = \sigma_{v1}$; $\sigma_{c3} = \sigma_{c1}/3$, (žr. 3.6 – 3.8 lent., Nr. 3, 9, 15)
- D. $\sigma_{t4} = \sigma_{t1}/3$; $\sigma_{c4} = \sigma_{c1} = \sigma_{v4} = \sigma_{v1}$, (žr. 3.6 – 3.8 lent., Nr. 4, 10, 16)
- E. $\sigma_{t5} = \sigma_{t1}/3$; $\sigma_{c5} = \sigma_{c1}/3$; $\sigma_{v5} = \sigma_{v1}$, (žr. 3.6 – 3.8 lent., Nr. 5, 11, 17)
- F. $\sigma_{t6} = \sigma_{t1}/3$; $\sigma_{c6} = \sigma_{c1}/3$; $\sigma_{v6} = \sigma_{v1}/3$, (žr. 3.6 – 3.8 lent., Nr. 6, 12, 18)

Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, kad pirmasis impulsų sekos impulsas sukelia elektroporacijos procesą didžiausiame ląstelės membranos plote (Son ir kt., 2016). Todėl šame tyrime buvo nuspręsta naudoti 1 impulso poveikį, kurio trukmė 100 μ s.

3.4.2. Baigtinių elementų tinklelio generavimas

Atsižvelgus į tai, kad atskiros geometrinės sritys buvo apibrėžtos kaip medžiagos, savo biofizikinėmis savybėmis artimos vandeniui (išorinė terpė, citozolis ir vakuolė) ir alyvuogių aliejui (ląstelės membrana ir vakuolės tonoplastas), tad baigtinių elementų tinklelis buvo sukalibruotas spręsti skysčių dinamikos uždavinius.

Baigtinių elementų tinklelis buvo sudarytas iš 1 680 476 paviršinių elementų – laisvųjų trikampių, kai didžiausias elemento dydis 7,79 mm, o mažiausias – 222 nm. Tinklelis buvo iš anksto apibrėžtas smulkių elementų režime (žr. 3.19 pav.).



3.19 pav. *Łstelės BEM (A), ¼stelės membranos BEM (B), laidžiosios poros BEM (C)*
Fig. 3.19. *The finite element mesh of cell A), cell membrane B) and the conductive pore C)*

3.4.3. Elektroporuotos ¼stelės modelio savitojo elektrinio laidumo sąlygos

Siekiant padidinti matematinių skaičiavimų metu gautų rezultatų patikimumą, modeliavimo sąlygos buvo parinktos atsižvelgiant į eksperimentiškai išmatuotus raudonųjų burokėlių, mėlynių ir aitriųjų paprikų vaisų sulčių elektrinius laidumus. Matavimų rezultatai atskleidė, kad raudonojo burokėlio (veislė „Kestrel H“), mėlynių (*Vaccinium myrtillus* L.) ir aitriųjų paprikų (veislė „Habanero“) vaisų sulčių savitasis elektrinis laidumas atitinkamai yra 1, 46, 0, 29 ir 0, 76 S m⁻¹. Tada, remiantis modeliavimo sąlygų A–F aprašymais, buvo apskaičiuoti skirtingų ¼stelės sričių

savitojo elektrinio laidumo dydžiai ir priskirti modeliavimo sąlygų numeriai, kurie vėliau bus nurodyti TMP analizės grafikų viršuje (žr. 3.20–3.22 pav.).

3.6 lentelė. Raudonojo burokėlio ląstelės modelio savitojo elektrinio laidumo dydžiai

Table 3.6. The electrical conductivities of beetroot cell compartments

Modeliavimo sąlygos numeris / Number of modeling condition	$\sigma_t, \text{S m}^{-1}$	$\sigma_c, \text{S m}^{-1}$	$\sigma_v, \text{S m}^{-1}$
1	1,46	1,46	1,46
2	1,46	1,46	0,48
3	1,46	0,48	1,46
4	0,48	1,46	1,46
5	0,48	0,48	1,46
6	0,48	0,48	0,48

3.7 lentelė. Mėlynių uogos ląstelės modelio savitojo elektrinio laidumo dydžiai

Table 3.7. The electrical conductivities of blueberry cell compartments

Modeliavimo sąlygos numeris / Number of modeling condition	$\sigma_t, \text{S m}^{-1}$	$\sigma_c, \text{S m}^{-1}$	$\sigma_v, \text{S m}^{-1}$
7	0,28	0,28	0,28
8	0,28	0,28	0,09
9	0,28	0,09	0,28
10	0,09	0,28	0,28
11	0,09	0,09	0,28
12	0,09	0,09	0,09

3.8 lentelė. Aitriosios paprikos ląstelės modelio savitojo elektrinio laidumo dydžiai

Table 3.8. The electrical conductivities of the chili pepper cell compartments

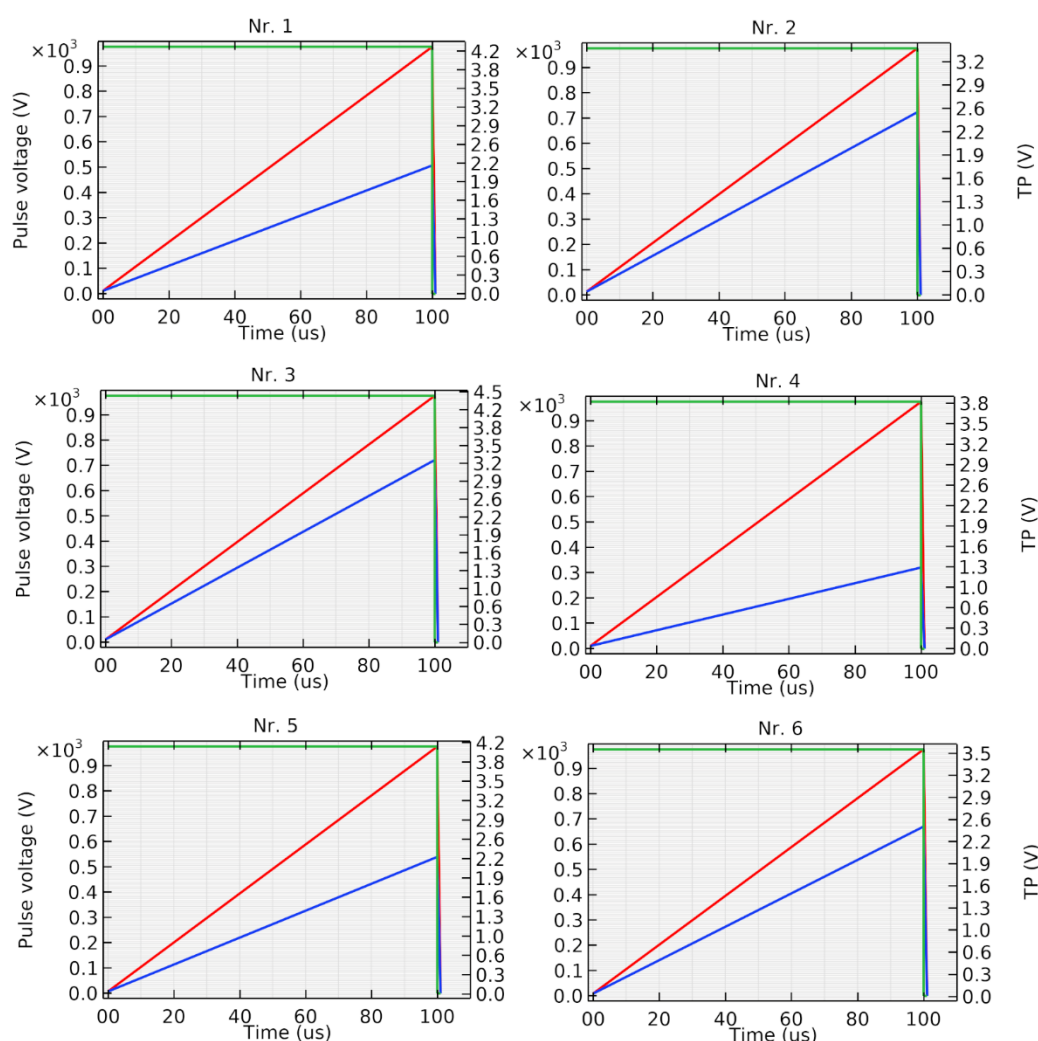
Modeliavimo sąlygos numeris / Number of modeling condition	σ_t , S m ⁻¹	σ_c , S m ⁻¹	σ_v , S m ⁻¹
13	0,76	0,76	0,76
14	0,76	0,76	0,25
15	0,76	0,25	0,76
16	0,25	0,76	0,76
17	0,25	0,25	0,76
18	0,25	0,25	0,25

3.4.4. Biologinės ląstelės transmembraninių potencialų tyrimas

Iš Švano lygties yra žinoma, kad ant sferos formos ląstelės membranos indukuoto transmembraninio potencialo didumas tiesiškai priklauso nuo šios ląstelės formos (f), ląstelę veikiančio elektrinio lauko stiprumo (E , V m⁻¹), ląstelės spindulio (r , μm) ir kampo tarp ląstelės normalės ir elektrinio lauko vektorinių linijų (θ). Tačiau tiesinė Švano lygtis nebegalioja tada, kai ląstelė yra netaisyklingos formos arba kai aukštos įtampos impulso trukmė yra nano sekundžių eilės (Gimsa ir Wachner, 2001; Valič ir kt., 2003). Tokiu atveju TMP dydis yra apskaičiuojamas pasitelkus Laplaso lygtis (Valič ir kt., 2003). Atsižvelgus į elektrinio lauko vektorinių linijų krypties bei ląstelės padėtį, šių linijų atžvilgiu jis gali būti net kelis kartus didesnis nei sferos formos ląstelės atveju (Kotnik, 2016).

Mokslininkų nustatyta, kad eksperimentiškai išmatuota biologinių ląstelių transmembraninio potencialo kritinė riba, prie kurios įvyksta elektroporacijos procesas, gali svyruoti nuo 0,2 iki 1 V (Teissié ir Rols, 1993; Weaver, 2003). Tačiau, atsižvelgus į tai, kad fosfolipidinės membranos storis gali keistis pagal lipidų rūšį ir aplinkos veiksnių įtaką (Karp ir Marshall, 2013), galima iškelti prielaidą, kad TMP dydis, išmatuotas tam tikrame membranos taške, gali būti didesnis nei laidžiosios poros srityje. Todėl šio tyrimo metu gauti ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto TMP yra apskaičiuoti taškuose, kurie yra pažymėti geltona spalva. Jie nutolę vienodais atstumu nuo laidžiosios poros ir yra lygiagretūs vienas kitam (žr. 3.18 pav.). TMP analizės rezultatai pateikti paveiksluose (žr. 3.20–3.22 pav.).

➤ Raudonojo burokėlio ląstelės TMB analizės rezultatai:

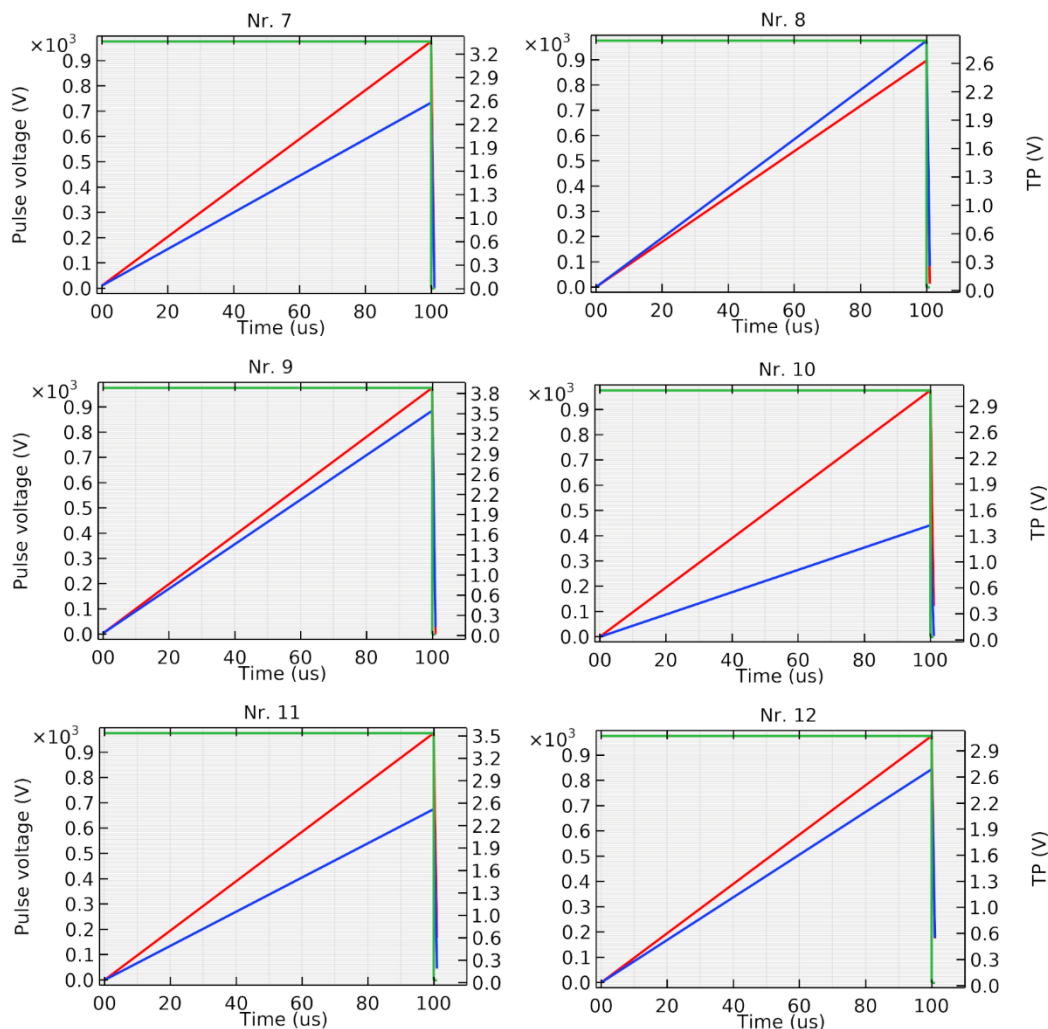


3.20 pav. Raudonojo burokėlio ląstelės membranos TMP (raudona linija) ir tonoplasto TMP (mėlyna linija), 1000 V ir 100 μ s impulsas (žalia linija). TMP – transmembraninis potencialas

Fig. 3.20. The simulated transmembrane potential (TP) on beetroot cell membrane (red line) and tonoplast (blue line). The 1000 V voltage and 100 μ s duration pulse is depicted as green line

Rezultatai parodė, kad didžiausias TMP (3,2V) indukuotas ant tonoplasto 100 μ s impulso pabaigoje buvo tada, kai $\sigma_t = \sigma_v = 1,46 S m^{-1}$; $\sigma_c = 0,48 S m^{-1}$ (Nr. 3). Mažiausias TMP (1,4 V) buvo indukuotas, kai $\sigma_t = 0,48 S m^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 1,46 S m^{-1}$ (Nr. 4). TMP analizės grafikuose (žr. 3.20–3.22 pav.) ir lentelėse pateiktų duomenų modeliavimo sąlygose (žr. 3.6–3.8 lent.) taip pat matyti, kad ant ląstelės membranos ir tonoplasto indukuoto TMP dydžio skirtumai mažėjo pagal elektrinių laidumo santykinį dydį abipus ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto. Didžiausias skirtumas (2,5 V) tarp ląstelės membranos TMP ir tonoplasto TMP buvo, kai $\sigma_t = 0,48 S m^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 1,46 S m^{-1}$ (Nr. 4) ir palaipsniui mažėjo šia tvarka: $\sigma_t = \sigma_c = 0,48$; $\sigma_v = 1,46$ (Nr. 5; 2 V), $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v = 1,46$ (Nr. 1; 2V), $\sigma_t = \sigma_v = 1,46$; $\sigma_c = 0,48$ (Nr. 3; 1,3V), $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v = 0,48$ (Nr. 6; 0,9V), $\sigma_t = \sigma_c = 1,46$; $\sigma_v = 0,48$ (Nr. 2; 0,8V).

➤ Mėlynių uogos ląstelės TMP analizės rezultatai:

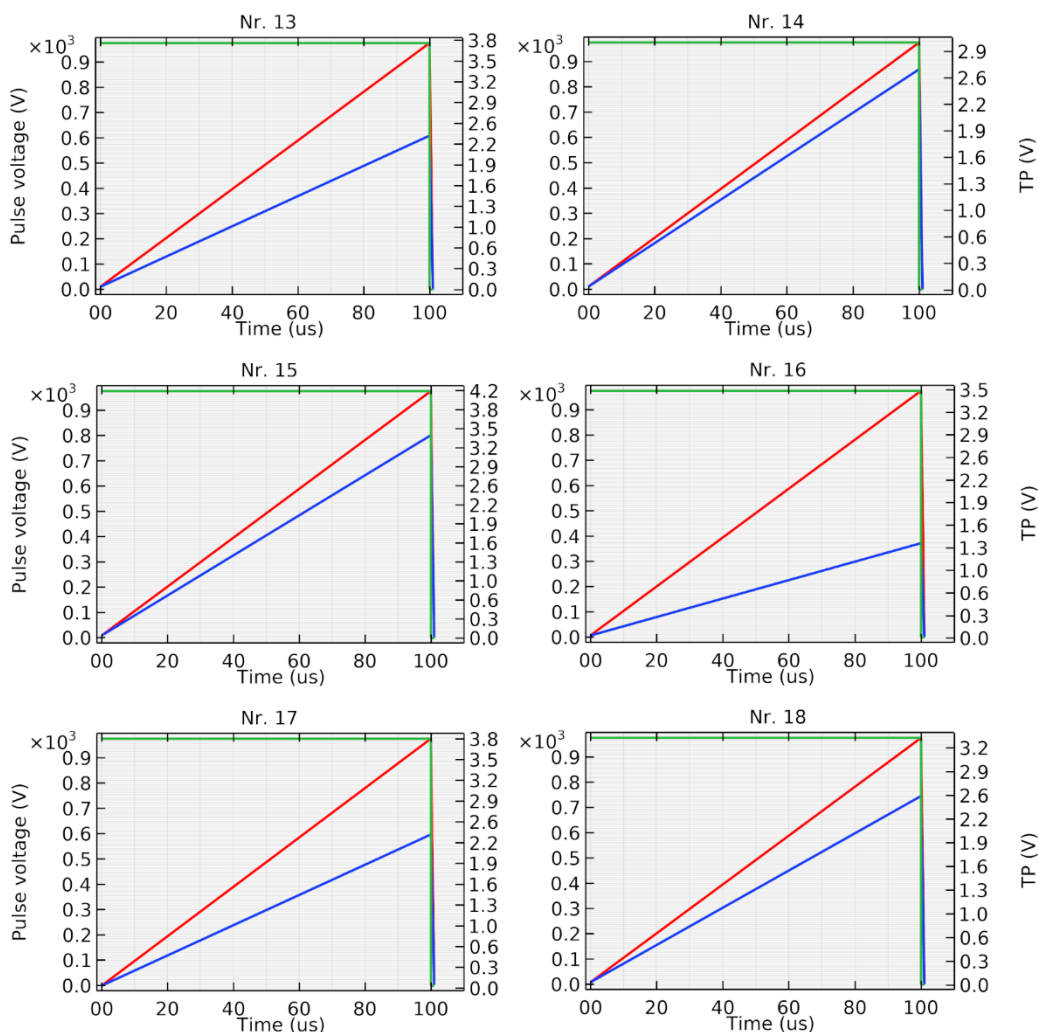


3.21 pav. Mėlynių uogos ląstelės membranos TMP (raudona linija) ir tonoplasto TMP (mėlyna linija), 1000 V ir 100 μs impulsas (žalia linija). Pulse voltage – impulse įtampa. TMP – transmembraninis potencialas
Fig. 3.21. The simulated transmembrane potential (TP) on the blueberry cell membrane (red line) and tonoplast (blue line). The 1000 V voltage and 100 μs duration pulse is depicted as green line

Gauti rezultatai atskleidė, kad didžiausias TMP (3,5V) indukuotas ant tonoplasto 100 μs impulso pabaigoje buvo tada, kai $\sigma_t = \sigma_v = 0,28 S m^{-1}$; $\sigma_c = 0,09 S m^{-1}$ (Nr. 9). Mažiausias TMP (1,5V) buvo indukuotas, kai $\sigma_t = 0,09 S m^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 0,28 S m^{-1}$ (Nr. 10). TMP analizės grafikuose (žr. 3.30 pav.) ir lentelėse pateiktose duomenų modeliavimo sąlygose (žr. 3.6–3.8 lent.) aiškėja, kad ant ląstelės membranos ir tonoplasto indukuoto TMP dydžio skirtumai mažėjo pagal elektrinių laidumo santykinį dydį abipus ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto. Didžiausias skirtumas (1,5V) tarp ląstelės membranos TMP ir tonoplasto TMP buvo, kai $\sigma_t = 0,09 S m^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 0,28 S m^{-1}$ (Nr. 10) ir palaipsniui mažėjo šia tvarka: $\sigma_t = \sigma_c = 0,09$; $\sigma_v = 0,28$ (Nr. 11; 0,9V), $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v = 0,28$ (Nr. 7; 0,7 V), $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v = 0,09$ (Nr. 12; 0,4V), $\sigma_t = \sigma_v = 0,28$; $\sigma_c = 0,09$ (Nr. 9; 0,3V), kol galiausiai ant tonoplasto indukuoto TMP dydis

viršijo TMP indukuotą ant ląstelės membranos (+0,3V). Ant tonoplasto indukuotas TMP tapo didesnis nei ant ląstelės membranos. kai $\sigma_t = \sigma_c = 0,28$; $\sigma_v = 0,09$ (Nr. 8).

➤ Aitriosios paprikos ląstelės TMP analizės rezultatai:



3.22 pav. Aitriosios paprikos ląstelės membranos TMP (raudona linija) ir tonoplasto TMP (mėlyna linija), 1000 V ir 100 μ s impulsas (žalia linija). TMP – transmembraninis potencialas

Fig. 3.22. The simulated transmembrane potential (TP) on chili pepper cell membrane (red line) and tonoplast (blue line). The 1000 V voltage and 100 μ s duration pulse is depicted as green line

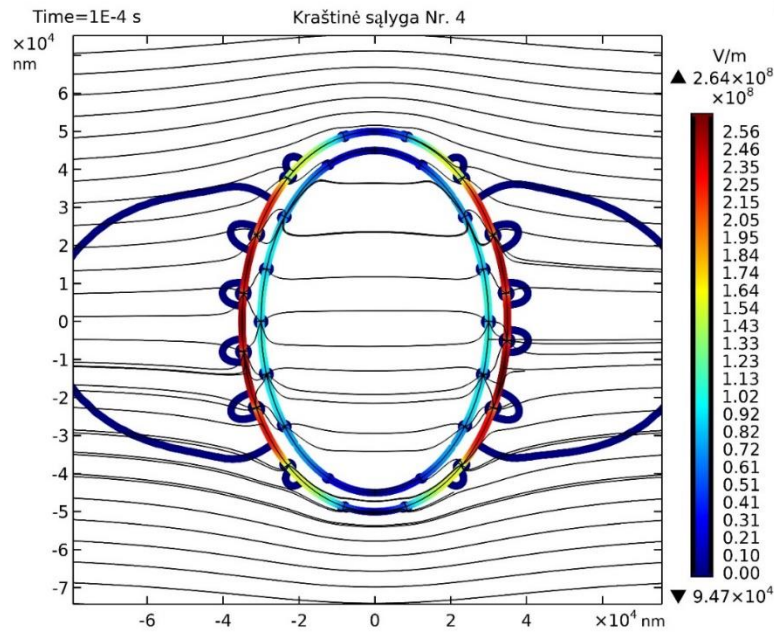
Nustatyta, kad didžiausias TMP (3,4V) indukuotas ant tonoplasto 100 μ s impulso pabaigoje buvo tada, kai $\sigma_t = \sigma_v = 0,76 S m^{-1}$; $\sigma_c = 0,25 S m^{-1}$ (Nr. 15). Mažiausias TMP (1,4 V) buvo indukuotas, kai $\sigma_t = 0,25 S m^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 0,76 S m^{-1}$ (Nr. 16). Iš (žr. 3.31 pav.) TMP analizės grafikų ir duomenų pateiktų modeliavimo sąlygų lentelėse (žr. 3.13–3.15 lent.) taip pat matyti, kad ant ląstelės membranos ir tonoplasto indukuoto TMP dydžio skirtumai mažėjo pagal elektrinių laidumo santykinį dydį abipus ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto. Didžiausias skirtumas (2,1 V) tarp ląstelės membranos TMP ir tonoplasto TMP buvo, kai $\sigma_t = 0,25 S m^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 0,76 S m^{-1}$ (Nr. 16; 2,1V) ir palaipsniui mažėjo šia tvarka: $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v = 0,76$

(Nr. 13; 1,4V), $\sigma_t = \sigma_c = 0,25$; $\sigma_v = 0,76$ (Nr. 17; 1,4V), $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v = 0,25$ (Nr. 18; 0,9), $\sigma_t = \sigma_v = 0,76$; $\sigma_c = 0,25$ (Nr. 15; 0,8V), $\sigma_t = \sigma_c = 0,76$; $\sigma_v = 0,25$ (Nr. 14; 0,4V).

Apibendrinus burokėlio, mėlynių uogos ir aitriosios paprikos ląstelių TMP analizių metu gautus rezultatus, akcentuotina, kad kai ląstelės išorinės terpės, citozolio ir vakuolės vidinės erdmės elektriniai laidumai yra vienodi $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v$, tada ant ląstelės membranos indukuotas TMP didėja tiesiškai didėjant išorinės terpės elektriniam laidumui. Tačiau kai $\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v$, ant tonoplasto indukuotas TMP didėja tada, kai visų šių terpių elektrinis laidumas mažėja. Žinant tai, kad šiame elektroporuotos ląstelės modelyje laidžiųjų porų skaičius yra baigtinis (ribojamas transmembraninės srovės dydis), galima daryti prielaidą, kad didėjantis indukuotas TMP rodo galimai didesnę membranos elektroporacijos efektyvumą. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad tonoplasto elektroporacijos efektyvumas didėja mažėjant elektriniam laidumui abipus ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto. Tačiau keičiantis elektrinių laidumų santykiui, keitėsi ir ant tonoplasto indukuotas TMP. Atsižvelgus į tai, kad ląstelės vakuolėje yra didesnė jonų ir krūvi turinčių molekulių koncentracija, manytina, jog vakuolės viduje esantis savitasis elektrinis laidumas bus didesnis nei ląstelės citozolyje. Todėl matematinių modeliavimo sąlygų Nr. 4, Nr. 10 ir Nr. 16 analizės metu gauti TMP rezultatai gali būti labiausiai tikėtini. Pritaikius šias išvardytas sąlygas, gauti rezultatai parodė, kad tonoplasto membranos elektroporacijos efektyvumas gali tapti didesnis už ląstelės membranos, kai $\sigma_t = \sigma_c = 0,28$; $\sigma_v = 0,09$ (Nr. 8). O modeliavimo sąlygos Nr. 2 ir Nr. 14 buvo sprendžiamos esant didesniems laidumams ir atskleidė galimai mažesnę tonoplasto elektroporacijos efektyvumą.

3.4.5. Elektroporacijos įtaka elektrinio lauko stiprumui ant ląstelės membraną

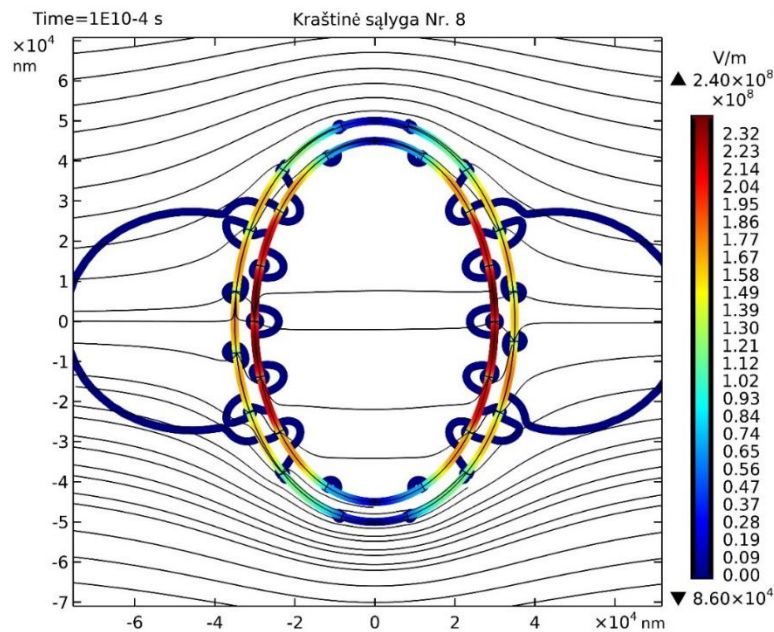
Šiai analizei atlikti buvo pasirinktos biologinės ląstelės transmembranių potencialų tyrimo metu analizuotos sąlygos, kai indukuotas TMP ant tonoplasto buvo mažiausias (Nr. 4) ir didžiausias (Nr. 8), palyginti su indukuotuoju ant ląstelės membranos. Šios analizės uždavinys buvo įvertinti elektrinio lauko stiprumo pasiskirstymą ląstelės geometrijos aplinkoje. Šiam uždaviniui atlikti buvo analizuojamas elektrinio lauko vektorinių linijų ir kontūro lygių pasiskirstymas. Elektrinio lauko vektorinių linijų skaičius (35) buvo parinktas pagal lauko stiprumo amplitudę siekiant tiksliau atvaizduoti šių linijų išsidėstymą apdoravimo kameroje ir aplink elektroporuotos ląstelės geometriją. Tuo pačiu principu buvo parinktas ir elektrinio lauko kontūro lygių skaičius (1395). Skirtingų spalvų elektrinio lauko kontūro lygiai žymi skirtingus elektrinio lauko stiprumus, šių spalvų reikšmės pateiktos spalvų juostoje kiekvieno grafiko dešinėje pusėje.



3.23 pav. Elektrinio lauko vektorinių linijų (juodos spalvos linijos) ir elektrinio lauko kontūro lygių (spalvų juosta) pasiskirstymas, kai $\sigma_t = 0,48 \text{ S m}^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 1,46 \text{ S m}^{-1}$ (Nr. 4)

Fig. 3.23. Electric field lines (black lines) and electric field contour (color legend) in domain of electroporated cell when $\sigma_t = 0.48 \text{ S m}^{-1}$; $\sigma_c = \sigma_v = 1.46 \text{ S m}^{-1}$ (Nr. 4)

Gauti grafiniai rezultatai atskleidžia, kad ant ląstelės membranos ir vakuolės tonoplasto sukurto elektrinio lauko stiprumo dydis priklauso nuo kampo tarp ląstelės normalės ir vektoriųjų elektrinio lauko linijų (žr. 3.23 pav.). Nustatyta, kad elektrinio lauko stiprumas ant laidžiųjų porų yra keletą kartų mažesnis nei membranų srityse, kurios nėra elektroporuotos. Šie grafiniai rezultatai atitinka gautuosius po TMP analizės (Nr. 8) ir parodo, kad elektrinio lauko stiprumas yra didžiausias tose membranų vietose, kuriose buvo suskaičiuotas didžiausias ant tonoplasto indukuotas TMP, kai $\sigma_t = 0,48 \text{ S/m}$; $\sigma_c = \sigma_v = 1,46 \text{ S/m}$ (Nr. 4).



3.24 pav. Elektrinio lauko vektorinių linijų (juodos spalvos linijos) ir elektrinio lauko kontūro lygių (spalvų juosta) pasiskirstymas, kai $\sigma_t = \sigma_c = 0,28$; $\sigma_v = 0,09$ (Nr. 8)

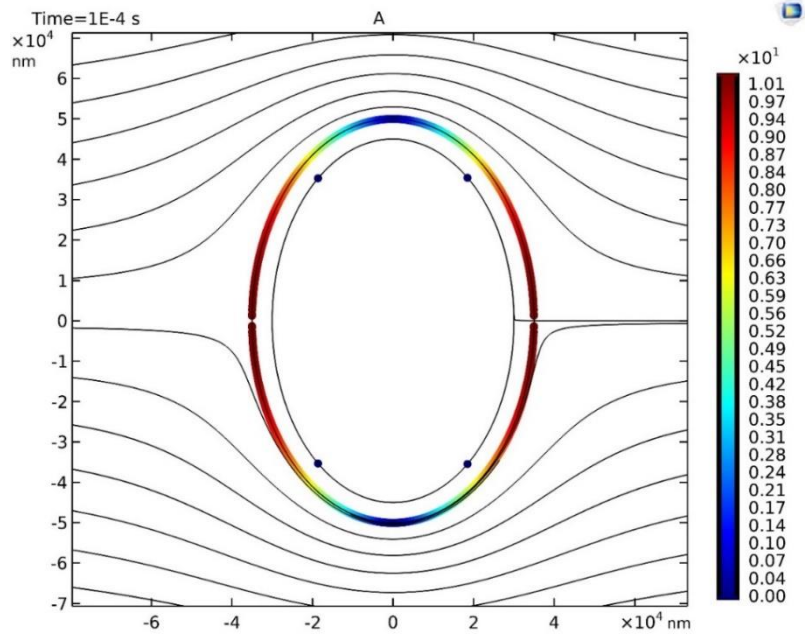
Fig. 3.24. Electric field lines (black lines) and electric field contour (color legend) in domain of electroporated cell when $\sigma_t = \sigma_c = 0.28$; $\sigma_v = 0.09$ (Nr. 8)

Kai $\sigma_t = \sigma_c = 0,28$; $\sigma_v = 0,09$ (Nr. 8), tada elektrinio lauko stiprumas ant abiejų membranų pasiskirstė taip pat, atsižvelgiant į vektorinių linijų kryptį ląstelės normalės atžvilgiu (žr. 3.24 pav.). Tačiau elektrinis laukas buvo pastebimai mažesnis ant ląstelės membranos, palyginti su indukuotuoju ant tonoplasto ir jis koreliuoja su rezultatais, gautais po TMP analizės.

3.4.6. Elektroporacijos proceso chronologinė analizė

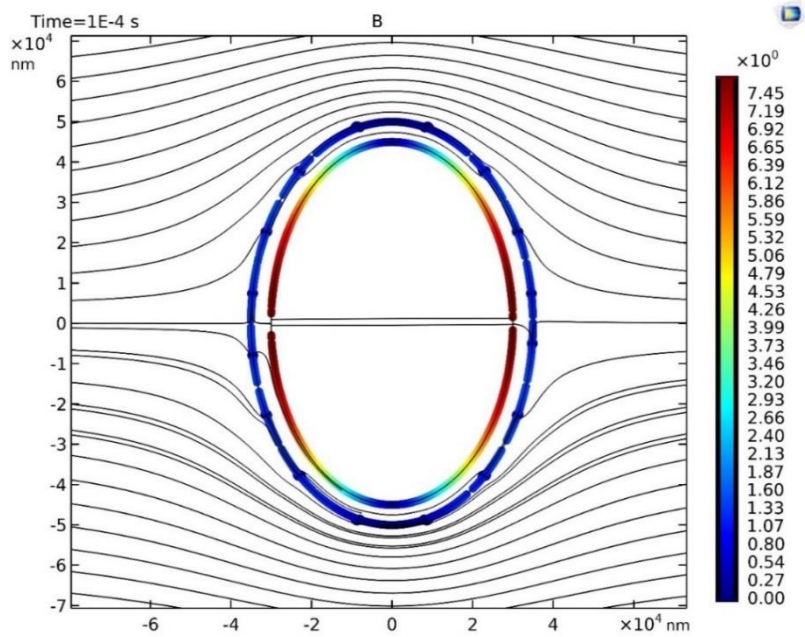
Šios simuliacinės analizės uždavinys – ištirti elektroporacijos proceso įtaką TMP susidarymui, atsižvelgiant į skirtingas elektroporacijos proceso stadijas:

- elektrinio impulso apdorojimo nepakanka, kad būtų galima elektroporuoti ląstelės membraną ir tonoplastą;
- elektrinis impulsas elektroporuoja tik ląstelės membraną, o tonoplastas nėra elektroporuojamas;
- elektrinio impulso apdorojimas yra pakankamas sukelti elektroporacijos procesą tiek ant ląstelės membranos, tiek ant tonoplasto.



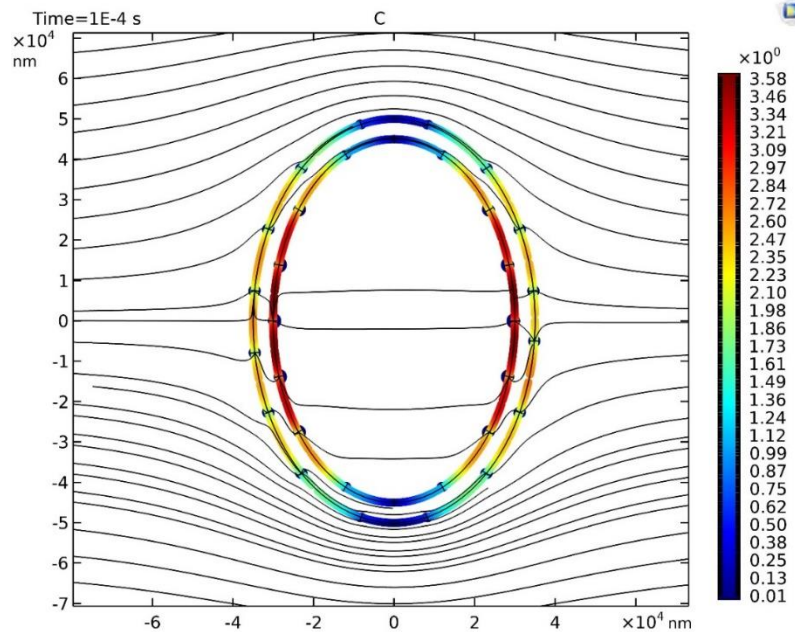
3.25 pav. TMP pasiskirtstymas neįvykus membranų elektroporacijai (a)

Fig. 3.25. Distribution of TMP on non – electroporated cell (a)



3.26 pav. TMP pasiskirtstymas po ląstelės membranos elektroporacijos (b)

Fig. 3.26. Distribution of TMP after the electroporation of cell membrane (b)



3.27. pav. TMP pasiskirstymas po ląstelės membranos ir tonoplasto elektroporacijos (c)

Fig. 3.27. Distribution of TMP after the electroporation of cell membrane and tonoplast (c)

Gauti rezultatai atskleidė, kad elektrinio impulso metu ant ląstelės membranos indukuotas TMP (žr. 3.25–3.27 pav.) sumažėja tada, kai ant membranos susikuria laidžiosios poros. Paveiksle matyti, kad ant vakuolės tonoplasto TMP nėra indukuojamas tol, kol nėra elektroporuojama ląstelės membrana. Tačiau įvykus ląstelės membranos elektroporacijai (kai $\sigma_t = \sigma_c = 0,28$; $\sigma_v = 0,09$), TMP yra indukuojamas ir ant tonoplasto. Pastebėtina, kad elektrinio lauko linijos išretėja ties ląstelės membranos sritimis, ant kurių yra indukuojamas didžiausias TMP, ir priešingai – sutankėja ten, kur TMP yra mažiausias. Šis dėsningumas aiškintinas tuo, kad elektrinio lauko stiprumas yra mažiausias tose srityse, per kurias prateka didžiausia transmembraninė srovė.

IŠVADOS

1. Mėlynių uogas (*Vaccinium myrtillus* L.) apdorojus skirtingais IEL suteiktos specifinės energijos kiekiais, nustatyta, kad 1 kJ kg⁻¹ IEL 32 % padidino mėlynių sulčių išėigą, 10 kJ kg⁻¹ IEL 55 % padidino bendrą antocianinų kiekį sultyse ir 75 % išspaudų ekstrakte.
2. Mėlynių uogas (*Vaccinium myrtillus* L.) apdorojus skirtingais IEL suteiktos specifinės energijos kiekiais, nustatyta, kad 10 kJ kg⁻¹ apdorojimas IEL atitinkamai 40,5 % ir 108,6 % padidino sulčių ir išspaudų ekstrakto antioksidacinį aktyvumą.
3. Aitriųjų paprikų (*Capsicum annum* L.) placentas apdorojus IEL, nustatyta, kad IEL įtaka kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėigos efektyvumui yra didesnė tada, kai mechaninė ekstrakcija yra vykdoma distiliuotame vandenyje (pH 5,8), o mažesnė – etanolyje (96 %, v/v). Kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėiga vandenyje, po 1,1 kJ kg⁻¹ specifinės energijos kiekio ir 3 kV cm⁻¹ IEL stiprumo apdoravimo, padidėjo atitinkamai 200 % ir 211 %, o 12,8 kJ kg⁻¹ suteiktos specifinės energijos kiekio ir tokio pat stiprumo IEL kapsaicino ir dihidrokapsaicino ekstrakcijos išėigą etanolyje padidino atitinkamai tik 29 % ir 21 %.
4. Raudonuosius burokėlius (*Beta vulgaris* L.) apdorojus IEL, nustatyta, kad betaksantinų ir betacianinų ekstrakcijos efektyvumas labiausiai priklauso nuo IEL stiprumo ir suteiktos specifinės energijos kiekio, o teigiamas elektrinių impulsų skaičiaus poveikis šių biologiškai aktyvių junginių ekstrakcijos išėigai yra reikšmingas tik tada, kai IEL yra silpnesnis nei 1 kV cm⁻¹.
5. Raudonuosius burokėlius (*Beta vulgaris* L.) apdorojus skirtingų parametrų IEL, nustatyta, kad 2,53 kJ kg⁻¹ specifinės energijos kiekio ir 2 kV cm⁻¹ IEL stiprumo apdorojimas yra optimalus betaksantinų ir betacianų ekstrakcijos efektyvumo bei elektros energijos sąnaudų požiūriu. Buvo nustatyta tiesioginė priklausomybė tarp ekstrakto savitojo elektrinio laidumo ir betalainų išėigos, tačiau atvirkščiai proporcingas ryšys – tarp šių junginių išėigos (gautos po vienodo specifinės energijos kiekio ir skirtingo stiprumo apdoravimų IEL) ir ląstelių dezintegracijos indekso.
6. Matematinio modeliavimo metu gauti rezultatai parodė, kad ant vakuolės tonoplasto indukuotas transmembraninio potencialo dydis priklauso nuo ląstelės išorinės terpės savitojo elektrinio laidumo.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ackmann, J. J., Seitz, M. A. (1984). Methods of complex impedance measurements in biologic tissue. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 11, 281–311.
2. Ade-Omowaye, B. I. O., Angersbach, A., Eshtiaghi, N. M., Knorr, D. (2000). Impact of high intensity electric field pulses on cell permeabilisation and as pre-processing step in coconut processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologie*, 1, 203–209.
3. Aguiló-Aguayo, I., Hossain, M. B., Brunton, N., Lyng, J., Valverde, J., Rai, D. K. (2014). Pulsed electric fields pre-treatment of carrot purees to enhance their polyacetylene and sugar contents. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 23, 79–86.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2017). Membrane transport of small molecules and the electrical properties of membranes. In: Wilson, J., Hunt, T. (Eds.). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 597–640.
5. Anten, N. P. R. (2006). In: Schulze, E., Beck, E., Müller-Hohenstein, K. (2005). *Plant ecology*. Berlin, Heidelberg, Springer. 702 pp. *Ann. Bot.*, 97, 153–153.
6. Arroyo, C., Lyng, J. G. (2016). Pulsed Electric Fields in Hurdle Approaches for Microbial Inactivation. In: Miklavcic, D. (Eds.). *Handbook of Electroporation*. Springer, Cham.
7. Atefi, S. R., Seoane, F., Lindecrantz, K. (2012). Electrical Bioimpedance cerebral monitoring. Preliminary results from measurements on stroke patients. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 126–129.
8. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *A review. J. Food Eng.*, 117, 426–436.
9. Baier, A. K., Bußler, S., Knorr, D. (2015). Potential of high isostatic pressure and pulsed electric fields to improve mass transport in pea tissue. *Food Research International*, 76, 66–73.
10. Balasa, A. (2014). *Pulsed electric field induced stress in plant systems*. PhD thesis. Technische Universität Berlin.
11. Barba, F. J., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N., Vorobiev, E. (2015b). Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace. *Food Bioprocess Technol.*, 8, 1139–1148.

12. Barba, F. J., Galanakis, C. M., Esteve, M. J., Frigola, A., Vorobiev, E. (2015a). Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high-added value compounds from blackberries. *J. Food Eng*, 167, 38–44.
13. Barba, F. J., Jäger, H., Meneses, N., Esteve, M. J., Frígola, A., Knorr, D. (2012). Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 18–24.
14. Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., Saraiva, J. A., Raso, J., Martin-Belloso, O., Witrowa-Rajchert, D., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2015c). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Res. Int* 77, 773–798.
15. Barbero, G. F., Liazid, A., Azaroual, L., Palma, M., Barroso, C. G. (2016). Capsaicinoid Contents in Peppers and Pepper-Related Spicy Foods. *International Journal of Food Properties*, 19, 3, 485–493.
16. Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M., Barroso, C. G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75 (5), 1332–1337.
17. Barbero, G. F., Palma, M., Barroso, C. G. (2006a). Pressurized Liquid Extraction of Capsaicinoids from Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (9), 3231–3236.
18. Barbero, G. F., Palma, M., Barroso, C. G. (2006b). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 578 (2), 227–233.
19. Basra, A. S. (1994). *Mechanisms of plant growth and improved productivity, modern approaches*. Marcel Dekker, New York.
20. Bazhal, M., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2003). Optimisation of pulsed electric field strength for electroporation of vegetable tissues. *Biosystems Engineering*, 86, 339–345.
21. Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*, 239, 70–76.
22. Bernhardt, J., Pauly, H. (1973). On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Biophysik*, vol. 10, iss. 1, 89–98.
23. Bethmann, B., Thaler, M., Simonis, W., Schonknecht, G. (1995). Electrochemical Potential Gradients of H⁺, K⁺, Ca²⁺, and Cl⁻ across the Tonoplast of the Green Alga *Eremosphaera Viridis*. *Plant Physiol.*, 109, 1317–1326.

24. Bobinaitė, R., Pataro, G., Lamanauskas, N., Šatkauskas, S., Viškelis, P., Ferrari, G. (2015a). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *J. Food Sci. Technol.*, 52, 5898–5905.
25. Bobinaitė, R., Pataro, G., Raudonis, R., Viskelis, P., Bobinas, Č., Šatkauskas, S., Ferrari, G. (2015b). Improving the Extraction of Juice and Anthocyanin Compounds from Blueberry Fruits and Their by-Products by Pulsed Electric Fields. In: Jarm, T., Kramar, P. (Eds.). *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies, IFMBE Proceedings*. Springer Singapore, Singapore, 363–366.
26. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25–30.
27. Brazelton, C. (2012). *World blueberry acreage and production report*. North American Blueberry Council. 2013.
28. Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Bello-Bello, J. J., Lecona-Guzmán, C., Solís-Marroquín, D., Avilés-Viñas, S., Gómez-Uc, E., López-Puc, G., Santana-Buzzy, N., Iglesias-Andreu, L. G. (2008). Capsaicinoids Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest Known Cultivars. *HortScience*, 43 (5), 1344–1349.
29. Carbonell-Capella, J. M., Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2016). “Ice” juice from apples obtained by pressing at subzero temperatures of apples pretreated by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 187–194.
30. Cebrián, G., Condón, S., Mañas, P. (2016). Influence of growth and treatment temperature on *Staphylococcus aureus* resistance to pulsed electric fields: Relationship with membrane fluidity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 161–169.
31. Chalermchat, Y., Fincan, M., Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering*, 64 (2), 229–236.
32. Cholet, C., Delsart, C., Petrel, M., Gontier, E., Grimi, N., L’hyvernay, A., Ghidossi, R., Vorobiev, E., Mietton-Peuchot, M., Geny, L. (2014). Structural and biochemical changes induced by pulsed electric field treatments on Cabernet Sauvignon grape berry-skins: impact on cell-wall total tannins and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem*, 62, 2925–2934.
33. Chu, W., Cheung, S. C. M., Lau, R. A. W., Benzie, I. F. F. (2011). Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). In: Benzie, I. F. F., Wachtel-Galor, S. (Eds.). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

34. Chung, M.-K., Campbell, J. N. (2016). Use of capsaicin to treat pain: mechanistic and therapeutic considerations. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9 (4), 66.
35. Cisneros-Zevallos, L. (2003). The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables. *J. Food Sci*, 68, 1560–1565.
36. Contreras-Padilla, M., Yahia, E. M. (1998). Changes in Capsaicinoids during Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (6), 2075–2079.
37. Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 85–91.
38. Daood, H. G., Illés, V., Gnayfeed, M. H., Mészáros, B., Horváth, G., Biacs, P. A. (2002). Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane. *The Journal of Supercritical Fluids*, 23 (2), 143–152.
39. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3), 173–289.
40. DeLong, J. M. (2017). Storage. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Elsevier, 340–350.
41. Delsart, C., Franc, C., Grimi, N., de Revel, G., Vorobiev, E., Peuchot, M. M. (2016). Effects of Pulsed Electric Fields on Four Residual Fungicides in White Wines. In: Jarm T., Kramar P. (Eds). *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies. IFMBE Proceedings*, vol 53. Springer, Singapore.
42. Dinkova, R., Shikov, V., Mihalev, K., Velchev, Z., Dinkov, H., Mollov, P. (2012). Changes in the total anthocyanins and polyphenols during processing of wild berries into freshly pressed juices. *Journal of EcoAgriTourism*, 8 (1), 254–259.
43. Dong, X., Li, X., Ding, L., Cui, F., Tang, Z., Liu, Z. (2014). Stage extraction of capsaicinoids and red pigments from fresh red pepper (*Capsicum*) fruits with ethanol as solvent. *LWT – Food Science and Technology*, 59 (1), 396–402.
44. Donsì, F., Ferrari, G., Fruilo, M., Pataro, G. (2010b). Pulsed Electric Field-Assisted Vinification of Aglianico and Piediroso Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (22), 11606–11615.

45. Dörnenburg, H., Knorr, D. (1993). Cellular permeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnol.*, 7, 35–48.
46. Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., Rimbach, G. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and Chemical Toxicology*, 73, 119–126.
47. Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., Rimbach, G. (2015). Betanin-a food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(1), 36–47.
48. Fincan, M., DeVito, F., Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering*, 64 (3), 381–388.
49. Foster, S., Blumenthal, M. (2012). The adulteration of commercially bilberry extracts. *HerbalGram*, 96, 64–73.
50. Fry, S. C. (2011). Plant cell walls. From chemistry to biology. *Ann. Bot.*, 108, viii–ix.
51. Fry, S. C. (2017). Cells. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Second edition, ed. by B. Thomas, B. G. Murray, D. J. Murphy. Academic Press, Oxford, 174–184. ISBN 9780123948083.
52. Galindo, F. G., Vernier, P. T., Dejmek, P., Vicente, A., Gundersen, M. A. (2008). Pulsed electric field reduces the permeability of potato cell wall. *Bioelectromagnetics*, 29, 296–301.
53. Georgiev, V. G., Weber, J., Kneschke, E.-M., Denev, P. N., Bley, T., Pavlov, A. I. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta vulgaris* cv. Detroit dark red. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 65 (2), 105–111.
54. Gimsa, J., Wachner, D. (2001). Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophys J.*, 81, 1888–1896.
55. González-Aguilar, G. A., Zavaleta-Gatica, R., Tiznado-Hernández, M. E. (2007). Improving postharvest quality of mango ‘Haden’ by UV-C treatment. *Postharvest Biol. Technol.*, 45, 108–116.
56. Govindaraghavan, S. (2014). Pharmacopeial HPLC identification methods are not sufficient to detect adulterations in commercial bilberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. Anthocyanin profile provides additional clues. *Fitoterapia*, 99, 124–138.
57. Govindarajan, V. S., Rajalakshmi, D., Chand, N., Salzer, U. J. (1987). Capsicum – Production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25 (3), 185–282.

58. Govindarajan, V. S., Salzer, U. J. (1986). Capsicum – Production, technology, chemistry, and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24 (3), 245–355.
59. Govindarajan, V. S., Sathyanarayana, M. N. (1991). Capsicum – production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29 (6), 435–474.
60. Govindarajan, V. S., Sathyanarayana, M. N. (1991). Capsicum – production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 6, 435–474.
61. Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., Vaxelaire, J. (2011). Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields. *J. Food Eng.*, 103, 52–61.
62. Grimnes, S., Martinsen, O. (2008). *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. Second edition, ed. by S. Grimnes and O. Martinsen. Academic Press, Oxford, 1–6. ISBN 9780123740045.
63. Haard, N. F., 1984. Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. *J. Chem. Educ.*, 61, 277.
64. Han, J., Isoda, H. (2009). Capsaicin induced the upregulation of transcriptional and translational expression of glycolytic enzymes related to energy metabolism in human intestinal epithelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (23), 11148–11153.
65. Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D. (2001). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technology*, 12 (3–4), 103–111.
66. Higashio, H., Hirokane, H., Sato, F., Tokuda, S., Uragami, A. (2005). Effect of uv irradiation after the harvest on the content of flavonoid in vegetables. *Acta Horti*, 1007–1012.
67. Hulme, A. C., Jones, J. D., Woollorton, L. S. C. (1964). *Phytochem.*, 3, 173.
68. Ivorra, A. (2015). Electrical impedance and electroporation. *Proceedings of the Electroporation – based Technologies and Treatments*. November 15–21, Ljubljana, Slovenia, 113–123.
69. Ivorra, A., VILLEMEJANE, J., & Mir, L. M. (2010). Electrical modeling of the influence of medium conductivity on electroporation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12 (34), 10055–10064.

70. Jaeger, H., Schulz, M., Lu, P., Knorr, D. (2012). Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 46–60.
71. Jäger, H. (2013). *Process Performance Analysis of Pulsed Electric Field (PEF) Food Applications*. PhD thesis. Technische Universität Berlin.
72. Jäger, H., Knorr, D. (2017). Pulsed electric fields treatment in food technology: challenges and opportunities. In: Miklavcic, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing, Cham, 1–24.
73. Janositz, A., Knorr, D. (2010). Microscopic visualization of Pulsed Electric Field induced changes on plant cellular level. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 592–597.
74. Janyou, A., Wicha, P., Jittiwat, J., Suksamrarn, A., Tocharus, C., Tocharus, J. (2017). Dihydrocapsaicin Attenuates Blood Brain Barrier and Cerebral Damage in Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Via Oxidative Stress and Inflammatory. *Scientific Reports*, 7 (1), 10556.
75. Jaroszeski, M. J., Heller, R., Gilbert, R. (2000). Electrochemotherapy, electrogenetherapy, and transdermal drug delivery. *Humana Press*. New Jersey.
76. Kader, A. A. (2002). Pre- and postharvest factors affecting fresh produce quality, nutritional value, and implications for human health. *Proceedings of the International Congress Food Production and the Quality of Life*. Sassari, Italy, September 4–8, 2000, 1, 109–119.
77. Kähkönen, M. P., Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 628–633.
78. Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., Prior, R. L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4638–4644.
79. Kanner, J., Harel, S., Granit, R. (2001). Betalains--a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5178–5185.
80. Kapadia, G. J., Azuine, M. A., Sridhar, R., Okuda, Y., Tsuruta, A., Ichiishi, E., Mukainake, T., Takasaki, M., Konoshima, T., Nishino, H., Tokuda, H. (2003). Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacological Research*, 47 (2), 141–148.
81. Karnka, R., Rayanakorn, M., Watanesk, S., Vaneesorn, Y. (2002). Optimization of High-Performance Liquid Chromatographic Parameters for the Determination of Capsaicinoid Compounds Using the Simplex Method. *Analytical Sciences*, 18 (6), 661–665.

82. Karp, G., Marshall, I. (2013). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 7th edition. USA, John Wiley & Sons. ISBN 13 978-1118-20673-7.
83. Kirschbaum-Titze, P., Hiepler, C., Mueller-Seitz, E., Petz, M. (2002). Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of Capsaicinoid Content Following Cellular Disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (5), 1260–1263.
84. Kondorosi, E., Roudier, F., Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 488–492.
85. Korel, F., Bağdatlıoğlu, N., Balaban, M. Ö., Hişil, Y. (2002). Ground red peppers: capsaicinoids content, scoville scores, and discrimination by an electronic nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (11), 3257–3261.
86. Kotnik, T. (2016). Transmembrane voltage induced by applied electric fields. In: Miklavcic, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing, Cham, 1–17.
87. Kotnik, T., Bobanović, F., Miklavčič, D. (1997). Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—A theoretical analysis. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43, 285–291.
88. Kotnik, T., Miklavcic, D. (2000). Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 47, 1074–1081.
89. Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Boussetta, N., Vorobiev, E. (2016). Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 336–344.
90. Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H., Baer-Dubowska, W. (2013). Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *The British Journal of Nutrition*, 110 (12), 2138–2149.
91. Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., Pihlaja, K. (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (11), 5338–5342.
92. Kujala, T., Vienola, M., Klika, K., Loponen, J., Pihlaja, K. (2002). Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *European Food Research and Technology*, 214 (6), 505–510.
93. Laaksonen, O., Sandell, M., Kallio, H. (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *Eur. Food Res. Technol.*, 231, 271–285.

94. Lätti, A. K., Riihinen, K. R., Kainulainen, P. S. (2008). Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 190–196.
95. Leducq, N., Delmas-Beauvieux, M.C., Bourdel-Marchasson, I., Dufour, S., Gallis, J. L., Canioni, P., Diolez, P. (1998). Mitochondrial permeability transition during hypothermic to normothermic reperfusion in rat liver demonstrated by the protective effect of cyclosporin A. *Biochem. J.*, 336, (Pt 2), 501–506.
96. Lee, J., Wrolstad, R. E. (2006). Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *J. Food Sci.*, 69, 564–573.
97. Lew, R. R. (2012). Intracellular measurements of the electrical properties of walled cells. In: Volkov, A. G. (Ed.). *Plant Electrophysiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 127–144.
98. Li, J., Wang, R., Xiao, C. (2014). Association between chilli food habits with iron status and insulin resistance in a Chinese population. *Journal of Medicinal Food*, 17(4), 472–478.
99. Lodish H. F., Berk, A., Kaiser, Chris, A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2013). Transmembrane transport of ions and small molecules. In: *Molecular Cell Biology*. 7th edition. New York: W.H. Freeman and Co., 473–516.
100. Logan, D. L. (2001). *A First Course in the Finite Element Method*. Thomson-Engineering, New York.
101. Logan, D. L. (2016). *A First Course in the Finite Element Method*. 6th ed. Cengage Learning.
102. Loginova, K. V., Lebovka, N. I., Vorobiev, E. (2011a). Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, 106 (2), 127–133.
103. Loginova, K. V., Shynkaryk, M. V., Lebovka, N. I., Vorobiev, E. (2010). Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 96 (3), 374–379.
104. López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Alvarez, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 90 (1), 60–66.
105. López, N., Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Álvarez, I., Raso, J. (2009). Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1225–1231.

106. Luengo, E., Álvarez, I., Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 79–84.
107. Luengo, E., Martínez, J. M., Álvarez, I., Raso, J. (2016). Effects of millisecond and microsecond pulsed electric fields on red beet cell disintegration and extraction of betanines. *Industrial Crops and Products*, 8428–33.
108. Mahnič-Kalamiza, S., Vorobiev, E., Miklavčič, D. (2014). Electroporation in food processing and biorefinery. *J. Membr. Biol.* 247, 1279–1304.
109. Martins, F., Borges, L., Ribeiro, C. C., Reifschneider, F. B., Conceição, E. (2017). Novel approaches to extraction methods in recovery of capsaicin from habanero pepper (CNPH 15.192). *Pharmacognosy Magazine*, 13 (50), 375.
110. Miklavčič, D., Pavšelj, N. (2016). Electrical impedance and electroporation. *Proceedings of the Electroporation – based Technologies and Treatments*. November 13–19, Ljubljana, Slovenia, 19–26.
111. Moze, S., Polak, T., Gasperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Poklar Ulrih, N., Abram, V. (2011). Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6998–7004.
112. Mózsik, G., Szolcsányi, J., Rácz, I. (2005). Gastroprotection induced by capsaicin in healthy human subjects. *World Journal of Gastroenterology*, 11 (33), 5180–5184.
113. Neumann, E., Toensing, K., Kakorin, S., Budde, P., Frey, J. (1998). Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells. *Biophys. J.*, 74, 98–108.
114. Ozier-Lafontaine, H., Bajazet, T. (2005). Analysis of root growth by impedance spectroscopy (EIS). *Plant Soil*, 277, 299–313.
115. Padda, M. S., Picha, D. H. (2008). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. *Sci. Hortic.*, 119, 17–20.
116. Palmeira, C. M., Wallace, K. B. (1997). Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 338–347.
117. Palmgren, M. G. (2001). Plazma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 817–845.
118. Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2016). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chem.*, 192, 842–848.
119. Pataro, G., Bobinaitė, R., Bobinas, Č., Šatkauskas, S., Raudonis, R., Visockis, M., Ferrari, G., Viškelis, P. (2017). Improving the Extraction of Juice and Anthocyanins from Blueberry

- Fruits and Their By-products by Application of Pulsed Electric Fields. *Food Bioprocess Technol.*, 10, 1595–1605.
120. Paula, S., Volkov, A. G., Van Hoek, A. N., Haines, T. H., Deamer, D. W. (1996). Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal*, 70 (1), 339–348.
 121. Pauly, H., Schwan, H. P. (1959). Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. *Z Naturforsch.*, 14B, 125–131.
 122. Pavlin, M., Kanduser, M., Rebersek, M., Pucihar, G., Hart, F. X., Magjarevic, R., Miklavcic, D. (2005). Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension. *Biophys. J.*, 88, 4378–4390.
 123. Pavlin, M., Miklavčič, D. (2003). Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: a theoretical analysis. *Biophys. J.*, 85, 719–729.
 124. Peusch, M., Müller-Seitz, E., Petz, M., Müller, A., Anklam, E. (1997). Extraction of capsaicinoids from chillies (*Capsicum frutescens* L.) and paprika (*Capsicum annuum* L.) using supercritical fluids and organic solvents. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 204 (5), 351–355.
 125. Phimchan, P., Techawongstien, S., Chanthai, S., Bosland, P. W. (2012). Impact of Drought Stress on the Accumulation of Capsaicinoids in Capsicum Cultivars with Different Initial Capsaicinoid Levels. *HortScience*, 47 (9), 1204–1209.
 126. Pierce, W. S., Higinbotham, N. (1970). Compartments and fluxes of K, NA, and CL in avena coleoptile cells. *Plant Physiol.*, 46, 666–673.
 127. Pizzichemi, M. (2007). Application of Pulsed Electric Fields to food treatment. *Nuclear Physics B – Proceedings Supplements*, 172, 314–316.
 128. Pliquett, U. (2017). Biophysics and metrology of electroporation in tissues. In: Miklavčič, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing, Cham, 621–653.
 129. Puc, M., Kotnik, T., Mir, L. M., Miklavcic, D. (2003). Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electroporation. *Bioelectrochemistry*, 60, 1–10.
 130. Pucihar, G., Kotnik, T., Miklavcic, D., Teissié, J. (2008). Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporation cells. *Biophys. J.*, 95, 2837–2848.
 131. Pucihar, G., Kotnik, T., Kanduser, M., Miklavčič, D. (2001). The influence of medium conductivity on electroporation and survival of cells in vitro. *Bioelectrochemistry*, 54, 107–115.
 132. Puértolas, E., Cregeñán, O., Luengo, E., Alvarez, I., Raso, J. (2013). Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chem.*, 136, 1330–1336.

133. Puértolas, E., Saldaña, G., Raso, J. (2016). Pulsed Electric Field Treatment for Fruit and Vegetable Processing. In: Miklavcic, D. (Eds). *Handbook of Electroporation*. Springer, Cham.
134. Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J., Miklavčič, D. (2016). Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 312–321.
135. Raso, J., Heinz, V. (2007). *Pulsed electric fields technology for the food industry*. Springer, New York.
136. Reberšek, M. (2017). Beyond electroporation pulse parameters: from application to evaluation. In: *Handbook of Electroporation*. Springer, Cham.
137. Reddy, J. N. (1984). *An introduction to the finite element method*. McGraw-Hill, New York.
138. Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., Nair, M. G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (23), 9268–9273.
139. Repo, T., Zhang, G., Ryyppö, A., Rikala, R. (2000). The electrical impedance spectroscopy of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) shoots in relation to cold acclimation. *J. Exp. Bot.*, 51, 2095–2107.
140. Reyes-Escogido, M., Gonzalez-Mondragon, E. G., Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16 (12), 1253–1270.
141. Riihinen, K., Jaakola, L., Kärenlampi, S., Hohtola, A. (2008). Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and “northblue” blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem.*, 110, 156–160.
142. Romero, I., Fernandez-Caballero, C., Sanchez-Ballesta, M. T., Escribano, M. I., Merodio, C. (2009). Influence of the stage of ripeness on phenolic metabolism and antioxidant activity in table grapes exposed to different CO₂ treatments. *Postharvest Biol. Technol.*, 54, 118–121.
143. Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography, A* 1012 (2), 119–128.
144. Rubinsky, B. (2007). Irreversible electroporation in medicine. *Technology in Cancer Research and Treatment*. August, vol. 6, No. 4, 255 – 260.
145. Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E. (2013). Increasing the phenolic compound content of grapes

- by preharvest application of abscisic acid and a combination of methyl jasmonate and benzothiadiazole. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 3978–3983.
146. Sabri, N., Pelissier, B., Teissié, J. (1996). Electroporation of intact maize cells induces an oxidative stress. *Eur. J. Biochem.*, 238, 737–743.
147. Saltveit, M. E., Choi, Y.-J., Tomas-Barberan, F. A. (2005). Involvement of components of the phospholipid-signaling pathway in wound-induced phenylpropanoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa*) leaf tissue. *Physiol. Plant.*, 125, 345–355.
148. Sarpras, M., Gaur, R., Sharma, V., Chhapekar, S. S., Das, J., Kumar, A., Yadava, S. K., Nitin, M., Brahma, V., Abraham, S. K., Ramchiary, N. (2016). Comparative Analysis of Fruit Metabolites and Pungency Candidate Genes Expression between Bhut Jolokia and Other Capsicum Species. *Plos One*, 11(12), e0167791.
149. Šatkauskas, S., Ruzgys, P., Venslauskas, M. S. (2012). Towards the mechanisms for efficient gene transfer into cells and tissues by means of cell electroporation. *Expert Opinion on Biology Therapy*, March, vol. 12, no 3, 275–286.
150. Saulis, G., Venslauskas, M. S. (1993). Cell electroporation. Part 2. Experimental measurements of the kinetics of pore formation in human erythrocytes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. Dec., vol. 32, iss. 3, 237–248.
151. Schmeer, M., Seipp, T., Pliquett, U., Kakorin, S., Neumann, E. (2004). Mechanism for the conductivity changes caused by membrane electroporation of CHO cell-pellets. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6, 5564–5574.
152. Schwan, H. P. (1957). Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Advances in Biological and Medical Physics*. Feb., vol. 5, 14–209.
153. Shynkaryk, M. V., Lebovka, N. I., Vorobiev, E. (2008). Pulsed Electric Fields and Temperature Effects on Drying and Rehydration of Red Beetroots. *Drying Technology*, 26 (6), 695–704.
154. Si, W., Man, S. W., Chen, Z.-Y., Chung, H. Y. (2014). Stability of capsaicinoid content at raised temperatures. *Natural Product Communications*, 9 (7). 1934578X1400900.
155. Somsen, D., Capelle, A. (2002). Introduction to production yield analysis—a new tool for improvement of raw material yield. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (4), 136–145.
156. Somsen, D., Capelle, A., Tramper, J. (2004). Manufacturing of par-fried French-fries. *Journal of Food Engineering*, 61 (2), 199–207.
157. Son, R. S., Gowrishankar, T. R., Smith, K. C., Weaver, J. C. (2016). Modeling a conventional electroporation pulse train: decreased pore number, cumulative calcium transport and an example of electrosensitization. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 63, 571–580.

158. Sowers, A. E., Lieber, M. R. (1986). Electropore diameters, lifetimes, numbers, and locations in individual erythrocyte ghosts. *FEBS Lett.*, 205, 179–184.
159. Srinivasan, K. (2016). Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (9), 1488–1500.
160. Stinzing, F. C., Carle, R. (2008a). N-heterocyclic pigments: betalains. In: Socaciu, C. (Eds.). *Food Colorants. Chemical and Functional Properties*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, 87–99.
161. Stinzing, F. C., Carle, R. (2008b). Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications. In: Socaciu, C. (Eds.). *Food Colorants. Chemical and Functional Properties*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca, Raton, FL, 277–299.
162. Stoica, R. M., Moscovici, M., Tomulescu, C., Băbeanu, N. (2016). Extraction and analytical methods of Capsaicinoids – a review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, vol. XX, 93–98.
163. Tabatabaian, M. (2014). *COMSOL for Engineers*. Mercury Learning & Information.
164. Tarek, M. (2005). Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophysical J.*, June, vol. 88, iss. 6, 4045–4053.
165. Teissie, J. (2013). *In Vitro Cell Electroporation. Electroporation – Based Technologies and Treatments*. International Scientific Workshop and Postgraduate Course. Ljubljana, Slovenia. Nov., 33–36.
166. Teissie, J. (2017). Critical electric field and transmembrane voltage for lipid pore formation in experiments. In D. Miklavcic (Ed.), *Handbook of Electroporation*. Cham: Springer International Publishing, 1–19.
167. Teissié, J., Rols, M. P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys. J.*, 65, 409–413.
168. Teissié, J., Tsong, T. Y. (1980). Evidence of voltage-induced channel opening in Na/K ATPase of human erythrocyte membrane. *J. Membr. Biol.* 55, 133–140.
169. The German Federal Ministry of Justice and Customer Protection (1998). Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung – ZZulV).
170. Tiwari, B. K., Cullen, P. J. (2012). Extraction of red beet pigments. In: *Red Beet Biotechnology*. Ed. Neelwarne, B. Boston, MA: Springer US, 373–391.
171. Töpfl, S. (2006). *Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food- and Bioprocessing – Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis*. PhD thesis. Technische Universität Berlin.

172. Tsong, T. Y. (1991). Electroporation of cell membranes. *Biophys J.*, vol. 60, iss. 2, 297–306.
173. Valič, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissié, J., Rols, M. P., Miklavčič, D. (2003). Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur. Biophys. J.*, 32, 519–528.
174. Vasconsuelo, A., Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.*, 172, 861–875.
175. Vorobiev, E., Lebovka, N. I. (2006). Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry*. Ed. Raso, J., Heinz, V. Boston, MA: Springer US, 153–193.
176. Walker, N. A. (1976). Membrane transport: theoretical background. In: Eds. Lüttge, U., Pitman, M. G. *Transport in Plants II*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 36–52.
177. Walsh, B. M., Hoot, S. B. (2001). Phylogenetic Relationships of *Capsicum* (Solanaceae) Using DNA Sequences from Two Noncoding Regions: The Chloroplast *atpB-rbcL* Spacer Region and Nuclear *waxy* Introns. *International Journal of Plant Sciences*, 162 (6), 1409–1418.
178. Wang, H., Longsine-Parker, W., Koo, C., Kim, J., Kim, B. J., Jayaraman, A., Han, A. (2013). Microfluidic electro-sonoporation by simultaneous application of electric field and acoustic field. *17 th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Freiburg, October, 1332–1334.
179. Wang, L.-J., Su, S., Wu, J., Du, H., Li, S.-S., Huo, J.-W., Zhang, Y., Wang, L.-S. (2014). Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity. *Food Chem.*, 160, 357–364.
180. Watkins, C. B. (2017). Postharvest Physiological Disorders of Fresh Crops. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Second edition. Ed. by B. Thomas, B. G. Murray, D. J. Murphy. Academic Press, Oxford, 315–322. ISBN 9780123948083.
181. Wayne, R. (2019). The Vacuole. In: *Plant Cell Biology*. Elsevier, 113–131.
182. Weaver, J. C. (2003). Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales. *IEEE Trans. Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 10, 754–768.
183. Weaver, J., Chizmadzhev, Y. (1996). Theory of electroporation: A review. *Bioelektrochemie und Bioenergetics*. December, vol. 41, iss. 2, 135–160.
184. Wesołowska, A., Jadczyk, D., Grzeszczuk, M. (2011). Chemical composition of the pepper fruit extracts of hot cultivars *Capsicum annum* L. *Acta scientiarum Polonorum, Hortorum cultus*, 1, 171–184.

185. White, P. J. (2017). Ion Transport. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Second edition. Ed. by B. Thomas, B. G. Murray, D. J. Murphy. Academic Press, Oxford, 238–245. ISBN 9780123948083.
186. Wilson, J., Hunt, T. (Eds.) (2014). *Molecular Biology of the Cell*. Sixth ed. The Problems Book. Garland Science: New York and Abingdon, UK. ISBN: 9780815344537.
187. Yarmush, M. L., Golberg, A., Serša, G., Kotnik, T., Miklavčič, D. (2014). Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 16, 295–320.
188. Yuan, L.-J., Qin, Y., Wang, L., Zeng, Y., Chang, H., Wang, J., Wang, B., Wan, J., Chen, S.-H., Zhang, Q.-Y., Zhu, J.-D., Zhou, Y., Mi, M.-T. (2016). Capsaicin-containing chili improved postprandial hyperglycemia, hyperinsulinemia, and fasting lipid disorders in women with gestational diabetes mellitus and lowered the incidence of large-for-gestational-age newborns. *Clinical Nutrition*, 35 (2), 388–393.
189. Zewdie, Y., Bosland, P. W. (2001). Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for *Capsicum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29 (2), 161–169.
190. Zielińska-Przyjemska, M., Olejnik, A., Kostrzewa, A., Łuczak, M., Jagodziński, P. P., Baer-Dubowska, W. (2012). The beetroot component betanin modulates ROS production, DNA damage and apoptosis in human polymorphonuclear neutrophils. *Phytotherapy Research*, 26 (6), 845–85.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Straipsniai recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose ir turinčiuose citavimo indeksą *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėje

1. Pataro, G., Bobinaitė, R., Bobinas, Č., Šatkauskas, S., Raudonis, R., **Visockis, M.**, Ferrari, G., Viškelis, P. (2017). Improving the Extraction of Juice and Anthocyanins from Blueberry Fruits and Their By-products by Application of Pulsed Electric Fields. *Food and Bioprocess Technology*, 10 (9), 1595–1605. DOI: 10.1007/s11947-017-1928-x.

Straipsniai recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose ir be citavimo indekso *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazėje

1. Bobinaitė, R., Pataro, G., **Visockis, M.**, Bobinas, Č., Ferrari, G., Viškelis, P. (2017). Potential application of pulsed electric fields to improve the recovery of bioactive compounds from sour cherries and their by-products. *FOODBALT 2017: 11th Baltic Conference on Food Science and Technology “Food science and technology in a changing world”*. Jelgava, Latvia, 27–28 April, 70–74.

Straipsniai recenzuojamuose periodiniuose mokslo leidiniuose

1. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Šatkauskas, S., Bobinaitė, R. (2016). Matematinio modeliavimo įrankiai elektroporacijos proceso optimizavimui. (Apžvalga). *Sodininkystė ir daržininkystė*, 35 (1–2), 61–74.

DALYVAVIMAS KONFERENCIJOSE

1. **Visockis, M.**, Bobinaitė, R., Šatkauskas, S., Pataro, G., Ferrari, G., Viškelis, P. (2016). The Influence of Pulsed Electric treatments on juice yield and extraction of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus*). *Proceedings of 3rd School on PEF processing of food*. 21–24 March, Dublin, Ireland, 188.

2. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Viškelis, P., Šatkauskas, S., Markevičius, V. (2016). Optimisation of 30 kV power pulsed electric field system. *1st International Conference on the Scientific Actualities and Innovations in Horticulture 2016*. Program and Abstracts, Kaunas, June 2–3.

3. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šatkauskas, S. (2016). Power Pulsed Electric Field Modulator with Capability of Pulse Shape Modifications. *EAPPC with BEAMS and MEGAGAUSS, Proceedings*. 18–22 September, Caiscais and Estoril Coast – Portugal, 282.
4. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Markevičius, V., Šatkauskas, S. (2016). The influence of self-learning mathematical control algorithm on the PEF modulator output characteristics. *Proceedings of the Electroporation – based Technologies and Treatments*. November 13–19, Ljubljana, Slovenia, 123.
5. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Šatkauskas, S., Narbutas, S. (2017). Comparison of apple (*Malus domestica*) tissue permeabilization by means of both pulsed electric field generated by monopolar or bipolar pulses. *4th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology*. May 9–12, Vienna, Austria.
6. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Markevičius, V., Šatkauskas, S. (2017). 1.2 kV unipolar/bipolar electroporation device designed to improve electropermeabilization. *2nd World Congress on Electroporation*. Program and Book of Abstracts. September 24–28, Norfolk, USA, 194.
7. Bobinaite, R., Pataro, G., **Visockis, M.**, Bobinas, C., Ferrari, G., Viskelis, P. (2017). Potential application of pulsed electric fields to improve the recovery of bioactive compounds from sour cherries and their by-products. *11th Baltic Conference on Food Science and Technology “Food science and technology in a changing world” FOODBALT 2017*. Jelgava, April 27–28.
8. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Ruzgys, P., Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šatkauskas, S. (2018). Evaluation of the industrial relevance of Pulsed Electric Field on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L) tubers. *5th PEF School*. 14–18 May 2018, Osnabruck – Quakenbruck, Germany.
9. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Ruzgys, P., Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šatkauskas, S. (2019). The dependence of the PEF treatment time and the efficacy of the betalains extraction from the red beetroot shreds with respect to the electrical energy input. *6th PEF School, Applications in Food and Biotechnology*. 2–8 June, Cesena, Italy.
10. **Visockis, M.**, Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Ruzgys, P., Markevičius, V., Šatkauskas, S., Viškelis, P. (2019). The comparison of cell disintegration index and the conductivity of the extract in terms of the PEF-assisted aqueous extraction of betalains. *3rd World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, Food and Environmental Technologies*. Program and Book of Abstracts. September 2–7, Toulouse, France, 183.



Improving the Extraction of Juice and Anthocyanins from Blueberry Fruits and Their By-products by Application of Pulsed Electric Fields

Gianpiero Pataro¹ · Ramunė Bobinaitė² · Česlovas Bobinas² · Saulius Šatkauskas³ · Raimondas Raudonis⁴ · Mindaugas Visockis² · Giovanna Ferrari^{1,5} · Pranas Viškelis²

Received: 4 January 2017 / Accepted: 5 May 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Pulsed electric field (PEF) treatments (1–10 kJ/kg at 3 kV/cm) were applied before pressing of blueberry fruits to improve the yield and quality of expressed juice as well as the recovery of anthocyanins from blueberry by-products (press cake) via solid–liquid extraction. A PEF pre-treatment at 1 kJ/kg was sufficient to significantly increase the juice yield (by 32%) with respect to the untreated sample. Higher energy input (10 kJ/kg) was most favorable for the largest increment of anthocyanin content (55%) and antioxidant capacity (36 and 41%, determined by ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) assay, respectively) in juice. Extracts obtained from the press cake of PEF-treated blueberries at 10 kJ/kg possessed an anthocyanin content (75%) and antioxidant capacity (71 and 109%, determined by FRAP and DPPH assay, respectively) higher than that of the extracts obtained from non-treated berries press cake. HPLC analyses revealed the major classes of the detected anthocyanins as glycosides of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin, and no

significant degradation of individual anthocyanins due to PEF application was observed. The present PEF pre-treatment could be a promising approach to facilitate efficient extraction of juice and antioxidants especially anthocyanins from blueberry and their by-products.

Keywords PEF · Extraction · *Vaccinium myrtillus* · Juice · Press cake · HPLC · Anthocyanins · Antioxidant activity

Introduction

The European blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.), also known as bilberry, is one of the natural sources most abundant in anthocyanins (Može et al. 2011; Riihinen et al. 2008). These polyphenolic compounds are accumulated almost exclusively in the skins of the berry fruits (Lee and Wrolstad 2004) during the ripening period (Foster and Blumenthal 2012). Fifteen different anthocyanins characterize the fruits of *V. myrtillus*, including delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin, linked via glycoside bonds to glucose, arabinose, or galactose (Lätti et al. 2008). Besides being responsible for the bluish red color of blueberry fruits, these compounds with their high antioxidant activity are believed to be associated with many health benefits for human, including anticarcinogenic, antimicrobial, antiinflammatory, and hypoglycemic effects (Chu et al. 2011).

Commercial blueberries are cultivated mainly in the USA, Canada, and Europe. In 2012, the production of *Vaccinium* species in Europe was 19,500 t, being Poland the main producer (10,000 t), followed by Eastern (Lithuania, Russia, Romania, Ukraine) and Scandinavian (Sweden, Finland, Norway) countries (6000 t) (Brazelton 2012).

A substantial amount of blueberry fruits is processed into juices (Lee and Wrolstad 2004), which are increasingly

✉ Gianpiero Pataro
gpataro@unisa.it

¹ Department of Industrial Engineering, University of Salerno, via Giovanni Paolo II 132, 84084 Fisciano, SA, Italy

² Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kaunas st. 30, Babtai, LT-54333 Kaunas, Lithuania

³ Department of Biology, Vytautas Magnus University, K. Donelaičio st. 58, LT-44248 Kaunas, Lithuania

⁴ Department of Pharmacognosy, Medical Academy of The Lithuanian University of Health Sciences, Mickėvičiaus st. 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania

⁵ ProdAl Scarl—University of Salerno, via Ponte don Melillo, 84084 Fisciano, SA, Italy

promoted and consumed in recent years, due to their reported nutritional and health benefits (Barba et al. 2012). The industrial transformation of these fruits unavoidably generates large amount of blueberry wastes and by-products (press cake residues), which mainly consist of skins and seeds. Because blueberry press cake still retain high amounts of anthocyanins and other phenolic antioxidants (Bobinaitė et al. 2015a; Laaksonen et al. 2010; Lee and Wroldstad 2004), it represents a potential source for natural dyes and nutraceuticals (Lee and Wroldstad 2004). To this regard, it was found that anthocyanins are mainly present (over 80%) in the press cake residue of *V. myrtillus* fruits left after juice expression (Laaksonen et al. 2010). In addition, Dinkova et al. (2012) also reported that *V. myrtillus* fruit juice had 3.2 times lower content of anthocyanins compared to the press cake.

Therefore, there is a growing interest in developing of novel-processing methods of berry fruits able to improve the efficiency of juice expression and, at the same time, fostering the exploitation of berry wastes for producing anthocyanin-rich extracts to be used in foods (as natural colorant) but mostly as nutraceutical compounds in herbal medicines industry (Govindaraghavan 2014; Lee and Wroldstad 2004).

Pulsed electric field (PEF)-assisted mechanical pressing or extraction of juice and bioactive compounds from plant food materials and their wastes or by-products has been shown to be rather promising (Barba et al. 2015c; Donsi et al. 2010b). The effect of PEF pre-treatment of plant tissues is the permeabilization of the cell membranes and the temporary or permanent loss of their semipermeability, which can facilitate the release of juice as well as the selective recovery of intracellular compounds from the inner parts of the cells (Barba et al. 2015c).

For example, PEF pre-treatments were successfully applied to improve the yield and quality of juices expressed from fresh apples, carrots, grapes and blueberries (Barba et al. 2015c; Bobinaitė et al. 2015a; Carbonell-Capella et al. 2016; Donsi et al. 2010a; Grimi et al. 2011; Jaeger et al. 2012). Furthermore, the effectiveness of PEF treatment was demonstrated for the recovery of natural pigments and antioxidant compounds from various food-processing by-products such as grape pomace (Barba et al. 2015b; Corrales et al. 2008), red prickly pear peels (Koubaa et al. 2016), orange peels (Luengo et al. 2013), and mango peels (Parniakov et al. 2016), among others.

However, to our knowledge, only in the work of Bobinaitė et al. (2015a), it was proved that PEF permeabilization of cell membranes of *V. myrtillus* fruits before pressing could be exploited not only for improving the yield and quality of the expressed juice but also for facilitating the subsequent recovery of bioactive compounds (phenolics and anthocyanins) from berry by-products (press cake residues) (Bobinaitė et al. 2015a). However, in this preliminary work, only the effect of electric field strength (1–5 kV/cm) was evaluated, whereas the energy input for all PEF treatments was kept constant (10 kJ/kg). Moreover, no detailed chemical analyses

were performed to study the effects of PEF on the extraction of individual bioactive compounds, such as anthocyanins.

Therefore, the aim of the present work was to investigate the effects of the total specific energy input applied at constant field strength (3 kV/cm) during PEF pre-treatment of blueberry fruits on yield and quality of the expressed juice as well as on the recovery of bioactive compounds from berry press cake. Particularly, the effect of PEF on the total content and composition of anthocyanins of both juice and extracts from press cake was evaluated performing HPLC measurements and determining the antioxidant activity.

Materials and Methods

Chemicals and Raw Material

HPLC grade methanol and acetonitrile as well as concentrated hydrochloric acid, iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2,4,6-tripyridyl-*s*-sriazine (TPTZ), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Cyanidin 3-galactoside was purchased from TransMIT (Giessen, Germany). Analytical grade formic acid was purchased from Riedel-deHaën (Seelze, Germany). 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). Ethanol (70% grade) and sodium acetate were supplied from Fluka (Buchs, Switzerland).

Wild blueberries (*V. myrtillus* L.) were purchased from a local farmer's market in September 2014 (late-season berry crop, origin Lithuania). Berries were sold packed into punnets made of transparent polyethylene terephthalate. The soluble solid content of fresh blueberry fruits, determined with an Abbe digital refractometer model DR-A1 (ATAGO Co., Ltd., USA) at 25 °C, was 12.6 ± 0.2 Brix°; the pH, determined using a Lab-TEST II pH Meter (International PBI, Milan, Italy), was 2.96 ± 0.02 ; and the fruit firmness, measured using a TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK), with 1-mm-diameter cylinder probe, was 28.5 ± 1.8 N/cm². Blueberry fruits were stored in refrigerated conditions (4 ± 1 °C) until use (for up to 5 days).

PEF Pre-treatment of Blueberries, Juice Expression, and Extraction of Anthocyanins from Press Cake

Figure 1 shows a simplified scheme of the experimental procedure used in this work.

PEF pre-treatments of blueberry fruits before pressing were carried out using a laboratory scale batch system previously described in detail by Bobinaitė et al. (2015a). Briefly, the system consisted of a high-voltage pulsed power (20 kV–500 A) generator (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala,

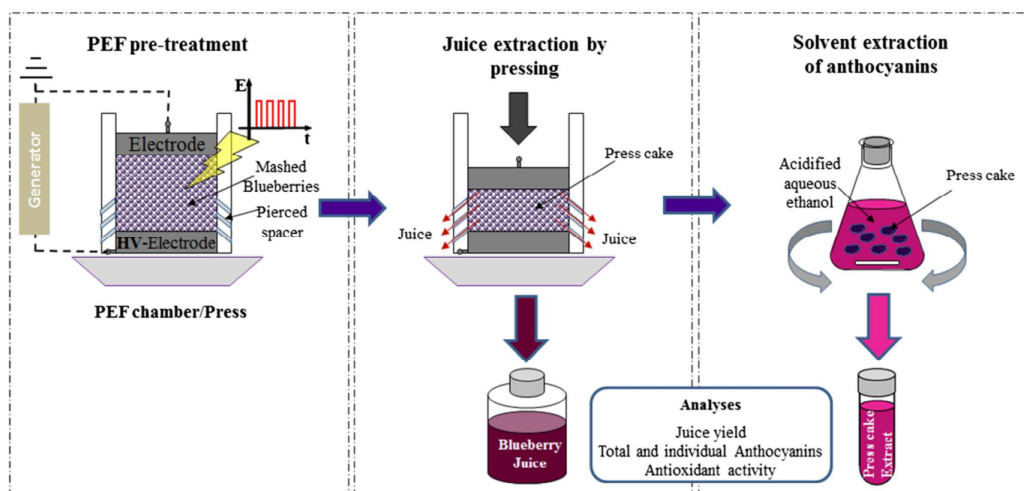


Fig. 1 Schematic representation of the experimental procedure including PEF pre-treatment, pressing, and solvent extraction experiments

Sweden) able to generate monopolar square wave pulses (3–25 μ s, 1–450 Hz). The generator was connected by a high voltage cable to a batch cylindrical treatment chamber (3.4 cm in diameter, electrode gap up to 5 cm) specifically designed to be used also as a mechanical press (Bobinaitė et al. 2015a). The maximum electric field intensity (E , in kV/cm) and total specific energy input (W_T , in kJ/kg) were calculated as reported in Bobinaitė et al. (2015a).

During each experiment, 10 g of blueberry fruits, cut in two half with a knife, was loaded in the treatment chamber and subjected to PEF pre-treatment carried out at constant field strength (3 kV/cm). The total specific energy inputs were changed (1, 5, and 10 kJ/kg) by changing the number of applied pulses at constant frequency (10 Hz) and pulse width (20 μ s). PEF pre-treatment parameters were chosen according to the results of the measurements of cell disintegration indexes of blueberry fruits reported in a previous work (Bobinaitė et al. 2015a).

Blueberry samples, prior to PEF treatments, were kept at ambient conditions and their temperature was measured with a 0.5-mm K-type thermocouple placed in the sample. The initial temperature of the samples was 20 ± 1 °C. The temperature increase of the samples due to the PEF treatment never exceeded 23 ± 1 °C.

As shown in Fig. 1, immediately after PEF pre-treatment, samples were pressed in the PEF-processing chamber, on which a constant pressure of 132 kPa for 8 min was applied loading a constant weight on the upper electrode. The liquid expressed during each experiment was centrifuged (ALC PK 130R, DJB Labcare Ltd., Newport, UK) at 5000 rpm and 5 °C for 10 min in order to obtain a clear juice. The latter was weighed to evaluate the juice yield, which was expressed as grams of juice per 100 g of berries fresh weight (fw).

The press cake obtained after the juice expression was partitioned, then loaded in plastic containers (with a volume of 50 mL), weighed, and, finally the acidified aqueous ethanol solvent (50% ethanol; 0.5% HCl, v/v) was added, with a ratio solvent/press cake of 6:1 (mL/g). The containers were sealed, wrapped in aluminum foils, and introduced in an orbital incubator S150 (PBI international, Milan, Italy) and the extraction started. The process was carried out for 24 h at ambient temperature with constant shaking at 150 rpm. The extracts, after filtration with filter paper (Whatman no. 1) in a Buchner funnel, were stored at 4 °C and analyzed in the same day.

Untreated juice and press cake extracts (control samples) were obtained utilizing the same protocols described in the previous paragraphs without applying PEF pre-treatment.

Determination of Anthocyanins

Sample Preparation Samples of either blueberry juice or press cake extracts were diluted 1:10 v/v with a solution consisting of 90% solvent A (10% aqueous formic acid) and 10% solvent B (acetonitrile/methanol (ACN–MeOH), 85:15 v/v). Prior to HPLC analysis, juices and diluted extracts were filtered through regenerated cellulose, syringe-tip filters (0.45 μ m, 13 mm).

HPLC Analysis Anthocyanins were separated using Waters 2695 series HPLC system, equipped with the Waters 2998 photo diode array detector (DAD) (Waters Corporation, USA). Analytical separation was carried out using an ACE Excel 5 SuperC18 column (5 μ m; 125 \times 4.6 mm; Aberdeen, Scotland) with the modified procedure of Wang et al. (2014). The temperature of the column oven was set at 25 °C. The

mobile phase consisted of aqueous 10% formic acid (eluent A) and ACN–MeOH (85:15, v/v) (eluent B). The gradient program was as follows: 0–30 min from 5 to 12% eluent B and 30–50 min from 12 to 25% eluent B. The injection volume was 10 μ L. The flow rate of the mobile phase was 1.0 mL/min. Anthocyanins were detected at the wavelength of 520 nm. DAD data were recorded from 200 to 600 nm.

Identification and Quantification Anthocyanins in juice and extracts were identified according to the HPLC retention times (RT) and UV absorbance maximum, in comparison with commercial standard or with literature data (Lätti et al. 2008; Wang et al. 2014). Commercial standard (cyanidin 3-galactoside) was dissolved in solvent B (10%) and solvent A (90%) to generate seven-point external standard calibration curve (concentration range was from 1 to 100 mg/L), whose linearity was acceptable ($R^2 = 0.996$).

The total content of anthocyanins in the juice and extracts was determined as the sum of the amount of the individually quantified compounds and expressed as equivalents of cyanidin 3-galactoside (CGE) per liter of juice or per 100 g of fw of berry press cake.

Determination of Total Antioxidant Activity

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH (free radical scavenging activity) assays were used to determine the total antioxidant activity of juice and press cake extracts.

FRAP assay was performed according to the method reported by Benzie and Strain (1996) with some modifications, as thoroughly described elsewhere (Bobinaitė et al. 2015a).

DPPH assay was based on the method of Brand-Williams et al. (1995) with some modifications, as thoroughly described elsewhere (Bobinaitė et al. 2015b).

Trolox was used as the standard for the calibration curve in both assays, and the antioxidant capacity was expressed as micromoles of Trolox equivalents (μ mol TE) per milliliter of juice or gram of fw berry press cake.

Statistical Analysis

For each set of processing conditions, the experiments were performed in triplicate and each collected sample was

analyzed in duplicate. The mean values and standard deviations (SD) of experimental data were calculated. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the means were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), performed with SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA) statistical package, and the Tukey's test.

Results and Discussion

Effects of PEF Pre-treatment on Blueberry Juice Yield

The data showing the effects of PEF pre-treatments at constant electric field strength (3 kV/cm) but at different energy input (1–10 kJ/kg) on blueberry juice yield are reported in Table 1. The juice yield of PEF pre-treated berries was, on average, 32% higher compared with the untreated sample. However, with increasing the energy input during PEF pre-treatments, no statistically significant differences on juice yields were detected, suggesting that the lowest value of 1 kJ/kg was sufficient to increase the juice yield with respect to the untreated samples, while higher energy input (5 and 10 kJ/kg) did not cause any further improvement. This conclusion seems to be in contrast with the results of the measurements of cell disintegration index (Z_p) reported in the previous work (Bobinaitė et al. 2015a). Indeed, it was found that at fixed electric field strength of 3 kV/cm, when the energy input during PEF treatment was increased from 1 to 5 and 10 kJ/kg, the Z_p value of blueberry tissues was 0.73, 0.77, and 0.80, respectively, with significant ($p \leq 0.05$) differences being detected only between 1 and 10 kJ/kg treatments (Bobinaitė et al. 2015a). In agreement with the findings of this work, Jaeger et al. (2012) also noted that in some cases, the level of cell disintegration achieved with PEF treatment of relatively low energy input (2 kJ/kg) resulted in a maximum improvement of apple and carrot juice release and that a further increase of the energy input (12 kJ/kg) did not result in any increase of the juice yield. This behavior may be explained considering that the overall juice yield depends not only on the degree of permeability of cell membrane of the plant tissue, which affects the mass transfer of juice from the inner part of the cells, but also on the drainage properties of the press cake, which affect the juice transfer through the fruit mash. The latter is determined

Table 1 Blueberry juice yield, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and DPPH radical scavenging capacity (DPPH) of juice and press cake extracts of untreated (0 kJ/kg) and PEF-treated (3 kV/cm) blueberry fruits at different energy input

W_T (kJ/kg)	Juice yield (g/100 g fw berry)	DPPH (μ mol TE/mL juice)	FRAP	DPPH (μ mol TE/g press cake)	FRAP
0	42.7 \pm 1.00 a	2.9 \pm 0.15 a	4.8 \pm 0.28 a	16.4 \pm 2.20 a	39.8 \pm 1.13 a
1	55.9 \pm 1.77 b	3.5 \pm 0.03 b	5.5 \pm 0.38 b	29.0 \pm 0.30 b	55.9 \pm 0.38 b
5	57.4 \pm 1.42 b	3.7 \pm 0.10 bc	6.2 \pm 0.38 c	32.6 \pm 1.19 bc	61.4 \pm 0.68 c
10	56.3 \pm 1.57 b	4.1 \pm 0.31 c	6.5 \pm 0.58 c	34.2 \pm 0.93 c	68.0 \pm 1.48 d

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between the samples ($p \leq 0.05$)

by different factors including the degree of ripeness and texture of the fruits, the particle size of the mash, and the type of pressing device (Jaeger et al. 2012). Moreover, high-intensity PEF treatments may also cause excessive softening of the plant tissues and, thus, the compaction and closing of the capillaries in the press cake, which may decline its drainage properties (Jaeger et al. 2012). Therefore, it is likely that the cell disintegration degree ($Z_p = 0.73$), achieved for blueberry tissue with the lower energy input (1 kJ/kg) as well as the corresponding mash particle softening due to the electroporation, resulted in the most favorable conditions for facilitating the juice release from blueberry tissue.

In the previously published research (Bobinaitė et al. 2015a), when the energy input was kept constant (10 kJ/kg), the juice yield of blueberries was shown to be dependent on the applied electric field strength. The highest increase in juice yield was detected for samples PEF pre-treated at 1 and 3 kV/cm, whereas a further increase of field strength up to 5 kV/cm resulted in the lowest increase in juice yield with respect to the

untreated sample. Hence, summarizing the results of both studies it may be concluded that, for the intensification of the juice yield from blueberries, PEF pre-treatments at field strength in the range 1–3 kV/cm and total specific energy input of 1 kJ/kg appear to be sufficient to maximize the juice release.

Effects of PEF Pre-treatment on the Content and Composition of Anthocyanins in Blueberry Juice

In Fig. 2, the HPLC anthocyanin profiles of the juices obtained after pressing of untreated and PEF-treated blueberry fruits at different energy input are compared, while the quantification of individual and total anthocyanins content (TAC) is reported Table 2.

Regardless the application of PEF pre-treatment, 15 individual anthocyanins were identified. Similar anthocyanin profiles were previously detected by Laaksonen et al. (2010) in fruits of *V. myrtillus*. They included galactosides, glucosides,

Fig. 2 HPLC–DAD profiles of anthocyanins in juices of **a** untreated, and PEF pre-treated (3 kV/cm) blueberry fruits at **b** 1 kJ/kg, **c** 5 kJ/kg, and **d** 10 kJ/kg. Numbers of peaks refer to Table 2

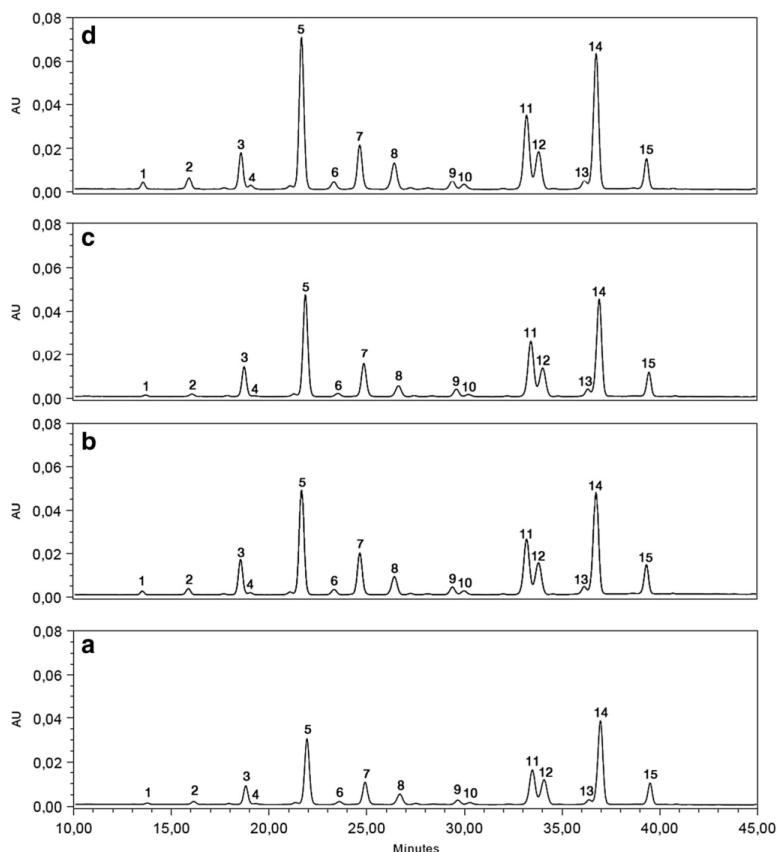


Table 2 Concentrations of individual and total anthocyanins content (TAC) of blueberry juice obtained after pressing of untreated (0 kJ/kg) and PEF-treated berries

Peak no.	Anthocyanin	RT (min)	0 kJ/kg		1 kJ/kg		5 kJ/kg		10 kJ/kg	
			mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
1	Delphinidin 3-galactoside	13.7	1.9 a	0.9	1.7 a	0.1	2.4 a	1.3	3.5 a	1.2
2	Delphinidin 3-glucoside	16.1	3.1 a	1.6	2.6 a	0.3	3.5 a	2.0	4.1 a	0.8
3	Cyanidin 3-galactoside	18.7	10.6 a	3.1	13.1 a	0.6	14.1 a	3.1	20.6 a	8.3
4	Delphinidin 3-arabinoside	19.2	1.6 a	0.6	1.4 a	0.1	2.0 a	0.9	2.3 a	0.3
5	Cyanidin 3-glucoside	21.9	31.1 a	5.7	39.6 ab	3.0	43.2 ab	5.0	51.9 b	3.9
6	Petunidin 3-galactoside	23.5	2.7 a	0.7	3.0 a	0.2	3.3 a	1.3	4.3 a	0.8
7	Cyanidin 3-arabinoside	24.8	12.8 a	3.1	16.1 a	0.9	17.0 a	3.7	21.8 a	5.8
8	Petunidin 3-glucoside	26.6	7.5 a	2.3	8.2 a	0.4	9.1 a	3.6	11.2 a	1.2
9	Peonidin 3-galactoside	29.5	3.2 a	0.7	3.8 a	0.2	4.2 a	0.5	5.4 a	1.3
10	Petunidin 3-arabinoside	30.2	2.2 a	0.6	2.4 a	0.1	2.5 a	0.9	3.2 a	0.5
11	Peonidin 3-glucoside	33.4	19.8 a	3.4	25.0 ab	0.1	27.0 bc	1.6	32.4 c	1.5
12	Malvidin 3-galactoside	34.0	13.5 a	1.2	16.2 ab	1.0	16.5 ab	2.6	18.5 b	0.5
13	Peonidin 3-arabinoside	36.3	2.8 a	0.3	3.4 ab	0.1	3.7 b	0.3	4.2 c	0.4
14	Malvidin 3-glucoside	36.9	36.6 a	2.8	44.6 ab	0.7	45.3 ab	6.1	50.3 b	4.6
15	Malvidin 3-arabinoside	39.5	8.9 a	0.9	10.6 a	0.2	10.5 a	1.8	11.2 a	0.3
	TAC		158.2 a	26.4	191.6 ab	1.7	204.2 ab	34.6	244.8 b	13.3

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) in milligrams per liter of juice. PEF treatments were carried out at fixed field strength ($E = 3$ kV/cm) and different energy input. Different lowercase letters in the same line indicate significant differences between the samples ($p \leq 0.05$)

and arabinosides of five anthocyanidins, such as delphinidin (Dp), cyanidin (Cy), petunidin (Pt), peonidin (Pn), and malvidin (Mv).

Among the anthocyanidin types detected in the juice obtained from untreated samples, Mv (37.3%) and Cy (34.4%) were the most abundant, whereas Pn (16.3%), Pt (7.8%), and Dp (4.2%) were present in lower amount. Glucose was the main sugar linked with anthocyanidins, with Mv-3-glucoside and Cy-3-glucoside being the predominant compounds. Moreover, the average anthocyanidin galactose and arabinose content in the juice were, respectively, 3.1 and 3.5 times lower than the anthocyanidin glucose content (Table 2).

As shown in Fig. 2, the juices obtained from untreated and PEF-treated berries presented similar anthocyanin profiles, confirming that no degradation occurred due to the application of PEF pre-treatments. Similar results were observed by López et al. (2009) when comparing the anthocyanin profile of a control wine with that of a wine obtained from PEF treated grapes.

Interestingly, as shown in Table 2, the permeabilization of the cell membranes of blueberry fruits, upon PEF treatment, selectively affected the extraction process of anthocyanin compounds. In particular, PEF application at different energy input significantly ($p \leq 0.05$) enhanced the release of Mv-3-glucoside, Cy-3-glucoside, Pn-3-glucoside, Mv-3-galactoside, and Pn-3-arabinoside into the juice, whereas the increase of the other anthocyanins was not statistically significant.

These results are in agreement with the studies reported by Puertolas et al. (2013), who observed that, among the anthocyanins monoglucosides detected by HPLC analyses, the content of Mv-3-glucoside, Pt-3-glucoside, and Cy-3-glucoside were significantly higher in wine obtained after PEF treatment of grape pomace.

The total anthocyanins content (TAC) in the blueberry juice increased by 21, 29, and 55%, as compared with the untreated sample, upon the application of PEF pre-treatment at 1, 5, and 10 kJ/kg, respectively (Table 2). However, a significant ($p \leq 0.05$) increase in TAC was observed only for the PEF pre-treatment at the highest energy input of 10 kJ/kg. These results are in agreement with previous studies (Donsi et al. 2010a; Puertolas et al. 2013) in which an improved extraction of intracellular pigments from wine grapes using PEF was described. Moreover, it is worth noting that, in the study of Bobinaité et al. (2015a), PEF pre-treatment at constant energy input of 10 kJ/kg and field strength of 1, 3, and 5 kV/cm significantly ($p \leq 0.05$) increased the TAC of blueberry juice by 60, 78, and 44%, respectively, as compared with the untreated samples. However, no significant difference was detected between the TAC of the PEF treated samples (Bobinaité et al. 2015a). Thus, from the results of the two studies, it appears that electric field strength in the range 1–3 kV/cm and energy input of 10 kJ/kg are the most favorable conditions to reach the maximum extraction yield of anthocyanins into blueberry juice.

Effects of PEF Pre-treatment on the Content and Composition of Anthocyanins in Blueberry Press Cake Extracts

Using HPLC analyses, 15 peaks corresponding to anthocyanin compounds were identified and quantified in the extracts obtained from the press cakes of untreated and PEF-treated blueberry fruits, as reported in Fig. 3 and Table 3.

In particular, in press cake extracts of untreated samples, Cy (34.2%) and Dp (30.1%) were the predominant anthocyanidins, while Pt (13.9%), Mv (12.8%), and Pn (9.0%) were detected in minor amount. Moreover, glucose and galactose were the main sugars linked with anthocyanidins, with Cy-3-galactoside being the most abundant anthocyanin compounds, followed by Cy-3-glucoside, Dp-3-galactoside, and Dp-3-glucoside. It is worth noting that the abundance of Dp glycosides in the press cake extracts might be of particular importance, as it has been demonstrated that Dp and its monoglucoside possessed the highest radical

scavenging activity among the tested anthocyanidins and anthocyanins (Kähkönen and Heinonen 2003).

The application of a PEF pre-treatment to berry fruits before pressing did not affect the number and type of anthocyanins detected in the press cake extracts. However, significantly higher amounts of all individual anthocyanins were extracted from the press cakes of PEF pre-treated berries at different energy input, compared with the untreated samples (Table 3). Moreover, the proportion of the different anthocyanins extracted, based on anthocyanidin type, was affected by the PEF pre-treatment process (Table 3). As an example, at the highest energy input investigated, the concentration of delphinidin, cyaniding, petunidin, peonidin, and malvidin was 82.4, 76.9, 74, 63.6, and 62.0% higher than those detected in the extracts obtained from non-treated berries.

As already discussed in the previous section, this effect may be attributed to the ability of PEF pre-treatment to selectively induce the extraction of specific compounds. In fact, it

Fig. 3 HPLC–DAD profiles of anthocyanins in the extracts from press cakes obtained after pressing of **a** untreated and PEF-treated (3 kV/cm) blueberry fruits at **b** 1 kJ/kg, **c** 5 kJ/kg, and **d** 10 kJ/kg. Numbers of peaks refer to Table 3

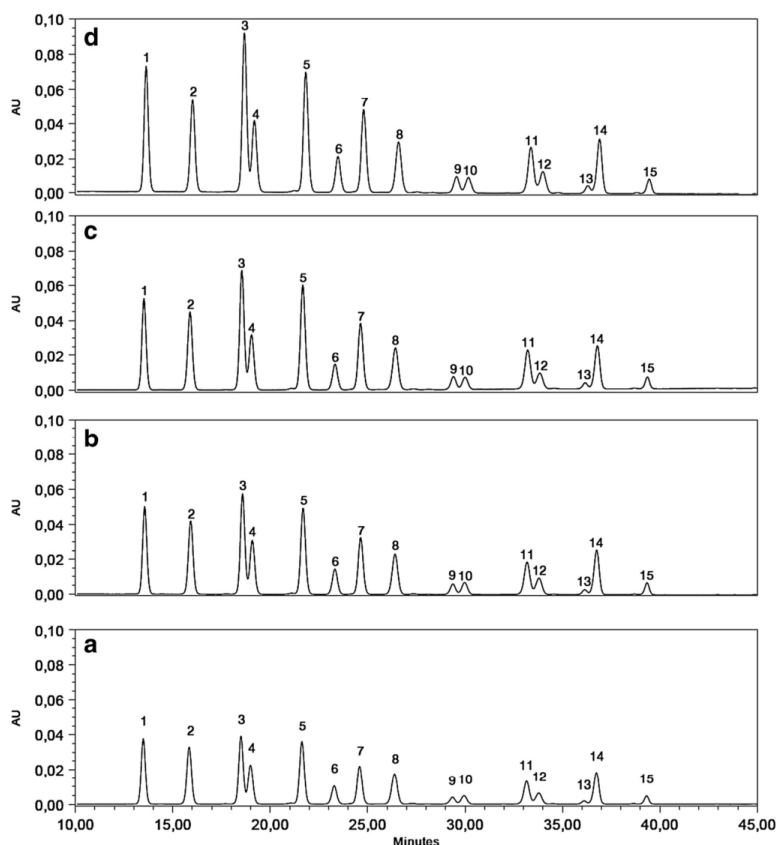


Table 3 Concentrations of individual and total anthocyanins content (TAC) of extracts from blueberry press cake obtained after pressing of untreated (0 kJ/kg) and PEF-treated berries

Peak no.	Anthocyanin	RT (min)	0 kJ/kg		1 kJ/kg		5 kJ/kg		10 kJ/kg	
			mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
1	Delphinidin 3-galactoside	13.7	104.0 a	3.9	138.9 b	9.0	150.2 b	1.0	185.2 c	3.5
2	Delphinidin 3-glucoside	16.1	95.2 a	8.8	128.5 b	9.4	141.8 b	1.7	185.9 c	7.0
3	Cyanidin 3-galactoside	18.7	121.4 a	8.9	165.8 b	14.9	201.1 c	12.2	207.3 c	7.1
4	Delphinidin 3-arabinoside	19.2	72.0 a	3.3	98.8 b	6.1	105.6 b	0.6	123.5 c	3.7
5	Cyanidin 3-glucoside	21.9	112.2 a	11.9	156.4 b	9.0	188.7 bc	11.7	209.2 c	15.9
6	Petunidin 3-galactoside	23.5	38.8 a	0.5	52.3 b	2.0	55.9 b	3.3	64.9 c	1.3
7	Cyanidin 3-arabinoside	24.8	74.4 a	5.4	107.2 b	7.2	119.4 b	16.1	125.7 b	5.1
8	Petunidin 3-glucoside	26.6	64.7 a	3.9	88.3 b	4.4	94.9 b	0.8	119.8 c	5.4
9	Peonidin 3-galactoside	29.5	18.4 a	2.1	23.0 b	2.2	29.4 c	0.2	28.2 c	1.5
10	Petunidin 3-arabinoside	30.2	21.3 a	0.2	28.2 b	1.7	29.6 b	0.1	32.5 c	0.8
11	Peonidin 3-glucoside	33.4	54.1 a	7.6	71.6 b	5.5	89.8 c	0.0	92.2 c	8.8
12	Malvidin 3-galactoside	34.0	31.0 a	1.9	40.6 b	1.2	41.8 b	2.8	47.3 c	2.1
13	Peonidin 3-arabinoside	36.3	8.9 a	0.5	10.9 b	1.3	13.6 c	0.6	12.8 bc	0.3
14	Malvidin 3-glucoside	36.9	66.8 a	2.6	86.9 b	7.9	94.3 b	7.0	114.4 c	8.8
15	Malvidin 3-arabinoside	39.5	17.6 a	0.5	23.7 b	0.9	24.0 b	0.7	25.2 b	0.9
	TAC		900.7 a	43.4	1221.2 b	82.5	1379.9 bc	27.3	1574.1 c	72.1

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) in mg/100 g of press cake. PEF treatment was carried out fixed field strength of 3 kV/cm and different energy input. Different letters in the same line indicate significant differences between the samples ($p \leq 0.05$)

has been reported that the specific group of polyphenols, their relative location in the plant tissue, and their bounding capacity to the plant matrix, and their chemical structure and stability during processing at different conditions (Barba et al. 2015a; Corrales et al. 2008) might be crucial in obtaining extracts with specific biochemical profiles.

It has been reported that when studying the extraction of individual anthocyanins monoglucosides from grape by-products (Corrales et al. 2008), it was found that PEF remarkably enhanced the extraction of anthocyanin monoglucosides compared to acylated glucosides. Similarly, Barba et al. (2015b) observed that PEF pre-treatment was more effective for the recovery of anthocyanins rather than other phenolic compounds from grape pomace during the subsequent liquid-to-solid diffusion step. Moreover, among anthocyanins, the authors also found that PEF remarkably enhanced the extraction of Mv-3-*O*-glucoside compared to the amount of other individual anthocyanins.

On the other hand, it has been also observed that high amounts of electrical energy delivered during PEF treatment may cause deterioration and degradation of valuable compounds (Kahmič-Kalamiza et al. 2014). However, in agreement with the observations reported by other authors (Luengo et al. 2013; López et al. 2009), the results of HPLC analyses carried out in this study indicated that PEF pre-treatment kept the original HPLC profile of anthocyanins detected in control press cake extracts, thus demonstrating that PEF pre-treatment

did not induced any degradation/modification of individual anthocyanins in the samples (Fig. 3).

Data reported in Table 3 show that, regardless the application of PEF treatments preceding juice expression, blueberry press cakes still retained high amount of anthocyanins. This is in agreement with previously reported findings for *V. myrtillus* berry by-products (Laaksonen et al. 2010).

PEF pre-treatment of berry fruits (1–10 kJ/kg) remarkably enhanced the TAC in press cake extracts (by 36–75%), as compared with the control extraction, even though significant differences ($p \leq 0.05$) were detected only when the energy input was increased from 1 to 10 kJ/kg. It is likely that the electroporation effect induced before juice expression in the fresh berry tissues, particularly on fruit skins, was positively affecting also the subsequent extraction process applied to the press cake residue, facilitating the release of intracellular pigments (Bobinaitė et al. 2015a). In agreement with these findings, results of our previously published study (Bobinaitė et al. 2015a) showed that the amounts of TAC extracted from the press cakes of PEF pre-treated berries at constant energy input (10 kJ/kg) and field strengths of 1, 3, and 5 kV/cm significantly increased by 50, 72, and 111%, respectively, compared with the control sample. Therefore, it may be concluded that the recovery of anthocyanins from press cake is enhanced with increasing both electric field strength (from 1 to 5 kV/cm) and energy input (from 1 to 10 kJ/kg).

PEF permeabilization of plant membranes was shown to be effective for the improvement of anthocyanin extractability from food by-products such as grape pomace (Corrales et al. 2008, Barba et al. 2015b) and red prickly pear peels (Koubaa et al. 2016).

Finally, comparing the results of Figs. 2 and 3, it can be seen that the anthocyanin profiles of the press cake extracts and of blueberry juice were similar, even though it can be clearly noted that the amount of the different anthocyanidins and the relative content of individual anthocyanins in juice and extract were different. These differences could be attributed to the concomitant effect of several factors, including the different types and contents of individual anthocyanins in the skin and pulp of berry fruits, as well as to the relative easiness of extraction of specific anthocyanin compounds, which are bounded to the plant matrix to a less extent (Barba et al. 2015a; Corrales et al. 2008). Additionally, the location of phenolic compounds, particularly anthocyanins, in the vegetable cells can also play a key role (Barba et al. 2015a). Laaksonen et al. (2010) reported that anthocyanins are mainly located in skins of *V. myrtillus* berries, and almost exclusively in the vacuoles. Moreover, Jaeger (2011) reported that there is a huge difference in cell size in the skin (~40 µm) and in the flesh (~140 µm). Therefore, due to the different cell size distribution in blueberries skin and flesh, when applying PEF treatments, a lower degree of cell disintegration of the skin cells is likely to take place; if not high enough, field strengths are applied.

Thus, it can be hypothesized that anthocyanins from larger and juicier cells of berry flesh were released into the juice more easily than those which most probably were more bounded to cell structure of more dense skin tissue (Jaeger 2011).

Then, the prolonged intimate contact between solvent and skins during extraction allowed the recovery of the retained anthocyanins from deeper layers of the berry skins. Furthermore, the presence of ethanol in the extraction solvent favored anthocyanin recovery from press cake by enhancing solubility and diffusivity. Moreover, it is known that ethanol affects cell permeability by acting on the phospholipid bilayer of biological membranes (Puertolas et al. 2013), which could compensate the lower permeabilization effects of PEF on the cells of the skin tissue characterized by a smaller size with respect to pulp cells.

Effects of PEF Pre-treatment on the Antioxidant Activity of Blueberry Juice and Press Cake Extracts

The total antioxidant activity of blueberry juice and press cake extracts was evaluated using DPPH and FRAP assays, and the results are reported in Table 1. DPPH assay is based on the reduction of the purple DPPH radical to 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine, whereas in the FRAP assay, there are no free

radicals involved, but the reduction of ferric-to-ferrous iron is monitored.

The antioxidant activity of both juice and press cake extracts measured via DPPH reaction was lower than that detected utilizing the FRAP method. In particular, compared to the juice obtained from the untreated berries, PEF pre-treatments (1–10 kJ/kg) significantly ($p \leq 0.05$) increased the antioxidant activity of the juices measured by DPPH (17.2–40.5%) and FRAP (15.2–36.1%). Among PEF treated samples, significant differences were detected between the DPPH values at 1 and 10 kJ/kg, whereas no significant ($p > 0.05$) difference was observed in FRAP of the juice when the energy input was increased from 5 to 10 kJ/kg.

The antioxidant activity of press cake extracts was six to ten times higher than that of the corresponding juice samples. In particular, the extracts obtained from press cakes of PEF pre-treated blueberries possessed a significantly ($p \leq 0.05$) higher antioxidant activity than the control extracts as detected with both DPPH (76.3–108.6%) and FRAP (40.4–70.7%) assays. The trend of DPPH values of press cake extracts is similar to that observed for juices, whereas significant differences among the extracts obtained from the press cakes of PEF treated blueberries were observed utilizing FRAP method.

The ability of PEF pre-treatments to enhance the antioxidant activity of both juices expressed from plant tissues and extracts from food by-products was also reported by other scientists (Corrales et al. 2008; Donsi et al. 2010a; Grimi et al. 2011).

Moreover, in the previous work, Bobinaitė et al. (2015a) demonstrated that, compared to the juice obtained from untreated blueberries, after PEF pre-treatments of berries (1–5 kV/cm, 10 kJ/kg), the antioxidant activity of berry juices significantly increased, even though no significant ($p > 0.05$) differences were detected among the juices obtained from the PEF-treated berries. On the other hand, compared to the control extracts, the FRAP values of press cakes extracts from PEF-treated blueberries at 1, 3, and 5 kV/cm increased by 44, 71, and 80%, respectively (Bobinaitė et al. 2015a).

The results of both studies indicate that lower field strengths and higher energy inputs are the most favorable PEF-processing conditions to enhance the antioxidant activity of blueberry juices, while the antioxidant activity of press cake extracts increased with increasing the field strength and energy input.

Finally, it is worth noting that the increased antioxidant activity of both blueberry juice and extracts achieved with increasing the energy inputs during PEF processing is not surprising being its value mainly related to the content of polyphenolic compounds, especially anthocyanins. In agreement with previous findings (Wang et al. 2014), a highly positive correlation was found between TAC (Tables 2 and 3) and antioxidant activity (Table 1) in both juice ($R^2 = 0.970$ for DPPH, $R^2 = 0.899$ for FRAP) and press cake extracts ($R^2 = 0.925$ for DPPH, $R^2 = 0.988$ for FRAP).

Thus, anthocyanins contained in blueberry fruits predominantly contribute to the antioxidant activity of juices and extracts. However, it is likely that the stronger correlation, found for the extracts than for juice, is due to the higher content of anthocyanins in the skin of berry fruits, while other phenolic compounds may contribute to the antioxidant properties of the juice. Moreover, it should be considered that both DPPH and FRAP assays allow to detect not only anthocyanins but also other phenolic and non-phenolic substances, such as chlorogenic and coumaric acid and vitamins, which in turn may contribute to determine the overall antioxidant activity. This is consistent with previous findings, in which in addition to 15 different anthocyanins a total of 22 flavonol glycosides and 5 flavonol aglycons were reported in *V. myrtillus* fruits (Laaksonen et al. 2010).

Conclusions

The results of this study have demonstrated that PEF pretreatment of blueberry fruits is effective to improve not only the extraction yield and anthocyanins content in juices but also for the subsequent recovery of the huge amount of anthocyanins remained in the berry press cake. HPLC analyses allowed the identification of 15 individual anthocyanins as glycosides of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin in both juice and press cake extracts. Moreover, results of these analyses revealed the ability of PEFs to induce a selective recovery of anthocyanin compounds with high antioxidant activity, with no evidence of degradation of individual anthocyanins due to PEF application.

These promising results confirm the potential of PEF technology to improve the efficiency of the fruits transformation process, adding value to food product and allowing the valorization of the food-processing waste leading to a greater diversity of products.

Acknowledgements This study was supported by the grant from the Research Council of Lithuania, No. SVE-08/2014. The authors would also like to acknowledge networking support by the COST Action TD1104.

References

- Barba, F. J., Jaeger, H., Meneses, N., Esteve, M. J., Frigola, A., & Knorr, D. (2012). Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *14*, 18–24.
- Barba, F. J., Galanakis, C. M., Esteve, M. J., Frigola, A., & Vorobiev, E. (2015a). Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high-added value compounds from blackberries. *Journal of Food Engineering*, *167*, 38–44.
- Barba, F. J., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2015b). Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric fields, and high-voltage electrical discharges) on selective recovery of bio-compounds from fermented grape pomace. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(5), 1139–1148.
- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2015c). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, *77*, 773–798.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76.
- Bobinaitė, R., Pataro, G., Lamanaukas, N., Šatkauskas, S., Viškelis, P., & Ferrari, G. (2015a). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(9), 5898–5905.
- Bobinaitė, R., Pataro, G., Raudonis, R., Viškelis, P., Bobinas, Č., Šatkauskas, S., & Ferrari, G. (2015b). Improving the extraction of juice and anthocyanin compounds from blueberry fruits and their by-products by pulsed electric fields. In: Jarm, T. and Kramar P. (eds.), 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies (WC 2015). IFMBE Proceedings, *53*: 363–366.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, *28*, 25–30.
- Brazelton, C. (2012). World blueberry acreage and production report. North American Blueberry Council. 2013.
- Carbonell-Capella, J. M., Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). “Ice” juice from apples obtained by pressing at subzero temperatures of apples pretreated by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *33*, 187–194.
- Chu, W.-K., Cheung, S. C. M., Lau, R. A. W., & Benzie, I. F. F. (2011). Chapter 4. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) In I. F. F. Benzie & S. Sachtel-Galor (Eds.), *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects* (2nd ed., pp. 55–72). Boca Raton: CRC Press.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *9*(1), 85–91.
- Dinkova, R., Shikov, V., Mihalev, K., Velchev, Z., Dinkov, H., & Mollov, P. (2012). Changes in the total anthocyanins and polyphenols during processing of wild berries into freshly pressed juices. *Journal of EcoAgriTourism*, *8*(1), 254–259.
- Donsi, F., Ferrari, G., Fruilo, M., & Pataro, G. (2010a). Pulsed electric field-assisted vinification of Aglianico and Piediroso grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *58*, 11606–11615.
- Donsi, F., Ferrari, G., & Pataro, G. (2010b). Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue. *Food Engineering Reviews*, *2*(2), 109–130.
- Foster, S., & Blumenthal, M. (2012). The adulteration of commercially bilberry extracts. *HerbalGram*, *96*, 64–73.
- Govindaraghavan, S. (2014). Pharmacopoeial HPLC identification methods are not sufficient to detect adulterations in commercial bilberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. Anthocyanin profile provides additional clues. *Fitoterapia*, *99*, 123–138.
- Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2011). Impact of apple processing modes on extracted juice quality: pressing assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, *103*(1), 52–61.
- Jaeger, H. (2011). *Process performance analysis of pulsed electric field (PEF) food applications*. Berlin: Fakultät III—Prozesswissenschaften der Technischen Universität.

- Jaeger, H., Schulz, M., Lu, P., & Knorr, D. (2012). Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 46–60.
- Kähkönen, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 628–633.
- Kahmič-Kalamiza, S., Vorobiev, E., & Miklavčič, D. (2014). Electroporation in food processing and biorefinery. *The Journal of Membrane Biology*, 247(12), 1279–1304.
- Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37(Part C), 336–344.
- Laaksonen, O., Sandell, M., & Kallio, H. (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *European Food Research and Technology*, 231(2), 271–285.
- Lätti, A. K., Riihinen, K. R., & Kainulainen, P. S. (2008). Analysis of anthocyanins in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 190–196.
- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and phenolics from blueberry processing waste. *Journal of Food Science*, 69(7), 564–573.
- López, N., Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Álvarez, I., & Raso, J. (2009). Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT—Food Science and Technology*, 42, 1225–1231.
- Luengo, E., Alvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 79–84.
- Može, S., Polak, T., Gašperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Poklar Ulrih, N., & Abram, V. (2011). Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 6998–7004.
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 192, 842–848.
- Puertolas, E., Cregenzán, O., Luengo, E., Alvarez, I., & Raso, J. (2013). Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chemistry*, 136, 1330–1336.
- Riihinen, K., Jaakola, L., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2008). Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and ‘northblue’ blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, 110(1), 256–160.
- Wang, L. J., Su, S., Wu, J., Du, H., Li, S. S., Huo, J. W., Zhang, Y., & Wang, L. S. (2014). Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 160, 357–364.

POTENTIAL APPLICATION OF PULSED ELECTRIC FIELDS TO IMPROVE THE RECOVERY OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SOUR CHERRIES AND THEIR BY-PRODUCTS

Ramunė Bobinaite^{1*}, Gianpiero Pataro², Mindaugas Visockis¹, Česlovas Bobinas¹, Giovanna Ferrari^{2,3}, Pranas Viškelis¹

^{1*} Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kaunas st. 30, Babtai LT-54333, Kaunas dist., Lithuania, e-mail: r.bobinaite@ldsi.lt

² Department of Industrial Engineering, University of Salerno, Via Giovanni Paolo II, 132, 84084 Fisciano (SA), Italy

³ ProdAl Scarl, Via Ponte don Melillo, 84084 Fisciano (SA), Italy

Abstract

Pulsed electric fields (PEF) treatment induces transmembrane potential by means of an externally applied electric field of sufficient intensity, which causes an increase in the permeability of a cell membrane. PEF can be applied for plant cell disruption as upstream step to enhance the efficiency of mass transfer in further processing such as hydraulic pressing or extraction. The objective of the study was to evaluate the potential of using PEF technology for the increase of the juice yield and improved extraction of bioactive compounds from sour cherries (*Prunus cerasus* L.) and their by-products. PEF treatments (1–5 kV cm⁻¹ at 10 kJ kg⁻¹) were applied to cherries before the juice pressing. The by-products (press cake) generated were extracted with aqueous methanol. The samples from PEF pre-treated cherries and their by-products were compared to both untreated (control) samples and samples obtained from freeze-thawed (PEF untreated) cherries. The highest increase in juice yield by 45% was obtained at PEF intensity of E=3 kV cm⁻¹, showing similar results to freeze-thawed sample (41%). The application of PEF significantly increased the release of total anthocyanins (48.3–53.3 mg 100 mL⁻¹) and total phenolics (126.6–133.9 mg 100 mL⁻¹) into juice as compared with the control (33.8 and 112.9 mg 100 mL⁻¹, respectively), whereas juice from freeze-thawed sample exhibited the highest value only for total phenolics content (164.4 mg 100 mL⁻¹). The extracts from by-products obtained after PEF assisted juice pressing of cherries showed significantly higher contents of bioactive compounds and higher antioxidant power as compared with the control extract and the extract of freeze-thawed sample. Overall, the results of this work demonstrated promising use of PEF technology in sour cherry processing.

Keywords: PEF, extraction, juice pressing, by-products, phenolics.

Introduction

Sour cherries (*Prunus cerasus* L.) (also called tart cherries) are an important source of anthocyanins and other phytochemicals that possess many potential biological properties (Damar et al., 2012; Šarić et al., 2009). Studies have demonstrated that sour cherries exhibit anticarcinogenic effect in various colon cancer models (Ferreti et al., 2010). Furthermore, anthocyanins were identified as anti-inflammatory agents, which are major contributors to the antioxidant activity in cherries (Ferreti et al., 2010; Repajić et al., 2015).

The total anthocyanin content of sour cherries is reported to range from 28 to 80 mg 100 g⁻¹ (Blando et al., 2004). However, the total anthocyanin content and composition differ depending on sour cherry genotype (Blando et al., 2004; Damar, Eksi, 2012).

Processing of fruits and vegetables affects their phytochemical and nutrient content, which may also influence their related health benefits (Ou et al., 2012). Therefore, there is a need to study the potential of new, non-thermal processing technologies, such as pulsed electric fields (PEF) that can enhance the recovery of high-added value components from plant materials without having negative effect on nutritional or sensorial attributes of the final product. PEF processing involves the application of a high intensity electric fields in the form of short pulses to a food placed between two electrodes. PEF induces permeabilization of cell membranes (electroporation), which facilitates the release of intracellular substances. It has been demonstrated that PEF pre-treatment can enhance hydraulic pressing efficiency, diffusion rate and

increase the yield in production of several fruit and vegetable juices (Mahnic-Kalamiza et al., 2014). However, to date, no work dealt with the use of PEF to assist expression of juice from sour cherries and the subsequent valorization of cherries by-product (press cake). Therefore, the objective of the study was to evaluate the potential of using PEF technology for the increase of the juice yield and bioactive compounds extraction from sour cherries (*Prunus cerasus* L.) and their by-products.

Materials and Methods

A pulsed electric fields treatment was applied using an electric field generator (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden) able to deliver monopolar square pulses. The PEF treatment of sour cherries was carried out in a cylindrical batch treatment chamber with uniformly pierced (d = 0.5 mm) lateral surface, closed at both ends by two stainless steel electrodes (3.4 cm in diameter).

During each experiment, 10 g of sour cherries (destoned and cut into 4 pieces) were loaded into the treatment chamber and subjected to PEF treatments at different electric field strength (E=1, 3, and 5 kV cm⁻¹), constant total specific energy input ($W_T=10$ kJ kg⁻¹), constant frequency (10 Hz) and pulse width of 20 μs. PEF-treated samples were then pressed in the treatment chamber by loading a weight on the top of upper electrode (10 kg weight for 9 minutes). The expressed liquid was centrifuged to obtained clear juice, which was subjected to further analysis. The subsequent extraction of press cakes left after juice pressing was performed with acidified aqueous methanol

(70% MeOH and 0.5% HCl, v/v). The solvent to press cake ratio was 10 : 1 (v/w). The extraction was carried out for 24 hours at ambient temperature with constant shaking.

Total anthocyanins content was measured by the pH differential method previously described by Lee et al. (2005). Juice and press cake extracts were added to pH 1.0 and pH 4.5 buffers and after an equilibration period (20 min), the absorbance was measured at 520 and 700 nm using a V-650 UV-vis spectrophotometer (Jasco Inc., Easton, USA). The corrected absorbance values were calculated as follows:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})pH\ 1.0 - (A_{520nm} - A_{700nm})pH\ 4.5$$

The total anthocyanin content was calculated using the molar absorptivity ($\epsilon=26,900$) and molecular weight (MW=449.2) of cyanidin 3-glucoside. Results were expressed in mg of cyanidin 3-glucoside equivalents per 100 mL of juice or 100 g of press cake.

Total phenolics content was determined with the Folin-Ciocalteu reagent, following the procedure previously described by Bobinaite et al. (2012). After 1 h incubation of the reaction mixture, the absorbance of the samples was measured at 765 nm using a spectrophotometer. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve and results were expressed in mg of gallic acid equivalents per 100 mL of juice or 100 g of press cake.

Ferric reducing absorbance power (FRAP) was determined following a slightly modified method of Benzie and Strain (1996). To conduct the assay, 2 mL of freshly prepared FRAP working solution was combined with 20 μ L of diluted juice or extract sample. After incubation for 30 min at ambient temperature, the absorbance of the samples was determined at 593 nm using a spectrophotometer. Trolox was used as a standard for the calibration curve and results were expressed as μ mol of Trolox equivalents (TE) per mL of juice or g of press cake.

Each experiment and analyses was repeated, at least, three times. Mean values and standard deviations of data were calculated. Significant differences between the results were calculated by analyses of variance (ANOVA). Mean values were further compared, using Turkey's test, and differences were considered to be statistically significant when $p \leq 0.05$. SPSS software, version 20 was used for statistical analysis (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results and Discussion

The juice yield obtained from untreated and PEF treated sour cherries is shown in Figure 1. The juice yield was defined as the amount of juice (g) obtained from 100 g of cherries. PEF assisted pressing led to significant increase in juice yield from 26.0 g 100 g⁻¹ (untreated cherries) to 37.7 g 100 g⁻¹. The highest increase in juice yield (by 45%) was achieved at the electric field strength of 3 kV cm⁻¹, while higher values (up to 5 kV cm⁻¹) did not lead to a further increase in juice yield. The results obtained were compared with

other cell disintegration method, based on the freeze-thawing process. The formation of ice crystals during freezing cause damage (increase permeabilization) of plant cells thus can enhance the yield of fruit juice. In the present work, sour cherries were frozen to -20 °C for 24 h and prior to juice pressing, they were thawed in the refrigerator. The juice yield obtained from freeze-thawed cherries was 36.7 g 100 g⁻¹, which is comparable to that of PEF-assisted pressing (when E was 1 and 3 kV cm⁻¹) (Fig. 1).

Efficacy of the PEF treatment was also previously demonstrated for expression of juices from grapes, apples, carrots, and blueberries (Mahnic-Kalamiza et al., 2014; Bobinaite et al., 2015). Moreover, it has been previously stated that the application of PEF can possibly replace or allow the reduction of the amount of pectolytic enzymes that are traditionally used in fruit juice production (Korma et al., 2016).

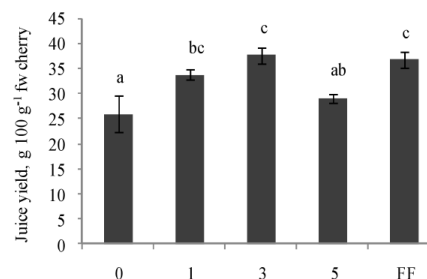


Figure 1. Juice yield obtained after pressing untreated, PEF-treated and frozen-thawed sour cherries

0 – untreated sample (0 kV cm⁻¹), 1 – PEF treated sample (1 kV cm⁻¹), 3 – PEF treated sample (3 kV cm⁻¹), 5 – PEF treated sample (5 kV cm⁻¹), FF – frozen and thawed sample. *different letters above bars indicate significant differences between the samples ($p \leq 0.05$).

Phenolic compounds, and in particular anthocyanins, are among the main components that determine berry juice quality and the efficiency of the pressing process. The total phenolics and anthocyanins content of PEF treated cherry juice and control juice is shown in Table 1. The total phenolics content of sour cherry juice after PEF application ranged between 126.6 and 133.9 mg 100 mL⁻¹, corresponding to 12–19% increment, compared to the untreated sample. Mechanical pressing of frozen and thawed sour cherries led to the highest release of phenolic compounds into juice, which corresponds to a 46% increase compared to the untreated sample.

The total monomeric anthocyanin content of sour cherry juices after PEF application was by 43 to 58% higher, compared to control sample. Interestingly, PEF assisted pressing of sour cherries led to the similar extraction yield of monomeric anthocyanins compared with that obtained from freeze thawed sample (Table 1). The lower content of monomeric

anthocyanins in polyphenolic fraction of frozen-thawed cherry juice was most probably due to the enzymatic reactions that could take place in damaged sour cherry tissues during the thawing process.

Anthocyanins, in fact, are degraded by oxidative mechanisms involving the enzyme polyphenol oxidase (PPO). PPO is found in cherries and plays an important role in the browning of their fruit juices (Welch et al., 2008). Degraded anthocyanins are resistant to color changes regardless the pH of the media, therefore they are not included in the calculation applying pH differential method (Lee et al., 2005).

The increase in PEF treatment intensity to 3 and 5 kV cm⁻¹ did not contribute to a more significant increase in the content of total phenolics and total anthocyanins in the juice (Table 1). These results are similar to those previously observed for blueberries, where it was noted that electric field strength higher than 1 kV cm⁻¹ might not be necessary to facilitate the release of phenolic compounds into the juice (Bobinaite et al., 2015). A positive impact of PEF on extraction of polyphenols was also observed in juices obtained after PEF treatment of grapes (Grimi et al., 2009), blueberries (Bobinaite et al., 2015), and apples (Korma et al., 2016).

The juices obtained from PEF-treated cherries showed 25–36% higher FRAP values, while the control (untreated) sample displayed the minimum one (Table 1). The antioxidant activity of the juice from frozen and thawed cherries was by 51% higher compared to control sample. The increased ferric

reducing absorbance power of the juices may be ascribed to an enhanced release of matrix-bound phenolic antioxidants.

PEF pre-treatment of plant tissues has also been reported to facilitate the diffusion of intracellular compounds during the subsequent extraction with solvent process (Mahnic-Kalamiza et al., 2014). Interestingly, in a previous work (Bobinaite et al., 2015), it has been shown that press cake extracts obtained after PEF-assisted pressing of blueberry fruits contained a higher amount of antioxidant compounds as compared with those of the extracts obtained without the application of PEF.

A similar approach was used in the present work. The results in terms of total phenolics and total anthocyanins content detected in the extracts obtained from the by-products (press cakes) of untreated, PEF treated and frozen-thawed cherries are shown in Table 2. The extraction yield of total phenolics and total anthocyanins obtained from the press cake of frozen-thawed cherries was comparable to that obtained from the control press cake sample, whereas the amount of total phenolics extracted from the press cake of PEF treated sour cherries was by 22–33% higher and the amount of total anthocyanins – by 44–54% higher compared to control extraction. A possible explanation is that pores formed during PEF treatment of sour cherries were still open after the juice pressing, thus leading to higher recovery yield of phenolic compounds.

Table 1

Samples	Total phenolics, total anthocyanins and FRAP of sour cherry juice		FRAP μmol TE mL ⁻¹
	Phenolics mg 100 mL ⁻¹ juice	Anthocyanins mg 100 mL ⁻¹ juice	
0 kV cm ⁻¹	112.90±4.22 ^a	33.80±6.83 ^a	4.90±0.22 ^a
1 kV cm ⁻¹	126.60±2.87 ^b	48.30±3.87 ^b	6.10±0.66 ^{ab}
3 kV cm ⁻¹	132.80±6.48 ^b	49.90±3.85 ^b	6.40±1.07 ^b
5 kV cm ⁻¹	133.90±2.67 ^b	53.30±0.97 ^b	6.60±0.13 ^b
FF	164.40±8.12 ^c	56.60±2.00 ^b	7.40±0.42 ^b

0 kV cm⁻¹ – untreated (control) sample, FF – frozen and thawed sample.

*Different letters in the same column indicate significant differences between the samples (p≤0.05).

Table 2

Samples	Total phenolics, total anthocyanins and FRAP of extracts obtained from sour cherry press cake		
	Phenolics mg 100 g ⁻¹ press cake	Anthocyanins mg 100 g ⁻¹ press cake	FRAP μmol TE g ⁻¹
0 kV cm ⁻¹	304.90±13.18 ^a	109.40±6.66 ^a	45.30±3.76 ^b
1 kV cm ⁻¹	388.50±16.83 ^b	164.10±12.33 ^b	52.70±1.33 ^{bc}
3 kV cm ⁻¹	372.80±13.92 ^b	158.00±4.18 ^b	55.70±0.66 ^c
5 kV cm ⁻¹	407.90±18.54 ^b	168.50±3.99 ^b	56.10±1.25 ^c
FF	307.20±15.38 ^a	123.20±7.92 ^a	36.00±3.08 ^a

0 kV cm⁻¹ – untreated (control) sample, FF – frozen and thawed sample.

*Different letters in the same column indicate significant differences between the samples (p≤0.05).

When PEF are applied in such way that irreversible permeabilization is achieved, some pores would never reseal, thus cell membrane is permanently damaged and therefore, the extraction process is facilitated.

Similarly to the results observed for sour cherry juice, electric field strength did not have significant ($p \leq 0.05$) influence on the extraction yield of total phenolics and total anthocyanins, i.e. higher electric field strength applied did not further enhance the extraction of phenolic compounds from sour cherry by-products (Table 2). Interestingly, in our previous work, the extractability of phenolic compounds from blueberry by-products was shown to be dependent on the applied electric field strength (Bobinaite et al., 2015). As it was previously documented, the influence of PEF treatment on extractability of phenolic compounds depends on the location of these compounds in the plant cell and also on the cell size distribution between berry skin and flesh (Corrales et al., 2008; Barba et al., 2015). In addition, it has been demonstrated previously that the effect of PEF might be very distinct even when applied to different fruit varieties of the same plant species (Donsi et al., 2010). PEF treatment of *Aglianico* grapes prior to the fermentation/maceration step induced a significantly higher release of polyphenols (+20%) and anthocyanins (+75%), whereas the same PEF treatment had only minor impact on the polyphenolic release from *Piedirosso* grapes (Donsi et al., 2010).

The extracts obtained from the by-products of PEF treated cherries possessed 16–24% higher FRAP values with respect to control extract (obtained from untreated cherry press cake), while the extract obtained from freeze-thawed cherry by-products showed the lowest FRAP value. Moreover, FRAP of the extract obtained from press cake of frozen-thawed cherries was by 21% lower compared with the control.

It has been shown previously that PEF-assisted extraction of grape (Corrales et al., 2008), blueberry (Bobinaite et al., 2015), and raspberry (Lamanauskas et al., 2016) by-products increased the antioxidant activity of the extracts.

Conclusions

This study suggests that application of PEF in sour cherry juice production can enhance the juice yield and quality, as well as improve extraction efficiency of press cake residues.

The electric field strength of 1 kV cm^{-1} at the total specific energy input of 10 kJ kg^{-1} were shown to be sufficient for optimum PEF-assisted pre-treatment for sour cherry juice production and for further enhancement of extractability of anthocyanins and other phenolic compounds from the by-products (press cake).

References

- Barba F. J., Galanakis C.M., Esteve M. J., Frigola A., Vorobiev E. (2015) Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of

high-added value compounds from blackberries. *Journal of Food Engineering*, Vol. 167A, p. 38–44.

- Benzie I. F., Strain J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, Vol. 1239, p. 70–76.
- Blando F., Gerardi C., Nicoletti I. (2004) Sour cherry (*Prunuscerasus*L.) anthocyanins as ingredients for functional foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 5, p. 253–258.
- Bobinaite R., Viškelis P., Venskutonis P.R. (2012) Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, Vol. 132, p. 1495–1501.
- Bobinaite R., Pataro G., Lamanauskas N., Šatkauskas S., Viškelis P., Ferrari G. (2015) Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 52, p. 5898–5905.
- Corrales M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 9, p. 85–91.
- Damar I., Eksi A. (2012) Antioxidant capacity and anthocyanin profile of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Chemistry*, Vol. 135, p. 2910–2914.
- Donsi F., Ferrari G., Fruilo M., Pataro G. (2010) Pulsed electric field-assisted vinification of *Aglianico* and *Piedirosso* grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 58, p. 11606–11615.
- Ferretti G., Bacchetti T., Belleggia A., Neri D. (2010) Cherry antioxidants: from farm to table. *Molecules*, Vol. 15, p. 6993–7005.
- Grimi N., Lebovka N. I., Vorobiev E., Vaxelaire J. (2009) Effect of a pulsed electric field treatment on expression behavior and juice quality of Chardonnay grape. *Food Biophysics*, Vol. 4, p. 191–198.
- Korma S. A., Kamal-Alahmad, Ali A. H., Shoaib M., Abed S. M., Yves H., Nsor-Atindana J., Qin J. (2016) Application of pulsed electric field technology in apple juice processing. *Austin Journal of Nutrition and Food Science*, Vol. 4, p. 1080.
- Lamanauskas N., Pataro G., Bobinas Č., Šatkauskas S., Viškelis P., Bobinaite R., Ferrari G. (2016) Impact of pulsed electric field treatment on juice yield and recovery of bioactive compounds from raspberries and their by-products. *Zemdirbyste-Agriculture*, Vol. 103, p. 83–90.
- Lee J., Durst R. W., Wrolstad R. E. (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, Vol. 88, p. 1269–1278.
- Mahnic-Kalamiza S., Vorobiev E., Miklavčič D. (2014) Electroporation in food processing and biorefinery. *Journal of Membrane Biology*, 247, p. 1279–1304.
- Ou B., Bosak K. N., Brickner P. R., Iezzoni D. G., Seymour E. M. (2012) Processed tart cherry products—comparative phytochemical content, *in vitro* antioxidant capacity and *in vitro* anti-inflammatory activity. *Journal of Food Science*, Vol. 77, p. 105–112.

16. Repajić M., Kovačević D. B., Putnik P., Dragović-Uzelac V., Kušt J., Čosić Z., Levaj B. (2015) Influence of cultivar and industrial processing on polyphenols in concentrated sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 53, p. 215–222.
17. Šarić A., Sobočanec S., Balog T., Kušić B., Šverko V., Dragović-Uzelac V., Levaj B., Čosić Z., Šafranko Ž. M., Marotti, T. (2009) Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 64, p. 231–237.
18. Welch C. R., Wu Q., Simon J. E. (2008) Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*, Vol. 4, p. 75–101.

Matematinio modeliavimo įrankiai elektroporacijos proceso optimizavimui (Apžvalga)

**Mindaugas Visockis¹, Pranas Viškelis¹, Saulius Šatkauskas²,
Ramunė Bobinaitė¹**

*¹Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialas Sodinininkystės ir daržinininkystės
institutas, Kauno g. 30, LT-54333, Babtai, Kauno r.
el. paštas: m.visockis@lsdi.lt*

*²Vytauto Didžiojo universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Vileikos g. 8, LT-44404,
Kaunas*

Darbo tikslas – apžvelgti problemas išskylančias taikant elektroporaciją bei inovatyviausius metodus joms spręsti. Darbe analizuojamos dvi, šiuo metu pasaulyje plačiausiai taikomos kompiuterinio modeliavimo programos – COMSOL Multiphysics ir ANSYS CFX. Straipsnyje įvertinami programų privalumai ir trūkumai. Tai pat analizuojamos šių programų taikymo perspektyvos.

Dažniausiai modeliuojant bandoma surasti optimalius išorinių jėgų parametrus, kurie užtikrintų efektyvų apdorojimo kameros panaudojimą. Dėl savo paprastumo, plačiausiai elektroporacijos pramonėje yra naudojama kolineari („co-linear“) apdorojimo kamera. Šios kameros didžiausias trūkumas – nehomogeniškas elektrinis laukas. Elektrinio lauko homogeniškumo užtikrinimas apdorojimo kameroje yra vienas aktualiausių ir vis dar sunkiai išsprendžiamų uždavinių. Pastaruoju metu šią problemą bandoma spręsti pasitelkiant kompiuterinio modeliavimo tyrimus. Pasinaudojus programiniu paketu Matlab ir modeliavimo įrankiu COMSOL Multiphysics buvo sukurtas automatinis algoritmas galintis surasti optimalią kolinearios apdorojimo kameros formą.

Straipsnyje pateikti ir aptarti naujausių šioje srityje atliktų tyrimų rezultatai bei nurodytos galimos tolimesnių tyrimų kryptys.

Reikšminiai žodžiai. Elektroporacija, baigtinių elementų metodas, matematinis modeliavimas, kompiuteriniai programiniai paketai.

Įvadas. Elektroporacijos (impulsinio elektrinio lauko, IEL) poveikis maistinės žaliavos kokybei yra tiriamas jau keletą dešimtmečių (Qin ir kt., 1996; Lebovka ir kt., 2003; Bobinaitė ir kt., 2015). Žinoma, kad proceso efektyvumas priklauso nuo impulsų generatoriaus funkcionalumo, veikiamos žaliavos rūšies, nuo apdorojimo kameros geometrijos bei elektrodų charakteristikų (Donsi ir kt., 2010; Meneses ir kt., 2011; Loginova ir kt., 2011; Saulis ir kt., 2016). Nuo elektrodų išdėstymo

apdoravimo kameroje priklauso proceso pobūdis, kuris gali būti stacionarus arba kintantis laike ir erdvėje. Stacionaraus proceso sąlygas paprasčiau valdyti, o gautus rezultatus lengviau interpretuoti, kadangi yra mažiau rezultatų įtakojančių faktorių.

Maisto pramonėje norint užtikrinti didelį proceso našumą, būtina sąlyga – kaip įmanoma didesnis apdoramos žaliavos kiekis per kuo trumpesnę laiką (Topfl, 2006). Siekiant padidinti proceso našumą yra būtina užtikrinti pratekančios žaliavos vientisumą visoje kameros erdvėje, o žaliavos tėkmės greitis turi būti adekvatus elektrinių impulsų parametrams ir apdoramo kameros geometrijai. Didesnis proceso našumas taip pat reikalauja ilgesnės apdoravimo trukmės, kas savo ruožtu gali sukelti nepageidaujamą, o kartais ir žalingą terminį efektą (Jager, 2013). Tai yra, didesnis specifinės impulso energijos kiekis sąlygoja aukštesnę proceso temperatūrą.

Elektroporacijos efektyvumą galima įvertinti atlikus laboratorinius tyrimus, nustatant žaliavos cheminę sudėtį, jos pokyčius, matuojant terpės pH (Donsi ir kt., 2010; Gad ir kt., 2012), taip pat elektroporacijos efektyvumas vertinamas naudojant branduolių magnetinio rezonanso metodą (TD – NMR) (Dellarosa ir kt., 2016), matuojant impedansą arba akustines savybes ir skaičiuojant ląstelių desintegracijos indeksą (Angersbach ir kt., 1999; Lebovka ir kt., 2002; Bazhal ir kt., 2003), vertinant audinių tekstūros pokyčius (Frontuto ir kiti, 2016). Augalinės žaliavos pasterizavimas naudojant IEL turi savus kokybinius kriterijus, kuriuos taip pat galime įvertinti (Qin ir kt., 1996).

Šiuo metu vienas labiausiai akcentuojamų kriterijų aukštos įtampos generavimo sistemoms yra impulsų formos kontrolė ir jos vizualizavimas poveikio metu (Frey, 2016; Kempkes, 2016). Realiu laiku stebėti ir įvertinti apdoravimo kameros viduje vykstančius procesus (temperatūros gradientą, srauto greitį, slėgį, elektrinių impulsų formos pasikeitimus) yra sudėtinga. Elektrinio lauko homogeniškumui įvertinti kuriami realaus tyrimo objekto fantomai, rezultatus įvertinant magnetinio rezonanso elektrinio impedanso tomografijos (MREIT) metodu (Kranjc ir kiti, 2011). Šis metodas leidžia optimizuoti tik elektrinius proceso parametrus, tačiau juo nėra įmanoma išmatuoti ar įvertinti impulsinio elektrinio lauko įtakos apdoramos žaliavos biologinių struktūrų pokyčiams.

Matematinis modeliavimas dažniausiai taikomas siekiant optimizuoti išorinių jėgų parametrus, kurie užtikrina efektyvų apdoravimo kameros panaudojimą (Schroeder ir kt., 2009; Buckow ir kt., 2010; Knoerzer ir kt., 2015; Horneber, 2016), o taip pat modeliuojant biologinių struktūrų cheminių savybių įtaką elektrinių impulsų formai (Miklavčič ir kt., 2014), siekiant įvertinti elektrocheminių procesų įtaką elektrodų korozijai (Saulis

ir kt., 2016), elektrocheminių reakcijų įtaką maistinės žaliavos kokybei (Pataro ir kt., 2015) bei impulsinio elektrinio lauko parametrų įtaką biologinės ląstelės sienelės laidumui (Trainito ir kiti, 2015).

Tyrimo metodai ir sąlygos. Šiuo metu, moksliniuose tyrimuose ir pramoninių technologijų kūrime dažniausiai naudojami programiniai paketai, kuriuose yra galimybė panaudoti realios konstrukcijos brėžinį. Kompiuterinę grafiką galima susikurti naudojantis programos įrankiais arba importuoti SOLIDWORKS arba AUTOCAD programomis jau parengtą geometrinį modelį.

1 lentelė. Programose COMSOL Multiphysics ir ANSYS CFX elektroporacijos proceso efektyvumui įvertinti naudotų parametrų sklaida (Buckow ir kt., 2010; Horneber, 2016)

Table 1. Dispersion of electroporation parameters which were used for estimate the efficiency of the process in the COMSOL Multiphysics and ANSYS CFX programs (Buckow ir kt., 2010; Horneber, 2016)

Parametras Parameter	Parametro pavadinimas (matavimo vnt.) Description of parameter (unit of measurement)
C_p	izobarinė savitoji šiluma (J/kg K) isobaric heat capacity (J/kg K)
d	atstumas tarp elektrodų (mm) gap (mm)
d_{in}	vidinis kameros skersmuo (mm) internal diameter (mm)
E	elektrinio lauko stiprumas (V/m) electric field strength (V/m)
f	impulsų pasikartojimo dažnis (Hz) pulse repetition rate (Hz)
g	laisvo kritimo pagreitis (9,8 m/s ²) gravity constant (9,8 m/s ²)
h	šilumos perdavimo koeficientas (W/m ² K) heat transfer coefficient (W/m ² K)
I	elektrinė srovė (A) electrical current (A)
J	elektrinės srovės tankis (A/m ²) density of the electrical current (A/m ²)
k	turbulentinė kinetinė energija (m ² /s ²) turbulent kinetic energy (m ² /s ²)
k_l	šiluminis laidumas (W/mK) thermal conductivity (W/mK)
k_T	turbulentinis šiluminis laidumas (W/mK)

	turbulent thermal conductivity (W/mK)
m	masės poslinkis (kg/s) mass flow rate (kg/s)
n	normalės vektoriaus kryptis normal direction
P	slėgis (Pa) pressure (Pa)
Q	šilumos kiekis (W/m ³) heat source (W/m ³)
Q _{spec}	specifinės energijos kiekis (kJ/kg) specific energy input (kJ/kg)
q, q ₀	šilumos sklaida (W/m ²) heat flux (W/m ²)
R	elektrinė varža (Ω) electric resistance (Ω)
T	temperatūra (K, °C) temperature (K, °C)
T ₀	temperatūra sistemos įėjime (K, °C) inlet temperature (K, °C)
T _{inf}	kameros korpuso temperatūra (K, °C) reference bulk temperature (K, °C)
t	laikas (s) time (s)
v	greitis (m/s) velocity (m/s)
v ₀	greitis sistemos įėjime (m/s) inlet velocity (m/s)
\vec{v}	greičio vektorius (m/s) velocity vector (m/s)
V ₁	tūrio poslinkis (m ³ /s) volume flow rate (m ³ /s)
V	įtampa (V) voltage (V)
V ₀	amplitudinė impulso įtampa (V) maximal potential of a pulse (V)
δ _w	laminarinio sluoksnio storis (m) laminar boundary layer thickness (m)
ε	turbulencinės energijos nuostoliai (m ² /s ³) dissipation rate of turbulence energy (m ² /s ³)
η	dinaminis klampumas (Pa s) dynamic viscosity (Pa s)
η _T	turbulencinis klampumas (Pa s)

	turbulent viscosity (Pa s)
ρ	tankis (kg/m ³) density (kg/m ³)
σ	elektrinis laidumas (S/m) electrical conductivity (S/m)
τ	impulso trukmė (s) pulse width (s)
A	poveikio zonos plotas (mm ²) cross – section area (mm ²)

Šių, modeliavimui skirtų programinių paketų skaičiavimai paremti baigtinių elementų metodu (FEM). Šio metodo esmė – sritis, kurioje ieškomas sprendinys suskaidoma į smulkias geometrines figūras, kurios tarpusavyje yra sujungtos mazguose, taip sudarant baigtinių elementų tinklą. Uždavinio sprendimo aplinkoje, parinkus atitinkamas sąlygas geometriniam modeliui, kiekvieno baigtinio elemento viduje yra užduodamas atitinkamas poslinkių kitimo dėsnis. Todėl galime modeliuoti sistemas, kurios susideda iš sudėtingų geometrinių struktūrų. Visi skaičiavimai remiasi užprogramuotomis analitinėmis išraiškomis, kurias automatiškai sprendžia programa, tuo būdu išvengiama ypač sudėtingų lygčių sistemų. Nors skaičiuoti fizikinių parametrų pokyčius (1 lentelė) remiantis tiksliais geometriniais modeliais yra labai patogus, tai turi ir savų trūkumų. Vienas iš sudėtingiausių uždavinių yra tiksliai įvertinti žaliavos parametrus: dinaminį klampumą, elektrinį laidumą, temperatūrinį laidumą bei specifinę savitąją šilumą esant pastoviam slėgiui, o taip pat ne mažiau svarbu yra žinoti žaliavos tankį, kuris priklauso nuo slėgio apdorojimo kameroje, apdorojamų medžiagų tankio bei nuo žaliavos dalelių formos ir dydžio. Paprastai, dėl programų COMSOL Multiphysics ir ANSYS CFX medžiagų bibliotekose esančio mažo skystų medžiagų pasirinkimo, modeliuojant kaip elektroporuojiama medžiaga pasirenkamas vanduo. Programose aprašant vandens pagrindu sudarytą maistinę žaliavą yra būtina nurodyti atitinkamą dinaminį klampumą, šiluminį ir elektrinį laidumą, nes šie dydžiai nulems simuliacijos rezultatus, kurie savo ruožtu priklausys nuo proceso temperatūros (Krauss ir kt., 2011). Tuo tarpu nuo temperatūros labai nežymiai priklausanti specifinė medžiagos šiluma ir tankis, kiekvienai medžiagai nurodomi kaip konstantos, kurios nėra aprašomos kintančiomis funkcijomis. Temperatūra simuliacijos metu negali viršyti intervalo 10–100 °C ribų (Horneber, 2016).

Abiejuose programiniuose paketuose nėra funkcijų įgalinančių struktūriškai apibrėžti, kad skysčio dalelės bus keletą skirtingų dydžių arba parinkti norimą jų tarpusavio išsidėstymą. Skysčio dalelių dydis yra

automatiškai nustatomas pagal pasirinktą baigtinių elementų tinklelio tankumą bei problemines sritis, kurias modeliuojamoje geometrijoje suranda programa. Vartotojui paliekama galimybė iš keleto siūlomų variantų pasirinkti elementų formą bei pakeisti medžiagos technines charakteristikas. Problema išlieka skystos augalinės žaliavos fizikinių savybių pokyčius įvertinančių lygčių stoka (Heinz ir kt., 2001; Horneber, 2016).

Kaip vieną iš aptariamų kompiuterinių programų trūkumų būtų galima paminėti sudėtingą atsiradusių klaidų paiešką. Aprašant naujo modelio funkcijas galima suklysti nurodant sąlygas. Geras fizikinių ir cheminių procesų išmanymas ir puikūs gebėjimai valdyti programų funkcijas sumažina klaidų tikimybę. Antra vertus, net ir turint įgūdžių bei patirties naujo modelio funkcijų aprašymas atima nemažai laiko, kadangi net ir standartinės lygtys programose aprašomos naudojant tik specifinius simbolius. Norint greičiau surasti atsiradusias klaidas modeliuojamos sistemos pakeitimus būtina saugoti atskiruose laikmenose.

Reikėtų paminėti, kad COMSOL Multiphysics ir ANSYS CFX programos kelia aukštus techninius reikalavimus kompiuteriui su kuriuo atliekamas modeliavimas. Rekomenduojama, kad vidinė kompiuterio atmintis (RAM) būtų nemažesnė nei 16 GB. Didesnis vidinės atminties kiekis sąlygos greitesnį skaičiavimų procesą ir atvirkščiai.

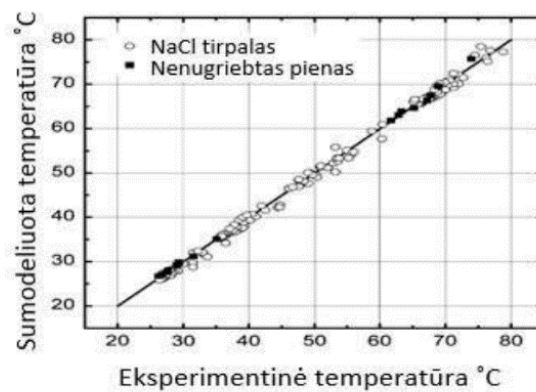
Galimybė importuoti Matlab programos failus yra vienas iš svarbiausių COMSOL Multiphysics privalumų lyginant su ANSYS CFX. Naujausia, 2016 metų COMSOL Multiphysics jau leidžia kurti modelių aplikacijas, kurių pagalba galima gauti rezultatą suvedant svarbiausius parametrus išvengiant vartotojo sąsajos išmanymo. ANSYS CFX programa vis dar tokios galimybės neturi.

COMSOL Multiphysics palaiko 32 ir 64 bitų Windows ir Linux, taip pat 64 bitų Mac OS X operacines sistemas, tuo tarpu ANSYS CFX palaiko 32 ir 64 bitų Windows ir Linux operacines sistemas.

Analogišku funkcionalumu pasižymi šios kompiuterinio modeliavimo programos: MSC Nastran (MSC Software Corporation, Newport Beach, Kalifornija, JAV), ABAQUS FEA (Dessault Systemes, ABAGUS Inc., Velizy-Villacoublay, Prancūzija).

Tyrimo objektas. Elektroporacijos proceso metu naudojamos apdorojimo kameros geometrinių parametrų įtakos proceso efektyvumui tyrimai, naudojant kompiuterinius programinius modeliavimo paketus COMSOL ir ANSYS CFX. Pramonėje naudojamos įvairių tipų apdorojimo kameros, bet dažniausiai pasitaikanti kolineari („co-linear“ kitaip dar vadinama „co-field“).

Pirmuosiuose apdoravimo kameros modeliavimo tyrimuose buvo bandoma nustatyti temperatūrų pasiskirstymą apdoravimo kameroje, o gautas priklausomybes palyginti su eksperimentiškai išmatuotomis (Fiala ir kt., 2001). Modeliuojant skirtingų parametrų apdoravimo kameras buvo pastebėta, kad elektroporacijos efektyvumą labai riboja nevienodas elektrinio lauko intensyvumas skirtingose kameros vietose (Lindgren ir kt., 2002). Papildomas modeliavimas parodė priežastis įtakojančias didelius temperatūros nuokrypius tam tikrose poveikio kameros vietose (Bosch ir kt., 2003). Pirmą kartą, kompiuterinio modeliavimo metu maistinės žaliavos skirtingas elektrinis laidumas buvo prilygintas atitinkamų koncentracijų NaCl tirpalų elektriniam laidumui (Gerlach ir kt., 2008). Galiausiai buvo apibendrinti kompiuterinio modeliavimo principai bei įrodyta, kad tam tikri impulso ir specifinės energijos kiekiai gali įtakoti mikrobu inaktyvacijos ir maistinės žaliavos elektroporacijos mastą (Schroeder ir kt., 2009; Maneses ir kt., 2011).



1 pav. Eksperimentiškai išmatuotų ir modeliavimo metu gautų NaCl tirpalo ir nenugriebto pieno apdoroto ypač aukštoje temperatūroje, temperatūrų pasiskirstymas proceso metu (Buckow ir kt., 2010)

Fig. 1. Comparison of the experimental and temperature values of NaCl solutions or UHT whole milk at five locations of temperature measurement (Buckow ir kt., 2010)

Žinoma, kad skysčių tekėjimas kolinearinioje („co-linear“) apdoravimo kameroje, nestacionaraus proceso metu, turi būti kuo labiau homogeniškas. Šioje kameroje, žaliavos judėjimas iš esmės yra laminarinis, tačiau prie apdoravimo kameros sienelės, dėl trinties jėgų žaliava juda šiek tiek lėčiau. Dėl laminarinio judėjimo apdorojama žaliava absorbuoja skirtingą energijos kiekį, nes apdoravimo kameros centre,

išilgai ašies elektrinio lauko intensyvumas yra pastebimas silpnėnis. Siekiant išspręsti minėtas problemas t. y., padidinti skystos žaliavos maišymasi ir suvienodinti absorbuojamos energijos kiekį buvo sumodeliuota apdorojimo kamera su viduje įmontuotu polipropileno tinkleliu. Dėl tinklelio žaliavos tėkmės srautas tapo turbulentiu kas užtikrino homogeniškesnę žaliavos apdorojimą (Jaeger ir kt., 2009). Kitų mokslinių tyrimų rezultatai patvirtino, kad šiuo metu naudojamų apdorojimo kamerų geometrija vis dėl to neleidžia efektyviai valdyti proceso sąlygų (Buckow ir kt., 2010). Buckow ir kt. atliktuose IEL poveikio kameros optimizavimo tyrimuose buvo atsižvelgta į difuzijos koeficientą (1 pav.), nors kai kurie autoriai laiko šį koeficientą nereikšmingu dėl mažos įtakos proceso efektyvumui (Delgado ir kt., 2008).

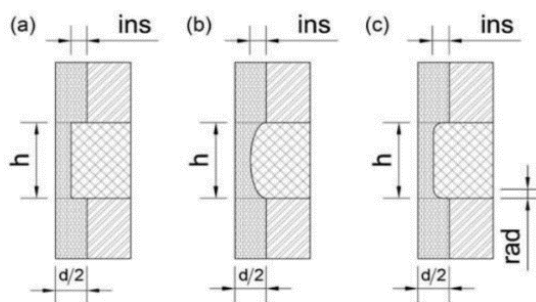
Atlikus eksperimentus pastebėta, kad fermentų aktyvumas tiesiogiai susijęs su mikrobų inaktyvacijos efektyvumu. Kuo mažesnis liekamasis fermentų aktyvumas tuo mažesnis išlikusių gyvybingų bakterijų kiekis po inaktyvavimo impulsiniu elektriniu lauku (Jaeger ir kt., 2009). Todėl vėlesniuose modeliavimo tyrimuose atsižvelgiant į biocheminių reakcijų svarbą buvo atliekami papildomi laboratoriniai tyrimai siekiant įvertinti liekamąjį fermentų aktyvumą (Krauss ir kt., 2011; Horneber, 2016), kuris aprašomas funkcija:

$$RA(E, t^*) = 100 \cdot \frac{A(E, t^*)}{A_0};$$

kur RA – liekamasis aktyvumas (residual activity), A – fermentų aktyvumas po apdorojimo, A_0 – fermentų aktyvumas prieš apdorojimą; E – elektrinio lauko stiprumas, t^* – apdorojimo laikas;

$$t^* = t \cdot \tau \cdot f;$$

kur t^* – visų impulsų suminė trukmė, τ – impulso trukmė, f – impulso dažnis, t – apdorojimo proceso laikas.



2 pav. Geometriniai apdorojimo kameros modeliai su skirtingų formų izoliacinių medžiagų tarpais: stačiakampiu (a), elipsiniu (b), stačiakampiu su užapvalintais kampais (c) (Knoerzer ir kt., 2012)
Fig. 2. Geometry variables for the different types of insets: (a) “rectangular inset”, (b) “elliptical inset”, (c) “rectangular rounded edge inset” (Knoerzer ir kt., 2012)

Pasinaudojus programiniu paketu Matlab (Mathworks Inc., Natikas, Masačusetas, JAV) ir modeliavimo įrankiu COMSOL Multiphysics buvo sukurtas automatinis algoritmas galintis surasti optimalią kolinearos apdorojimo kameros formą (Knoerzer ir kt., 2012) (2 pav.)

Aptarimas. Amplitudinė impulso įtampa ir galia ženkliai nulemia elektroporatoriaus kainą. Todėl modeliavimo eksperimentų metu įrodžius, kad su mažesnės įtampos impulsais galima pasiekti tokį patį rezultatą, būtų galima išvengti didelių įrangos finansinių kaštų. Elektrinio lauko stiprumas didesnis nei 15 kV/cm, neįtakojo mikroorganizmų inaktyvacijos rezultatų (Alvarez ir kt., 2003). Šiuo metu nėra atlikta tyrimų, kurie leistų įvertinti ekonominio potencialo santykį tarp įrangos kainos ir ilgesnio proceso poveikio, todėl manoma, kad mikroorganizmų inaktyvacijos metu naudoti trumpus, bet labai stiprius elektrinius impulsus yra ekonomiškai naudingiau nei ilgesnius, bet silpnesnius (Alvarez ir kt., 2003). Kita vertus ypač stiprus elektrinis laukas nėra būtinas augalinės žaliavos apdorojimui pavyzdžiui, siekiant padidinti sulčių išėigą ar tam tikrų cheminių junginių ekstrakcijos efektyvumą (Donsi ir kt., 2010). Kompiuterinis modeliavimas galėtų padėti įvertinti procesui sunaudojamos energijos kiekį, be to kompiuterinėje programoje galima parinkti tokius elektrinius generatoriaus parametrus, kuriais pasižymintis realus prietaisas būtų labai brangus ir neįperkamas tyrimų grupei. Modeliavimas simulatoriaus pagalba leistų įvertinti realų tokio prietaiso poreikį atliekamiems tyrimams.

Funkcionaliausi programiniai paketai turi galimybę keisti modeliuojamos geometrijos medžiagas, tai leidžia nesunkiai surasti

tinkamiausią sprendimą parenkant apdorojimo kameros dialektrines savybes. Modeliavimo rezultatai parodė, kad pratekančio skysčio temperatūra buvo didžiausia ties teigiamu elektrodu, tokius rezultatus galėjo įtakoti nepakankamas elektrinio lauko homogeniškumas dėl netinkamo elektrodų išdėstymo ir didelė dialektrikų temperatūrinė varža (Buckow ir kt., 2010).

Naujos elektroporacijos proceso modeliavimo kryptys galėtų būti: sporų inaktyvacija, elektromagnetiniai laukai, naujų matavimo priemonių pritaikymas, biocheminių reakcijų produktai, vizualinių maistinės žaliavos požymių išsaugojimas (Knoerzer ir kt., 2015).

Apibendrinimas. Kompiuteriniai modeliavimo paketai vienu metu gali simuliuoti keletą fizikinių procesų, taip įvertinat visų poveikių įtakos reikšmingumą, vien tik elektrinių parametrų optimizavimas neužtikrina proceso efektyvumo (Buckow ir kt., 2010).

Matematinis modeliavimas gali padėti optimizuoti impulsų generatoriaus elektrinius ir apdorojimo kameros geometrinius parametrus bei įrodyti naudotų priemonių svarbą (Gerlach ir kt., 2008). Norint pasiekti aukštą IEL technologijos proceso efektyvumą ir jos pagalba pagaminti kokybiškus produktus, būtina įvertinti ir optimizuoti elektrinio lauko stiprumą ir temperatūros pasiskirstymą kameros viduje (Gerlach ir kt., 2008). Matematinis modeliavimas yra vienas ekonomiškiausių būdų galinčių padėti išspręsti šiluminės energijos pertekliaus problemą apdorojimo kameroje (Buckow ir kt., 2010). Šiuo metu, kompiuterinis modeliavimas tik pradėdamas taikyti moksliniuose tyrimuose, todėl svarbu tęsti pradėtus tyrimus bei gilinti fundamentines žinias (Horneber, 2016).

Remiantis jau atliktų tyrimų rezultatais ir šiuo metu iškeltomis tyrėjų hipotezėmis galima teigti, kad IEL technologijos optimizavimas padėtų išgauti kur kas didesnį kiekį biologiškai aktyvių junginių iš augalinės žaliavos tuo būdu padidindamas jos perdirbimo efektyvumą bei leistų prailginti pagamintų produktų galiojimo trukmę, t. y., leistų gaminti aukštos, išskirtinės kokybės maisto produktus.

Gauta 2016 05 16

Parengta spausdinti 2016 06 21

Literatūra

1. Alkhafaji S. R., Farid F. 2007. An investigation on pulsed electric fields technology using new treatment chamber design. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(2): 205–212.

2. Alvarez I., Raso J., Sala F. J., Condon S. 2003. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 20(6): 691–700.
3. Angersbach A., Heinz V., Knorr D. 1999. Electrophysiological model of intact and processed plant tissues: cell disintegration criteria. *Biotechnology Progress*, 15(4): 753–762.
4. Bobinaitė R., Pataro G., Lamanauskas N., Šatkauskas S., Viškelis P., Ferrari G. 2015. Application of Pulsed Electric Field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9): 5898–5905.
5. Buckow R., Schroeder S., Berres P., Knoerzer L. 2010. Simulation and Evaluation of Pilot – Scale Pulsed Electric Field (PEF) Processing. *Journal of Food Engineering*, 101(1): 67–77.
6. Dellarosa N., Ragni L., Laghi L., Dalla Rosa M. 2016. Time Domain Nuclear Magnetic Resonance to Monitor Mass Transfer Mechanisms in Apple Tissue Promoted by Osmotic Dehydration Combined with Pulsed Electric Fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, in press.
7. Donsi F., Ferrari G., Pataro G. 2010. Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue. *Food Engineering Reviews*, 2 (2): 109–130.
8. Fiala A., Wouters P., Bosh E., Creyghton Y. 2001. Coupled electrical – fluid model of pulsed electric field treatment in a model food system. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2: 229– 38.
9. Frey W. 2016. Basic concepts of high voltage pulse generation. *Proceedings of 3rd School on PEF processing of food*. 21–24 March, Dublin, Ireland, 13–21.
10. Frontuto D., Dellarosa N., Luengo E. 2016. Plant cell disruption by PEF. *Practical 2. Proceedings of 3rd School on PEF processing of food*. 21 – 24 March, Dublin, Ireland, 199 – 202.
11. Gad A., Jayaram S. H. 2012. Effect of food composition and pH on electrode material migration during PEF application. *Proceedings of International Conference Bio and Food Electrotechnologies*. 26 – 28 September, Salerno, Italy, 49–52.
12. Gerlach D., Alleborn N., Baars A., Delgado A., Moritz J., Knorr D. 2008. Numerical Simulations of Pulsed Electric Fields for Food Preservation: A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4): 408–417.
13. Heinz V., Alvarez I., Angersbach A., Knorr D. 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – Basic concepts for

- process design. *Trends in Food Science and Technology*, 2(4): 103–111.
14. Horneber T. 2016. Application of numerical simulation techniques to design PEF processes. *Proceedings of 3rd School on PEF processing of food*. 21–24 March, Dublin, Ireland, 67–78.
 15. Jaeger H., Meneses N., Knorr D. 2009. Impact of PEF treatment inhomogeneity such as electric field distribution, flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10: 470–480.
 16. Jager H. 2013. Process performance analysis of pulsed electric field (PEF) food applications. *Proceedings of 1st School on PEF processing of food*. 21 – 24 March, Dublin, Ireland, 87–95.
 17. Kempkes M. 2016. Removing barriers to commercialization of PEF systems and processes. *Proceedings of 3rd School on PEF processing of food*. 21–24 March, Dublin, Ireland, 171–176.
 18. Knoerzer K., Baumann P., Buckow R. 2012. An iterative modeling approach for improving the performance of pulsed electric field (PEF) treatment chamber. *Comp Chem Eng*, 37: 48–63.
 19. Knoerzer K., Buckow R., Trujillo F. J., Juliano P. 2015. Multiphysics simulation of innovative food processing technologies. *Food Engineering Reviews*. 7(2): 64–81.
 20. Kranjc M., Bajd F., Sersa I., Miklavcic D. 2011. Magnetic Resonance Electrical Impedance Tomography for Monitoring Electric Field Distribution during Tissue Electroporation. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 30(10): 1771–1778.
 21. Krauss J., Ertunc O., Rauh C., Delgado A. 2011. Novel, multi – objective optimization of pulsed electric field processing for liquid food treatment. *Innovative Food Processing Technologies: Advances in Multiphysics Simulation*, Chichester, John Wiley and Sons, 209–232.
 22. Lebovka N. I., Praporscic I., Vorobiev E. 2003. Enhanced Expression of Juice from Soft Vegetable Tissues by Pulsed Electric Fields: Consolidation Stages Analysis. *Journal of Food Engineering*, 59(3): 309–317.
 23. Lindgren M., Aronsson K., Galt S., Ohlsson T. 2002. Simulation of the temperature increase in pulsed electric field (PEF) continuous flow treatment chambers. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3: 233–245.
 24. Loginova K.V., Vorobiev E., Bals O., Lebovka N.I. 2011. Pilot Study of Countercurrent Cold and Mild Heat Extraction of Sugar from Sugar Beets, Assisted by Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Engineering*, 102(4): 340–347.

25. Lopez – Alarcon C., Denicola A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763: 1–10.
26. Meneses N., Jaeger H., Knorr D. 2011. Basic for Modeling of Pulsed Electric Field Processing of Foods. *Innovative Food Processing Technologies: Advances in Multiphysics Simulation*. Oxford, UK, 171–191.
27. Meneses N., Jaeger H., Moritz J., Knorr D. 2011. Impact of Insulator Shape, Flow Rate and Electrical Parameters on Inactivation of *E. Coli* using a Continuous Co-Linear PEF System. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1): 6–12.
28. Pataro G., Barca G. M. J., Donsi G., Ferrari G. 2015. On the modeling of the electrochemical phenomena at the electrodesolution interface of a PEF treatment chamber: Effect of electrical parameters and chemical composition of model liquid food. *Journal of Food Engineering*, 165: 34–44.
29. Qin B. L., Pothakamury U. R., Barbosa-Canovas G. V., Swanson B. G. 1996. Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: 603–627.
30. Schroeder S., Buckow R., Knoerzer K. 2009. Numerical simulation of pulsed electric fields (PEF) processing for chamber design and optimisation. *Proceedings of Seventh International Conference on CFD in the Minerals and Process Industries*. December. Melbourne, Australia, 9 – 11.
31. Topfl S. 2006. Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food – and Bioprocessing–Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis: doctor thesis, Berlin.
32. Trainito C. I., Francais O., Le Pioufle B. 2015. Analysis of Pulsed Electric Field Effects on Cellular Tissue with Cole–Cole Model: Monitoring Permeabilization Under Inhomogeneous Electrical Field with Bioimpedance Parameter Variations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29: 193–200.
33. Wouters P. C., Smelt J. P. P. M. 1997. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: Potential for food preservation. *Food Biotechnology*, 11(3), 193 – 229.
34. Bazhal M., Lebovka N., Vorobiev E. 2003. Optimisation of Pulsed Electric field Strength for Electroporation of Vegetable Tissues. *Biosystems Engineering*, 86(3), 339 – 345.
35. Lebovka N., Bazhal M., Vorobiev E. 2002. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed – electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54, 337 – 346.

Numerical simulation tools for optimisation of electroporation process (Review)

M. Visockis, P. Viškelis, S. Šatkauskas, R. Bobinaitė

Summary

The aim of this study was to overview the most frequent challenges that occur during the application of the electroporation method and the most innovative approaches for solving them. The most popular contemporary programs of computer modelling – COMSOL Multiphysics and ANSYS CFX are analysed in this article, by providing with evaluation of their advantages and disadvantages, in addition to the analysis of their perspective of being applied in further scientific research.

Usually, the most optimal parameters of external factors are tried to be identified, in order to ensure the most efficient usage of the treatment chamber. Due to its simplicity the co-linear treatment chamber is the most widely used, however, such chamber has a non-homogeneous electric field inside. The homogeneity of the electric field inside the chamber is crucial, however, not a fulfilled task yet. Recently, this task was tried to be solved with the help of software, such as Matlab and COMSOL Multiphysics, which enabled establishing an automatic algorithm capable to ascertain the optimal shape of the co-linear treatment chamber.

The most recent and relevant results of research in this field are discussed in this article, in addition to indicating the possible further tendencies of investigations.

Key words: Electroporation, finite element method, numerical simulation, computer software packages.

SUMMARY

INTRODUCTION

Pulsed electric field (PEF) treatment of vegetative raw material is one of the fastest developing methods in the food industry (Puértolas et al., 2016). This method is applicable to food of animal and plant origin (Toepfl, 2006; Jäger, 2013). The PEF treatment can significantly increase the extraction of biologically active compounds (Lebovka et al., 2003), alter the structural properties of biological tissues (Pataro et al., 2011), or pasteurize juice and dairy products (Arroyo et al., 2016). Unlike many traditional technologies for processing plant-based feedstock, PEF treatment does not have a harmful thermal effect on product quality because of the very short exposure time (μs – ms) (Pizzichemi, 2007). This technological advantage allows to preserve higher amounts of substances and vitamins beneficial to human health during the processing of the raw vegetable matter (Azmir et al., 2013) and preserves the marketable appearance of the final product (Kannan 2011). PEF-treated fruit juices have also been found to contain higher levels of biologically active compounds (Pataro et al., 2017). It is also important to note that PEF treatment consumes several times less energy than traditional nutrient processing technologies (Haberl et al., 2013).

For the environmentally friendly extraction of biologically active compounds, it is necessary to choose methods that do not require large amounts of organic solvents, energy and time (Mamidipally and Liu, 2004; Esatbeyoglu et al., 2015). Therefore, innovative and environmentally friendly extraction methods are receiving more and more attention (Tiwari and Cullen, 2013). In many ways, exposure to PEFs is the most effective way to achieve the extraction of bioactive compounds, but the high dispersion of technological parameters (electric field strength, specific energy input and pulses delivered to the raw material) and biological factors (conductivity, osmotic pressure) makes it difficult to select the optimal, universally applicable parameters of the PEF method (Jäger and Knorr, 2017).

New, larger-scale studies of PEF parameters are required to efficiently increase the extraction of biomolecules from plant material.

Hypothesis. It is possible to achieve the optimal yield of biologically active compound extraction from raw vegetable matter by adapting the technological parameters of the PEF treatment (electric field strength, number of electric pulses and specific energy input) for the specific properties of the raw plant matter (conductivity of the raw material, osmotic pressure).

Research aim. To optimize the PEF parameters in order to effectively increase biomolecule extraction from plant material.

The research tasks:

1. To investigate the influence of PEF-induced cell electroporation on the extraction yield of biologically active compounds from blueberries (*Vaccinium myrtillus* L.), chilli peppers (*Capsicum annum* L.) and beetroots (*Beta vulgaris* L.).
2. To evaluate the influence of the basic PEF parameters (electric field strength, number of electric pulses and amount of specific energy provided) on the electric properties of vegetable raw material.
3. To evaluate the influence of PEF-induced disintegration of plant cells on the yield of biologically active compounds.
4. To determine the technological laws regulating the relationship between PEF parameters, tissue disintegration index and yield of biologically active compounds.
5. To develop mathematical model of the cell, which could allow the theoretical evaluation of the influence electric conductivity of cell external medium, cell and vacuole cytozol has on efficiency of electroporation process.

Statements to be defended:

1. Selective extraction of the biologically active compounds from the plant material can be achieved with the appropriately selected parameters of the PEF.
2. The biologically active compound extraction efficiency is determined by the basic electric parameters of the PEF: the electric field strength, the specific energy input and the number of applied pulses.
3. In order to correctly evaluate the effect of different PEF parameters on the disintegration of raw vegetable matter and the yield of biologically active molecules, it is vital to compare the cell disintegration index with the measured electric conductivity of the extracts.
4. The magnitude of the transmembrane potential induced by PEF exposure on the biological cell membrane and vacuole tonoplast depends on the electrical conductivity of the cell external medium, cell cytozol, and vacuole inner medium.

Scientific novelty. Scientific novelty. For the first time, PEF-assisted extraction of capsaicin and dihydrocapsaicin from chilli pepper fruits is reported to reveal new theoretical patterns in PEF-assisted extraction. In beetroot studies, the direct correlation between the Z_p index, which reflects the damage to the cellular membranes, the conductivity of the extract, and the yield of bioactive molecules. Additionally, a new unique electroporated cell model that allows the investigation

electric conductivity of extracellular medium, cell cytoplasm and vacuole interior has on the transmembrane potential induced on the vacuolar tonoplast membrane.

Practical relevance of the work. The results obtained in this work can be applied in the medical and food industry to increase the extraction efficiency of biologically active compounds, significantly reducing the extraction time, reducing the cost of electricity and environmentally harmful organic solvents, and purposefully utilizing secondary products from the processing of raw vegetable materials.

Approval of the dissertation work. There are 3 scientific articles published in the dissertation topic: 1 in a peer-reviewed journal with a citation index in the Clarivate Analytics Web of Science database, 1 in a peer-reviewed journal without a citation index in the Clarivate Analytics Web of Science database and 1 in a peer-reviewed journal. The topic of the dissertation has been prepared and presented in 10 international conferences: 6 oral (in Ireland, Slovenia, Latvia, Austria, Germany, Italy) and 4 poster presentations (in Lithuania, Portugal, USA, France).

Volume and structure of the dissertation.

The doctoral dissertation is written in Lithuanian. It consists of 180 pages, 30 figures, and 8 tables. A total of 190 references have been used. The dissertation contains an introduction, a literature review, materials and methods section, results and discussion, conclusions, a list of references, a list of publications, a summary of the dissertation, publications and a *curriculum vitae*.

ABBREVIATIONS

BEY	Betalain extraction yield
FEM	Finite element method
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
HPLC	High-performance liquid chromatography
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
PEF	Pulsed Electric Field
BCEY	Betacyanin extraction yield
YCAP	Extraction yield of capsaicinoids
LAMMC	Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry
TAC	Total anthocyanin content
TE	Trolox equivalents
TMP	Transmembrane potential
Z _p	Cell disintegration index

MATERIALS AND METHODS

PEF treatment of blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits, juice expression and extraction of anthocyanins from press cake

Blueberry fruits. Wild blueberries (*Vaccinium myrtillus* L.) were purchased from a local farmer's market in September 2014 (late-season berry crop), Lithuanian origin). Berries were bought in transparent polyethylene terephthalate punnets. The soluble solids content of fresh blueberry fruits was determined with an Abe digital refractometer model DR-A1 (ATAGO CO., LTD, USA) at 25°C, the pH was determined using a Lab-TEST II pH Meter (International PBI, Milan, Italy), and the fruit firmness was measured using a TA XT plus Texture Analyze (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK) with 1 mm-diameter cylinder probe. The soluble solids in the fruits was 12.6±0.2 Brix°, the pH was 2.96±0.02 and the fruit firmness was 28.5±1.8 N/cm². Blueberry fruits were stored in the refrigerator (4±1°C) until use (for up to 5 days).

PEF-assisted extraction. Before pressing, blueberry fruits were pre-treated with PEF using the laboratory scale batch system previously described in detail by Bobinaitė et al. (2015a). Briefly, the system consisted of a high voltage pulsed power (20 kV, 500 A) generator (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden) able to generate monopolar square wave pulses (3–25 µs, 1–450 Hz). High-voltage cable connected the generator to a cylindrical batch treatment chamber (3.4 cm in diameter, electrode gap up to 5 cm) which was specifically designed to also be used as a mechanical press (Bobinaitė et al., 2015a). The maximum electric field intensity (E , in kV cm⁻¹) and total specific energy input (W_T , in kJ kg⁻¹) were calculated as reported in Bobinaitė et al. (2015a).

Prior to PEF treatment, blueberry samples were tempered at ambient temperature. In all experiments, sample temperature was measured by placing a 0.5 mm K-type thermocouple into the sample. The initial temperature of the samples was 20±1°C. The temperature increase of the samples due to the PEF treatment never exceeded 23±1°C.

During each experiment, 10 g of blueberry fruits (pre-cut in two halves with a knife) were loaded into the treatment chamber and subjected to PEF pre-treatment at constant field strength (3 kV cm⁻¹), frequency (10 Hz) and duration (20 µs). The total specific energy input (1, 5, and 10 kJ kg⁻¹) was varied by changing the number of applied pulses. These PEF pre-treatment parameters were chosen based on the previously reported assessment of the cell disintegration index (Bobinaitė et al. 2015a).

Immediately after PEF pre-treatment, the samples were pressed in the same PEF chamber at a constant pressure of 132 kPa for 8 min by loading a constant weight on the upper electrode.

The resulting liquid was centrifuged (ALC PK 130R, DJB Labcare Ltd, Newport, UK) at 5000 rpm and 5°C for 10 min in order to obtain a clear juice. The latter was weighed and the juice yield was expressed as grams of juice per 100 g of fresh weight (fw) of the berries.

The press cake left after the juice press was also weighed. Afterwards, it was subjected to solvent extraction with acidified aqueous ethanol (50% ethanol; 0.5% HCl, v/v), with a solvent to press cake ratio of 6:1 (mL/g). The extraction process was carried out for 24 h at ambient temperature with constant shaking at 150 rpm (Orbital incubator-S150, pbi international, Milan, Italy) in 50 mL sealed plastic containers wrapped in aluminium foil. The final extracts, obtained after filtration with a filter paper (Watman No.1) in a Buchner funnel, were stored at 4°C and analysed in the same day.

Untreated (control) samples (juice and press cake extracts) were collected after the application of the same protocols without PEF treatment.

Determination of anthocyanins

Sample preparation. Samples of either blueberry juice or press cake extracts were diluted 1:10 v/v with a solution consisting of 90% solvent A (10% aqueous formic acid) and 10% solvent B (acetonitrile/methanol (ACN–MeOH), 85:15 v/v). Prior to HPLC analysis, juices and diluted extracts were filtered through regenerated cellulose, syringe-tip filters (0.45 µm, 13 mm).

HPLC Analysis. Anthocyanins were separated using Waters 2695 series HPLC system, equipped with the Waters 2998 photo diode array detector (DAD) (Waters Corporation, USA). Analytical separation was carried out using an ACE Excel 5 Super C18 column (5 µm; 125 × 4.6 mm; Aberdeen, Scotland) with the modified procedure of Wang et al. (2014). The temperature of the column oven was set at 25°C. The mobile phase consisted of aqueous 10% formic acid (eluent A) and ACN–MeOH (85:15, v/v) (eluent B). The gradient program was as follows: 0–30 min from 5 to 12% eluent B; 30–50 min from 12 to 25% eluent B. The injection volume was 10 µL. The flow rate of the mobile phase was 1.0 mL/min. Anthocyanins were detected at the wavelength of 520 nm. DAD data were recorded from 200 to 600 nm.

Identification and Quantification. Anthocyanins in juice and extracts were identified according to the HPLC retention times (RT) and UV absorbance maximum, in comparison with commercial standard or with literature data (Lätti et al., 2008; Wang et al., 2014). Commercial standard (cyanidin 3-galactoside) was dissolved in solvent B (10%) and solvent A (90%) to generate seven-point external standard calibration curve (concentration range was from 1 to 100 mg/L), whose linearity was acceptable ($R^2=0.996$).

The total content of anthocyanins in the juice and extracts was determined as the sum of the amount of the individually quantified compounds as equivalents of cyanidin 3-galactoside (CGE) per L of juice or per 100g of fw of berry press cake.

Determination of ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH radical scavenging capacity

The total antioxidant activity of juice and press cake extracts was determined by FRAP (ferric reducing antioxidant power) and DDPH (free radical scavenging activity) assays.

FRAP assay was performed according to the method reported by Benzie and Strain (1996) with some modifications, as thoroughly described elsewhere (Bobinaitė et al., 2015a).

DPPH assay was based on the method of Brand-Williams (1995) with some modifications, as thoroughly described elsewhere (Bobinaitė et al., 2015b).

Trolox (Acros Organics, Geel, Belgium) was used as the standard for the calibration curve in both assays, and the antioxidant capacity was expressed as μmol of trolox equivalents ($\mu\text{mol TE}$) per mL of juice or g of fw berry press cake.

PEF treatment of fresh chili pepper (*Capsicum annum* L.) and subsequent extraction of capsaicin and dihydrocapsaicin

Chili pepper fruits. The fresh peppers (*Capsicum annum* Jacq., variety 'Habanero') were purchased from a local market (Sanitex Inc., Kaunas, Lithuania) and stored in the refrigerator (4 °C) for 24 h. Before the experiments, fruits were washed with deionized water and cut in four halves. In order to prepare the PEF treatment material, the placenta of each half was separated and immediately subjected to PEF. 0.5 g of separated placenta was used for the experiments.

PEF-assisted extraction. The equipment of the PEF treatment of fresh chili peppers (*Capsicum annum* L.) consisted of the electrical pulse generator (BTX T 820, Holliston, USA), a digital oscilloscope (Rigol DS2072A, Rigol Technologies Inc., USA), a current probe (Pintek PA – 622, Pintek Electronics Co, Taiwan), the safety stand (BTX 630B, Holliston, USA) and electroporation cuvettes. The electroporation cuvettes with a 4 mm gap between the aluminum electrodes were used for the experiments. The voltage and the electric current of the delivered pulses was measured and collected by the current probe, which was located close to the safety stand and coupled to a digital oscilloscope. The monopolar rectangular pulses of different electric field strengths were delivered to the cuvette by the leads that connected the electroporator with the electrodes.

During the experiments, 10 and 100 electric pulses with 0.5 kV cm^{-1} , 1.0 kV cm^{-1} , 1.5 kV cm^{-1} and 2.0, 2.5 and 3 kV cm^{-1} electric field strengths were delivered to the samples. In all of the experiments, the duration of a single pulse was $100 \mu\text{s}$, and the pulse repetition rate was 1 Hz.

Immediately after the exposure to PEF, 0.5 g of pepper placenta was put in a glass jar of 25 ml, and 5 ml of deionized water (pH 5.8) or ethanol (96%, v/v) were poured on the sample, then the mixture was incubated without agitation for 5 min. at 22°C . After the incubation, the extract was taken for HPLC analysis.

The same steps were taken for the extraction of capsaicin and dihydrocapsaicin from the untreated samples, except no PEF treatment was applied to the sample.

Determination of capsaicinoids

HPLC Analysis. Anthocyanins were separated using Waters 2695 series HPLC system, equipped with the Waters 2998 photo diode array detector (DAD) (Waters Corporation, USA). Analytical separation was carried out using an ACE C18 column ($5\mu\text{m}$; $250 \times 4.6 \text{ mm}$; Aberdeen, Scotland) with the modified procedure of Dong et al., (2014). The temperature of the column oven was set at 25°C . The mobile phase consisted of 0.1 % trifluoroacetic acid (eluent A) and acetonitrile (99.8%, v/v) (eluent B). The duration of analyses was set for 16 minutes. The injection volume was $10 \mu\text{L}$. The flow rate of the mobile phase was 1.0 mL/min . Capsaicins were detected at the wavelength of 280 nm. DAD data were recorded from 200 to 600 nm.

Identification and Quantification. Capsaicin and dihydrocapsaicin in extracts were identified according to the HPLC retention times (RT) and UV absorbance maximum, in comparison with commercial standard or with the data from the literature (Dong et al., 2014). $1,275 \pm 0,037 \text{ mg}$ of capsaicin and $1,210 \pm 0,052 \text{ mg}$ of dihydrocapsaicin standards were dissolved in 5 ml ethanol (99.9 %, v/v) to generate six-point external standard calibration curve for detection of capsaicin (concentration range was from 0.004 to 0.255 mg/L ; $R^2=0,999$) and five-point external standard calibration curve for detection of dihidcapsaicin (concentration range was from 0.008 to 0.242 mg/L ; $R^2=0,999$).

PEF treatment of fresh beetroot (*Beta vulgaris* L.) and subsequent extraction of betalains

Beetroots. The fresh beetroots (*Beta vulgaris* L., variety 'Kestrel H') that were grown in the fields of Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry (LAMMC) were used for the experiments. The red beetroots were collected from a warehouse and left at room temperature (22°C) for 24 h. After the acclimatization stage, 20 roots of about 150–200 g were taken for the experiments.

It is well known that the root of a red beetroot has an extremely heterogeneous structure (Loginova et al., 2011). Therefore, in order to improve the homogeneity of the treatment sample in terms of the electrical resistance and the total content of betalains, roots were selected at random, carefully washed with deionized water, grated with a course box grater and manually mixed. Afterwards, the shreds of various lengths with ≤ 2 mm thickness were prepared.

PEF-assisted extraction. The equipment of the PEF treatment consisted of the electrical pulse generator (BTX T 820, USA), a digital oscilloscope (Rigol DS2072A, Rigol Technologies Inc., USA), a current probe (Pintek PA – 622, Pintek Electronics Co, Taiwan) and the treatment chamber with two parallel electrodes.

The voltage and the electric current of the delivered pulses was measured and collected by the current probe, which was located close to the treatment chamber and coupled to a digital oscilloscope. The electrodes were made of two equal polished stainless steel (AISI 304) disks (surface area 24 cm²).

Outside of the electrodes, the transparent polymethylmethacrylate (PMMA) tube enclosed the electrodes, forming a treatment chamber with 24 cm³ volume when the gap between the electrodes was 1.0 cm. This size for the gap between the electrodes was kept constant in all the experiments. The monopolar rectangular pulses of different electric field strengths were delivered to the electrodes by the leads that connected the electroporator with the electrodes. In order to evaluate the correlation between the degree of cell membrane disintegration and the betalain extraction efficiency, the whole investigation was split into two parts. The first part of this investigation was arranged to determine the effect of the electric field strength and the specific energy input. In these experiments 1, 10 or 100 electric pulses with 0.5 kV cm⁻¹, 1.0 kV cm⁻¹, 1.5 kV cm⁻¹ and 2.0 kV cm⁻¹ electric field strengths were delivered to the samples.

The second set of experiments was designed to determine the influence of the electric field strength and the number of applied pulses when the total specific energy input is constant. For that purpose, electric pulse combinations with specific energy inputs of 0.8, 2 and 4 kJ kg⁻¹ were applied. In all of the experiment, the duration of a single pulse was 100 μ s, and the pulse repetition rate was 1 Hz.

Immediately after the exposure to PEF, 10 g of beetroot shreds were put in an Erlenmeyer flask. 50 ml of deionized water (pH 5.8) was poured into each flask, and the samples were incubated without agitation for 1 h at 22°C in the dark. After the incubation, 1 ml of extract was taken for spectrophotometric analysis. In all of the experiments, the loss of beetroot juice because of the juices released on the electrode surface and the grating induced juice leakage were neglected.

The same steps were taken for the extraction of betalains of the untreated samples, except no PEF treatment was applied to the sample.

In parallel, the assessment of the total betalain yield was performed using freeze/thaw and pulverization stages. 10 g of the beetroot shreds were placed into clean dry-freezing bags and incubated at -24°C for 24 h. The thawing was done at 22°C temperature, employing the free convection of the air in the room. In order to ensure complete betalain extraction, the thawed samples were additionally pulverized with a handheld homogenizer (Polytron PT1200E, Kinematica, Luzern, Switzerland).

Spectrophotometric quantification of betalains

Quantification of betalains was done in deionized water as described previously (Stinzing et al., 2003). The betacyanin absorption was measured at 536 nm and betaxanthin absorption – at 485 nm, using DU-800 Ultraviolet/Visible spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Brea, California, USA). The background absorption was measured at 650 nm for both of the pigments. The concentrations of betacyanins and betaxanthins were calculated using the following equation (Wruss et al., 2015):

$$\text{Betacyanins or Betaxanthins} = \frac{A \cdot DF \cdot MW \cdot 1000}{\varepsilon \cdot i}, \text{ mg/L} \quad (1)$$

where $A = (A_{536 \text{ nm}} - A_{650 \text{ nm}})$ for betacyanins or $A = (A_{485 \text{ nm}} - A_{650 \text{ nm}})$ for betaxanthins, DF is the dilution factor, MW (molecular weight) = 550 g/mol for betacyanins and 308 g/mol for betaxanthins, ε (molar extinction coefficient) = 60000 L/(mol·cm) for betacyanins and 48000 L/(mol·cm) for betaxanthins, i is path length of the cuvette (in all the experiments, it was equal to 1 cm). The concentrations were expressed as mg/100 g of fresh beetroot.

Determination of the electric field strength and the total specific energy input

The electric field strength was calculated by dividing the distance between the electrodes (1 cm) and the pulse voltage set in the electroporator (Raso et al., 2016):

$$E = \frac{U}{d} \quad (2)$$

where E – electric field strength, V/cm; d – distance between the electrodes, cm; U – voltage, V.

The specific energy input per pulse (W_p) was calculated according to the following equation (Raso et al., 2016):

$$W_p = U \cdot I \cdot \tau, \quad (3)$$

where W_p – the specific energy input per pulse, J/kg; U – pulse voltage, V; I – pulse electrical current, A; τ – pulse duration, s. The total specific energy input (W_T) was calculated by multiplying W_p with the number of the applied pulses.

Evaluation of plant tissue disintegration degree

To assess the disintegration degree of treated samples, impedances of untreated and treated samples were measured at 1 and 5 MHz using by using a precision impedance meter (LCR-8105G, GW Instek America Corp., CA, USA). The sample disintegration index (Z_p) was determined by the following equation (Donsi et al., 2010b):

$$Z_p = \frac{|Z_{untr(1kHz)}| - |Z_{tr(1kHz)}|}{|Z_{untr(1kHz)}| - |Z_{tr(5MHz)}|} \quad (4)$$

where Z_{untr} and Z_{tr} are the absolute values of the complex impedance of the intact and treated samples, respectively, at low (1 kHz) and high (5 MHz) frequencies. The Z_{tr} was measured 5 s after the treatment. The disintegration index was rated in a range of 0 (intact sample) to 1 (completely disintegrated sample). It should also be noted that previous research in the field states that the value of Z_p in the MHz frequency range very similar to Z_p of the frozen/thawed tissue, enabling the use of frozen/thawed tissue as the reference (positive control) of the completely disintegrated tissue.

After the preparation of the analytical samples, the flasks of the unused extraction medium were subsequently taken for the analyses of the electrical conductivity. During each measurement, a probe of the conductivity meter (Meter Toledo Seven Compact pH meter S210, Merk KGaA, Germany) was directly inserted into extraction medium at a specified liquid level and left until the stable meaning was computed. Temperature of supernatant after the different PEF treatments was measured automatically with conductivity meter and ranged from 20 to 22 °C. To ensure the accuracy of the assessment, a probe was pre-washed with deionized water and dried before each measurement.

Software

Mathematical modelling was done using Comsol (5.2) Multiphysics (Comsol Inc., Stockholm, Sweden; a trial code: 9FFF3FFFF7F5 – TYFI – 160224 – 10073638 – 594017123). The graphs were done with SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc. USA).

Statistical analysis

For each set of blueberry processing conditions, the experiments were performed in triplicate and each collected sample was analysed in duplicate. The mean values and standard deviations (SD) of the experimental data were calculated. The one-way analysis of variance (ANOVA) was

used to determine statistically significant differences between the means. The mean values were further compared using Tukey's post-hoc test. The differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Statistical Analyses were carried out using SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA) statistical package.

The results of betalain and capsaicinoid extraction were subjected to analysis of variance (ANOVA) ($p < 0.05$) using SPSS Version 25 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significant differences between the groups were identified by Tukey's post hoc test. In the graphs and tables, the results are represented with lowercase letters a, b, c and d. The indices of the groups represent the significance of differences in the groups, with the samples marked with same letter and index having no statistical significance between themselves, and samples of the same letter but different indices being statistically significantly different from one another. Results in figures and tables are presented as means \pm standard deviation (SD). Each experimental point was obtained from three independent experiments.

The governing equations of the finite element method for time-dependent electric field studies

Finite element modelling (FEM) is a mathematical method based on numerical algebra that calculates the change in a physical system at a discrete point of a continuum (Logan, 2001). To begin with, the geometrical object, for which the change is calculated, is divided into the finite number of elements that connect on specific points or edges. Then the differential equation describing the change in the variable at each of the elements is changed into a system of algebraic equations. When these equations are joined into a single numerical system, the approximation for the solution to the original differential equation is found (Reddy, 1984).

When the electric potential around a geometrical body is described as a numerical value, the polarisation of the electric charge in the electric field can be described using Ohm's equation (Tabatabaian, 2014):

$$J = \sigma \cdot E, \quad (5)$$

while accounting for the continuum of the geometrical body,

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot J = 0, \quad (6)$$

where J – current density, (A/m^2); σ – conductivity, (S); E – electric field strength, (V/m); t – treatment time, (s); ρ – charge density, (C/m^3); ∇ – Laplace operator.

Then the Gauss' law can be expressed as:

$$\nabla \cdot (\varepsilon \cdot E) = \rho. \quad (7)$$

By combining these, one can deduce the following differential equation for the space charge density in a homogeneous medium:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\sigma}{\varepsilon} \cdot \rho = 0. \quad (8)$$

This equation has the solution:

$$\rho(t) = \rho_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (9)$$

where the charge relaxation time is:

$$\tau = \frac{\varepsilon}{\sigma}. \quad (10)$$

Combining the time-harmonic equation of continuity

$$\nabla \cdot J = \nabla \cdot (\sigma \cdot E + J^e) = -j \cdot \omega \cdot \rho, \quad (11)$$

with the equation

$$\nabla \cdot D = \rho, \quad (12)$$

yields the following equation for the frequency domain study type:

$$\nabla \cdot J = \nabla \cdot (\sigma \cdot E + J^e) = \frac{\partial \rho}{\partial t} \quad (13)$$

where D – charge displacement, (C/m²), J^e – current density of external electric field, (A/m²)

For the Time Dependent study type, transient equation of continuity is used instead, and the resulting equation becomes

$$-\nabla \cdot d_{\partial t}^{\partial} ((\varepsilon_0 \cdot \nabla \cdot V + P) - \nabla \cdot (\sigma \cdot \nabla \cdot V - J^e)) = 0, \quad (14)$$

where V – pulse voltage, (V).

After that, the study type is adopted by intrinsic and external time scales:

- When $\tau > t$ – electrostatics and stationary;
- When $\tau < t$ – electric currents and stationary;
- When $\tau \sim t$ – electric currents and time – dependent.

Considering that, the numerical simulations would be performed for 1 electric pulse with duration of 100 μ s, the time – dependent study type ($\tau \sim t$) was chosen.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of PEF pre-treatment on blueberry juice yield

The effect of PEF pre-treatments at constant electric field strength (3 kV cm^{-1}) but at different energy input ($1\text{--}10 \text{ kJ kg}^{-1}$) on blueberry juice yield is shown in Table 1.

Table 1. Blueberry juice yield, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and DPPH radical scavenging capacity (DPPH) of juice and press cake extracts of untreated (0 kJ kg^{-1}) and PEF treated (3 kV cm^{-1}) blueberry fruits

W_T (kJ kg^{-1})	Juice yield	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP
	(g/100 g fw berry)	($\mu\text{mol TE/mL juice}$)		($\mu\text{mol TE/g press cake}$)	
0	42.7 ± 1.00^{a_1}	2.9 ± 0.15^{a_1}	4.8 ± 0.28^{a_1}	16.4 ± 2.20^{a_1}	39.8 ± 1.13^{a_1}
1	55.9 ± 1.77^{b_2}	3.5 ± 0.03^{b_2}	5.5 ± 0.38^{b_2}	29.0 ± 0.30^{b_2}	55.9 ± 0.38^{b_2}
5	57.4 ± 1.42^{c_2}	$3.7 \pm 0.10^{c_{2,3}}$	6.2 ± 0.38^{c_3}	$32.6 \pm 1.19^{c_{2,3}}$	61.4 ± 0.68^{c_3}
10	56.3 ± 1.57^{d_2}	4.1 ± 0.31^{d_3}	6.5 ± 0.58^{d_3}	34.2 ± 0.93^{d_3}	68.0 ± 1.48^{d_4}

Note. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p \leq 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index).

The juice yield of PEF pre-treated berries was, on average, 32 % higher when comparing it with the untreated sample. However, there were no statistically significant differences among the juice yields of the PEF-treated samples at different energy input, suggesting that the lowest value of 1 kJ kg^{-1} was sufficient to increase the juice yield, while higher energy inputs (5 and 10 kJ kg^{-1}) did not cause any further improvement. This conclusion seems to be in contrast with results of cell disintegration index (Z_p) reported in the previous work (Bobinaitė et al., 2015a). In fact, it was found that at fixed field strength of 3 kV cm^{-1} and energy inputs of 1, 5 and 10 kJ kg^{-1} , the Z_p value of blueberry tissues was 0.73, 0.77 and 0.80, respectively, with significant ($p \leq 0.05$) differences detected between 1 kJ kg^{-1} and 10 kJ kg^{-1} treatments (Bobinaitė et al., 2015a). Therefore, it is likely that the cell disintegration degree ($Z_p = 0.73$) achieved for blueberry tissue with the lowest energy input (1 kJ kg^{-1}) as well as the corresponding softening of the mash particles due to the electroporation resulted in the most favorable conditions for juice release from the blueberry tissue.

Effects of PEF pre-treatment on the content and composition of anthocyanins in blueberry juice

The application of a PEF pre-treatment clearly contributed to an increase in anthocyanin release from the tissue to the juice. The total anthocyanin content (TAC) rose approximately to 21, 29 and 55 % when the blueberry fruits were treated with PEF at 1, 5 and 10 kJ kg⁻¹, respectively. However, while no significant differences were detected between PEF-treated samples at 1 and 5 kJ kg⁻¹ and the untreated samples, a significant ($p \leq 0.05$) increase in TAC (up to 244.8 mg/ L) was observed for the PEF pre-treatment at the highest energy input of 10 kJ kg⁻¹. It is worth noting that in the previous work (Bobinaitė et al., 2015a), PEF pre-treatment at constant energy input (10 kJ kg⁻¹) and different electric field strengths (1–5 kV cm⁻¹) significantly ($p \leq 0.05$) increased the TAC of blueberry juice in comparison with the untreated samples. In particular, the TAC increased by 60%, 78%, and 44% when the berry fruits were PEF-treated at 1, 3 and 5 kV cm⁻¹, respectively. However, in the previous study, no significant difference was detected between the TAC of the PEF treated samples (Bobinaitė et al., 2015a). Combining the results of the two studies allows the conclusion that electric field strengths in the range of 1–3 kV cm⁻¹ and energy input of 10 kJ kg⁻¹ are the most favourable conditions to reach the maximum anthocyanin extraction yield into blueberry juice.

Using HPLC-DAD, 15 individual anthocyanins were characterized in the blueberry juice. Glucose was the main sugar linked with anthocyanidins, and cyanidin 3-glucoside and malvidin 3-glucoside were the predominant compounds. Moreover, the average amount of anthocyanin linked galactose and arabinose in the juice was 3.1 and 3.5 times lower than the amount of anthocyanidin linked glucose, respectively.

The average percentages of delphinidin (Dp), Cyanidin (Cy), Petunidin (Pt), Peonidin (Pn) and Malvidin (Mv) in the untreated samples were 4.2, 34.5, 7.8, 16.3 and 37.3%, respectively. However, there were slight variations in the anthocyanin distribution after PEF pre-treatment. The percentages of Dp, Cy, Pt, Pn and Mv in the juices of PEF pre-treated blueberries at different energy input were in the range 3.0–4.0%, 35.9–38.5%, 7.0–7.6%, 16.8–17.1% and 32.6–37.3%, respectively.

It is interesting to note that PEF application significantly enhanced the release of malvidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside, peonidin 3-glucoside, malvidin 3-galactoside and peonidin 3-arabinoside into the juice. However, the increase of the release of the 10 other anthocyanins was not statistically significant.

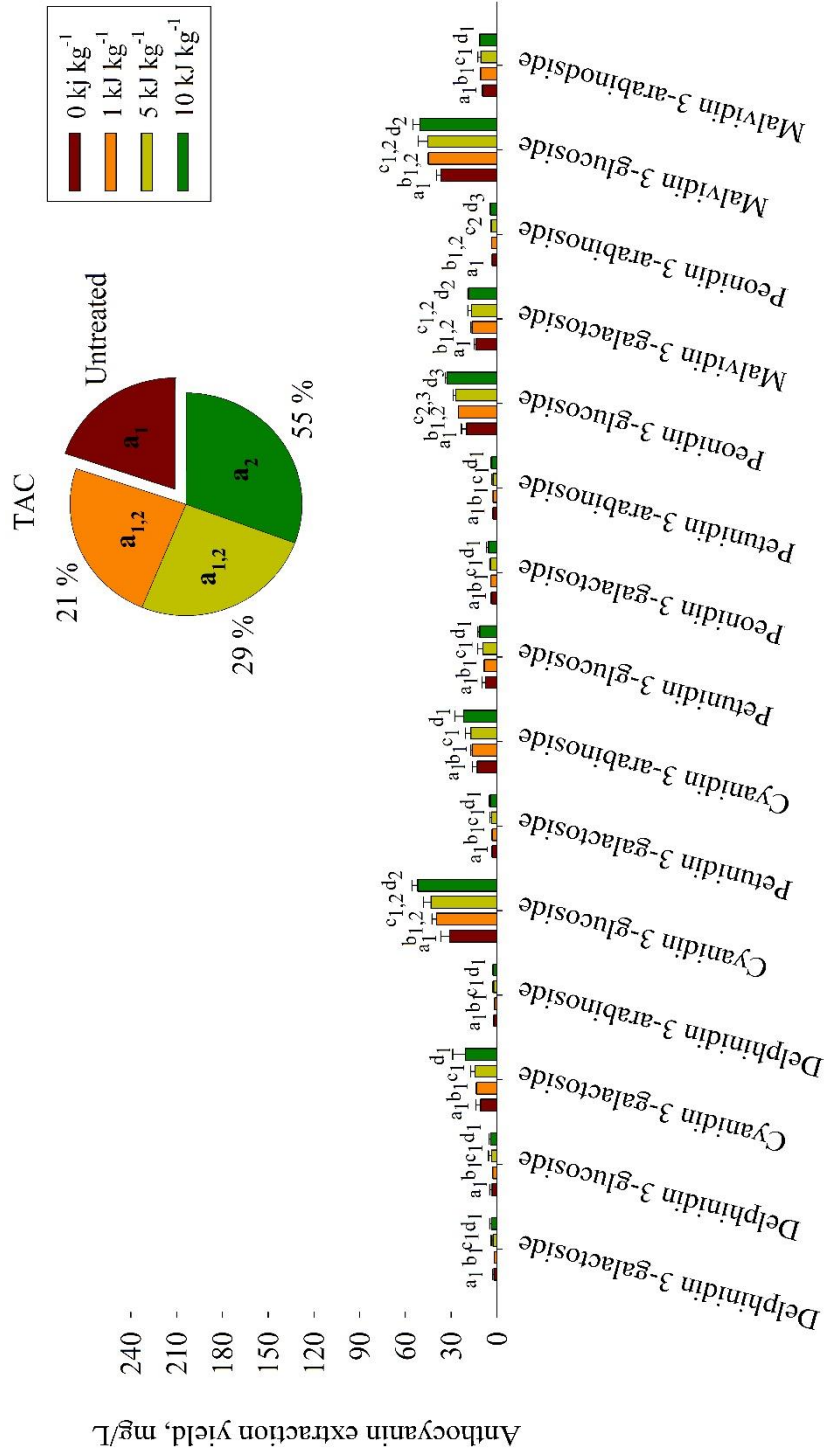


Fig. 1. Concentration of individual and total anthocyanins content of blueberry juice obtained after pressing of untreated and PEF treated berries. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p \leq 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

Effects of PEF pre-treatment on the content and composition of anthocyanins in blueberry press cake extracts

Fifteen individual anthocyanins were also detected in the press cake extracts, even though differences can be clearly noted in terms of relative content of individual anthocyanin compounds between the juice and the press cake extract (Fig. 2). Specifically, cyanidin 3-galactoside was the most abundant in the press cake extracts, followed by cyanidin 3-glucoside, delphinidin 3-galactoside and delphinidin 3-glucoside, while cyanidin 3-glucoside and malvidin 3-glucoside were more abundant in the juice. It is worth noting that the abundance of delphinidin glycosides in the press cake extracts might be of particular importance, as it has been demonstrated that delphinidin and its monoglucoside possess the highest radical scavenging activity among the tested anthocyanidins and anthocyanins (Kähkönen and Heinonen, 2003).

In the press cake extracts glucose and galactose were the main sugars linked with anthocyanidins. The glucose content in the anthocyanidins was only slightly higher than that of galactose content in anthocyanidins. The arabinose content in anthocyanidins was 2.0–2.3 times lower than glucose content and 1.6–1.7 times lower than galactose content.

It is important to note that, regardless the application of PEF pre-treatment, blueberry by-products still retain high amount of anthocyanins, as shown by the comparisons in the average concentrations of all individual anthocyanins and TAC detected in the PEF-treated berries. This is in agreement with previously reported findings for *V. myrtillus* berry by-products (Laaksonen et al., 2010).

The application of PEF pre-treatment increased the TAC in the press cake extracts by 36–75%, in comparison to the extraction from the untreated samples (Fig. 2). Significant differences ($p \leq 0.05$) were detected among the PEF-treated samples when the energy input was increased from 1 to 10 kJ kg⁻¹. The number and type (anthocyanidin type or sugar moiety) of anthocyanins in the blueberry press cake extracts was not affected by the PEF pre-treatment. However, significantly higher amounts of all individual anthocyanins were extracted from the press cakes of PEF pre-treated blueberries, in comparison with the untreated samples.

The differences in the anthocyanin distribution in the blueberry juices and press cake extracts could be due to the different content of individual anthocyanins in the skin and pulp of the berry fruit. Alternatively, these differences could be caused due to the relative ease of specific anthocyanin extraction from different parts of the fruit.

There is some literature data which suggests that the PEF treatment may either induce the selective extraction of specific compounds or cause their degradation. Luengo et al. (2013) reported that the extraction yield of naringin and hesperidin from orange peel increased with

higher PEF treatment intensity. The same authors also found that PEF treatments had a slight effect on the proportion of naringin/hesperidin in the extracts. Additionally, the study on the extraction of individual anthocyanins from grape by-products found that PEF remarkably enhanced the extraction of anthocyanin monoglucosides in comparison to the acylated glucosides (Corrales et al. 2008). Similar results were observed by Gachovska et al. (2010), who reported that the PEF treatment of red cabbage mash enhanced total anthocyanin extraction in water by 2.15-fold in comparison with the untreated sample, and the PEF treated samples had a higher proportion of non-acylated forms than the control. In some cases, it has been also observed that high amounts of electric energy delivered during electroporation may cause deterioration and degradation of valuable compounds (Kahmič-Kalamiza et al., 2014). Zhang et al., (2008) have reported that the degradation rate constant of cyanidin-3-glucoside in an aqueous-methanol solution when exposed to PEF treatment was 10^4 times higher than after the thermal treatment. Furthermore, authors reported that degradation of cyanidin-3-glucoside increased with higher electric field and treatment time (Zhang et al., 2007). However, the HPLC results of this study indicated that PEF pre-treatment kept the original HPLC profile of anthocyanins in control blueberry juice and control press cake extract, which demonstrated that PEF pre-treatment did not lead to any degradation/modification of individual anthocyanins detected in the samples (Figs. 1 and 2). It is in agreement with previously reported findings of Luengo et al., (2013), where no evidence of flavonoid degradation due to PEF treatment ($1-7 \text{ kV cm}^{-1}$) of orange peels was detected.

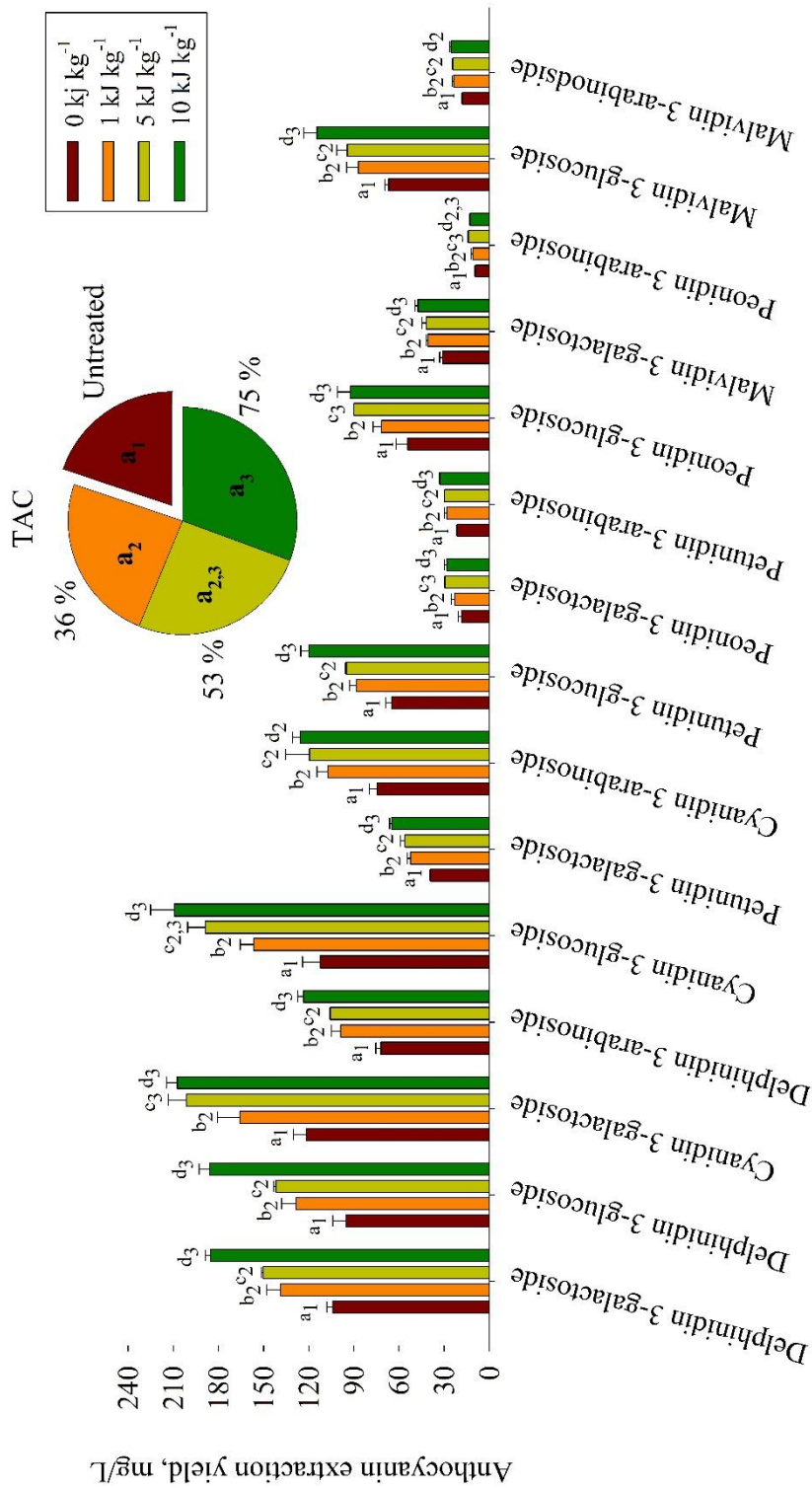


Fig. 2. Concentration of individual and total anthocyanins content of extracts from blueberry press cake obtained after pressing of untreated and PEF treated berries. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p \leq 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index

Effects of PEF pre-treatment on the antioxidant activity of blueberry juice and press cake extracts

Compared to the juice obtained from the untreated berries, PEF pre-treatments significantly increased the antioxidant activity of the juices. The DPPH increased by 17.2–40.5% and FRAP increased by 15.2–36.1% in the PEF pre-treated samples in comparison to the control). Furthermore, the extracts obtained from press cakes of PEF pre-treated blueberries possessed a significantly higher antioxidant activity than the control extracts (by 76.3–108.6% and 40.4–70.7% for DPPH and FRAP, respectively) (Table 1). Significant differences were detected between the DPPH of the juices of the PEF pre-treated samples at 1 and 10 kJ kg⁻¹, whereas no significant difference was observed in FRAP of the juice when the energy input was increased from 5 to 10 kJ kg⁻¹. The DPPH values of the press cake extracts followed similar trend as the ones observed in the juice. However, unlike the FRAP in the juice, significant differences in FRAP were observed between each of the extracts obtained from the press cakes of blueberries treated at varying total specific energy inputs.

It is important to note that the DPPH and FRAP assays measure and integrate (total) antioxidant power of the sample. Therefore, the antioxidant properties of the blueberry juice and extracts will be determined by the antioxidant properties of the anthocyanins, the other phenolic compounds as well as non-phenolic substances (e. g., vitamin C). Previous study has reported a total of 22 flavonol glycosides and 5 flavonol aglycons in addition to the 15 different anthocyanins in *V. myrtillus* fruits (Laaksonen et al., 2010).

The capability of PEF pre-treatment to enhance the antioxidant activity of juices expressed from plant-based materials was also reported by other scientists (Donsi et al., 2010; Grimi et al., 2011). PEF assisted extraction of grape by-products significantly increased the antioxidant activity of the extract (Corrales et al., 2008). Similarly, Luengo et al. (2013) reported that PEF treatments of orange peels improved the antioxidant activity of the extracts obtained by 51–192% in comparison to the untreated samples.

Quantification of the capsaicinoids after different PEF treatments

In order to investigate the extraction of capsaicinoids from the fresh pepper placenta, several experiments were done to find out the optimal PEF treatment time. This allowed the reduction of PEF parameter dispersion. The results showed that treating the fresh pepper placenta with 100 PEF pulses had the highest impact on the capsaicin and dihydrocapsaicin extraction yield in ethanol (96%, v/v). Taking these results into consideration, the subsequent experiments of capsaicinoid extraction from the pepper placenta were performed by using 100 PEF pulses at

different electric field strengths (1–3 kV cm⁻¹). The results from these experiment are depicted in Fig. 3.

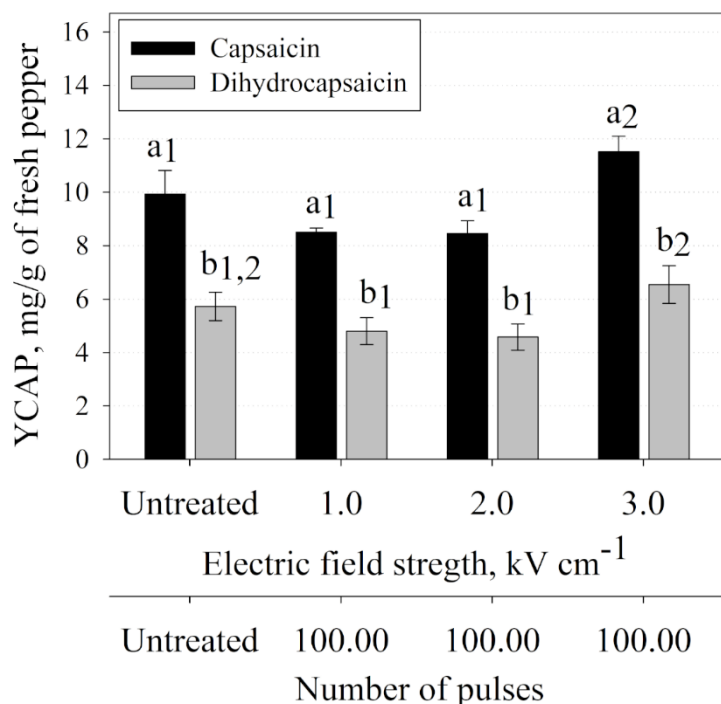


Fig. 3. The yield of capsaicin and dihydrocapsaicin extraction in ethanol (96%) from placenta of 'Habanero' pepper after different PEF treatments. "Untreated" column shows capsaicinoid extraction yield from control samples (not treated with PEF). YCAP – yields of capsaicin and dihydrocapsaicin in mg/g fresh 'Habanero' pepper. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

The results obtained in this study show that the PEF application at 3 kV cm⁻¹ field strength results in significantly ($p < 0.05$) higher yield of capsaicin and dihydrocapsaicin extraction in comparison to the untreated control. However, no statistically significant differences are seen between the untreated control and the samples treated with 1 or 2 kV cm⁻¹ PEF pulses.

The next experiments were done to optimize the PEF-assisted extraction of capsaicinoids by applying PEF treatments with 2.5 and 3 kV cm⁻¹ field strength and different number of applied pulses. However, the results from these experiments showed that ethanol solution had a higher influence on the capsaicin and dihydrocapsaicin extraction yield than the PEF treatment. On the other hand, PEF pulses had some effect on the extraction yield as the capsaicinoid yield was higher after 100 PEF pulses in comparison to the treatments of 1 and 10 pulses.

After the initial optimization has showed that capsaicin and dihydrocapsaicin extraction yield was increased with the higher pulse number and the higher specific energy delivered, it was decided to repeat the same experiments using distilled water (pH 5.8) as a solvent. 1–100 PEF

pulses, delivering total specific energy of 0.01–12.8 kJ kg⁻¹ were used for this study. The results are shown in Fig. 4.

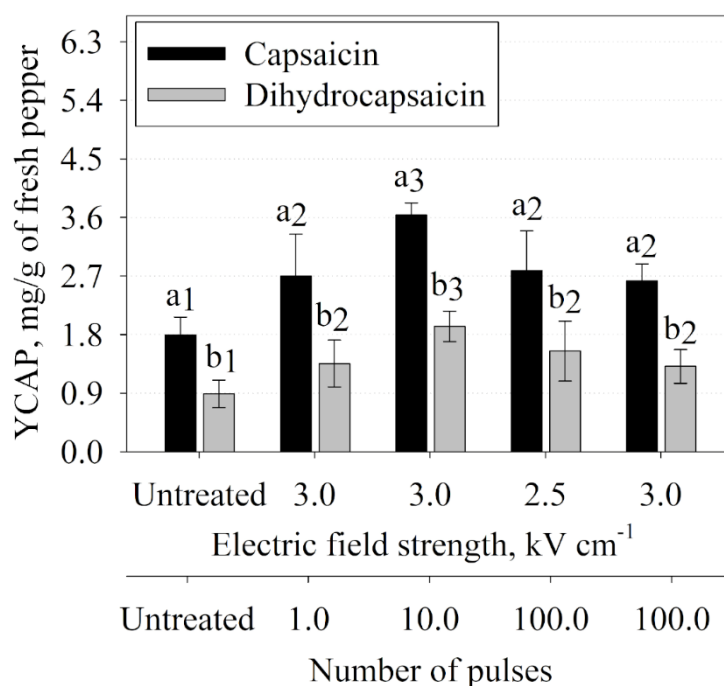


Fig. 4. The yield of capsaicin and dihydrocapsaicin extraction (in distilled water) from placenta of 'Habanero' pepper after different PEF treatments. "Untreated" column shows capsaicinoid extraction yield from control samples (not treated with PEF). YCAP – yields of capsaicin and dihydrocapsaicin in mg/g fresh 'Habanero' pepper. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

The results show the highest aqueous extraction yields of capsaicin and dihydrocapsaicin (200 and 211% of the one observed in the PEF-untreated control, respectively) after 10 PEF pulses with 3 kV cm⁻¹ field strength and 100 μ s duration of each pulse. This yield was statistically significant higher ($p < 0.05$) than the other samples. However, the effect of PEF strength on capsaicinoid extraction could not be determined from these results. In order to assess this, another study, in which the samples were exposed to 100 pulses of varying intensity, was conducted (see Fig. 5).

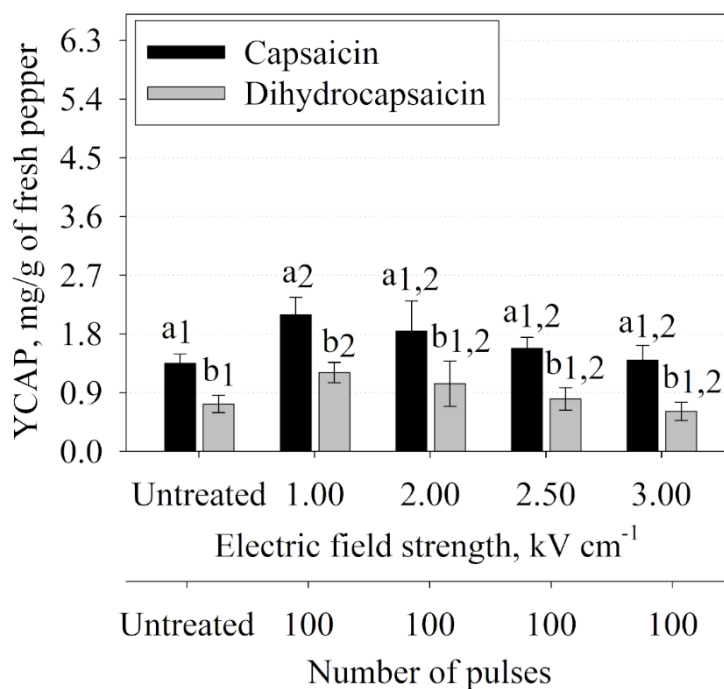


Fig. 5. Yields of capsaicin and dihydrocapsaicin extraction (in distilled water) from placenta of 'Habanero' pepper after different PEF treatments. "Untreated" column shows capsaicinoid extraction yield from control samples (not treated with PEF). YCAP – yields of capsaicin and dihydrocapsaicin in mg/g fresh 'Habanero' pepper. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

The HPLC results show that the highest capsaicinoid extraction yield after treatment with 100 PEF pulses (pulse duration for each pulse 100 μ s) was obtained at pulse strength of 1 kV cm⁻¹, and the lowest capsaicinoid extraction yield was obtained at pulse strength of 3 kV cm⁻¹ (Fig. 5). As the highest capsaicinoid extraction yields in different sets of experiments were obtained after 10 pulses at 3 kV cm⁻¹ PEF pulse strength and after 100 pulses at 1 kV cm⁻¹ PEF pulse strength, it can be concluded that the extraction efficiency of these compounds mainly depends on the specific energy delivered.

The influence of PEF pulse strength and the specific energy input on the yield of betalains

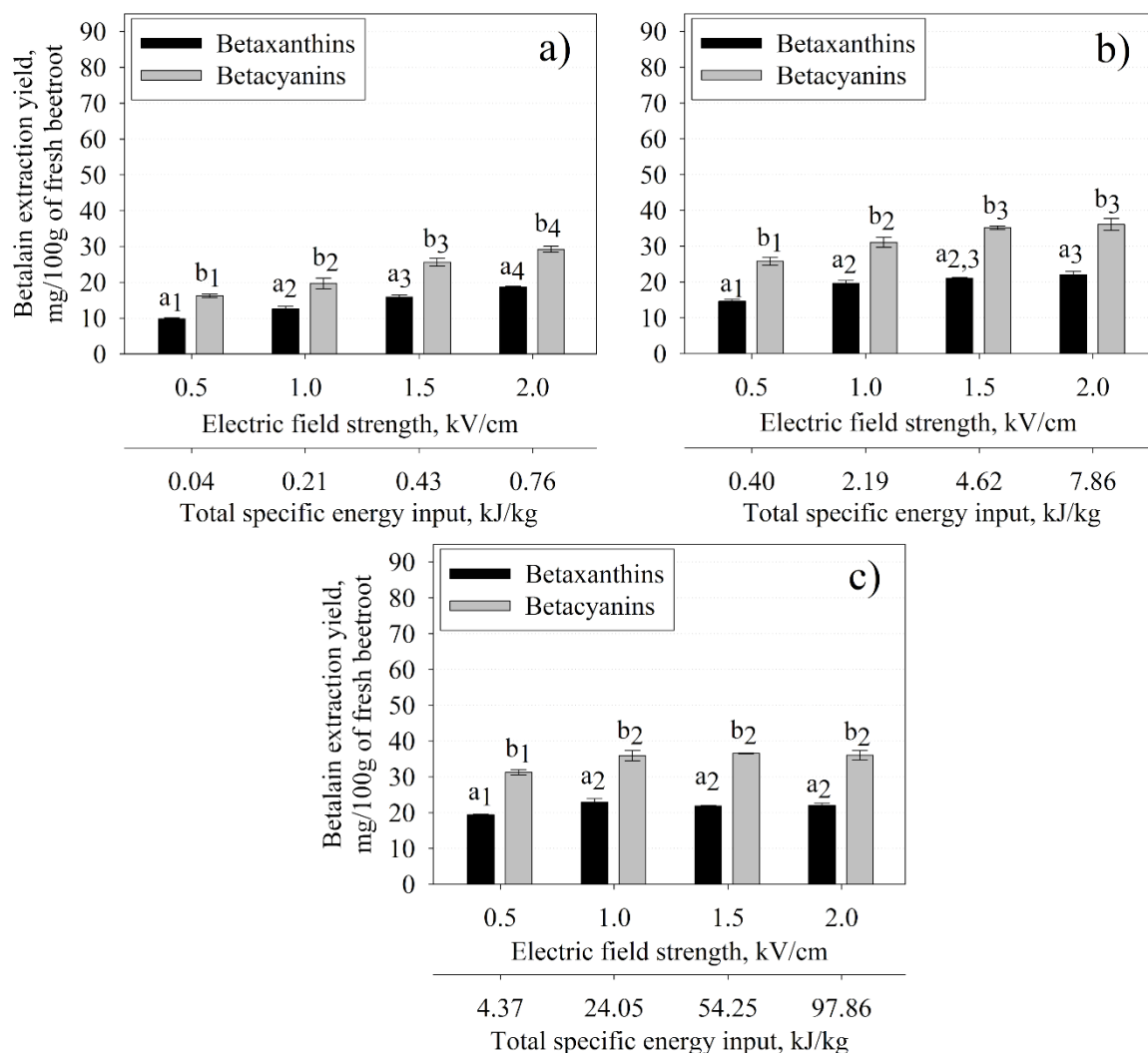


Fig. 6. The dependence of betalain extraction yield after the PEF treatment of 1 pulse (a), 10 pulses (b) and 100 pulses (c) on the electric field strength and total specific energy input. The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

Fig. 6 shows the impact of PEF treatment with 1 (Fig.6a), 10 (Fig.6b) and 100 (Fig. 6c) electric pulses at 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 kV cm^{-1} pulse strength on betalain extraction. After the application of a single electric pulse (Fig.6a), the lowest betalain yield was obtained at 0.5 kV cm^{-1} (0.04 kJ kg^{-1}) and showed a significant increase with the increasing total specific energy input, up to the highest betalain yield after single 2.0 kV cm^{-1} (0.76 kJ kg^{-1}) pulse. The same trend – the efficiency of colorant release increasing with higher total specific energy input – is observed after the treatment with 10 pulses (Fig.6b). However, in the results depicted in Fig.4c show a plateau in betalain extraction yield as no significant differences are observed for betaxanthin and betacyanin yields after PEF treatments when the total specific energy input exceeds 24.05 kJ kg^{-1} .

To sum up, the results of this study showed that the extraction yields of betaxanthins (77%) and betacyanins (72%) after the PEF treatment with total specific energy input of 7.86 kJ kg⁻¹ (10 pulses at 2.0 kV cm⁻¹ pulse strength) were very similar to those obtained after PEF using total specific energy input at 24.05, 54.25 and 97.86 kJ kg⁻¹ (see Fig. 6b). This is in agreement with Fincan et al., (2004), where the authors demonstrated that thin (~1 mm) disks of the fresh red beetroot tissue could release of about 90% of total betalain content after the application of PEF (1.0 kV cm⁻¹ pulse strength, 7 kJ kg⁻¹ total specific energy input) and 1 h of aqueous (5 μS/cm) extraction. Similar results were reported by Loginova et al. (2010) when the specific PEF energy input over 7 kJ kg⁻¹ did not improve the soluble solid extraction from chicory tissues. The results obtained in this study confirm that the specific energy input of about 7 kJ kg⁻¹ is sufficient to achieve the optimal aqueous betalain extraction yield from shredded fresh beetroot.

The influence of PEF strength and the number of applied pulses on betalain yield

The results of previous studies on PEF-assisted extraction of betalains (Chalermchat et al., 2004; Fincan et al., 2004; López et al., 2009; Loginova et al., 2011; Luengo et al., 2016) are difficult to evaluate, because it is not clear if the specific energy input or the number of applied pulses had higher influence on the extraction efficiency. Therefore, in order to elucidate the influence of the number of applied pulses on the betalain extraction yield from the fresh beetroot, we conducted experiments in which different combinations of varying the pulse strength and the number of pulses were delivered to the samples while retaining fixed specific energy inputs of about 0.8, 2.0 and 4.0 kJ kg⁻¹.

The results obtained after the application of 0.8 kJ kg⁻¹ total specific energy (Fig 7a) showed that the PEF pulse strengths of 2.0 kV cm⁻¹ (1 pulse) resulted in the highest yield of betaxanthins (60%) and betacyanins (54%). However, the significant ($p < 0.05$) differences in the betacyanin extraction yields were only observed among PEF treatment protocols of 0.5 kV cm⁻¹ (26 pulses), which yielded 54% of the betacyanin extraction, and 2.0 kV cm⁻¹ (1 pulse), which yielded 46% betacyanin extraction. When the treatments of the specific energy input of 2 kJ kg⁻¹ were applied, no significant ($p < 0.05$) differences observed in betaxanthin yield between the treatment groups of 0.5–1.0 kV cm⁻¹, 1.0–1.5 kV cm⁻¹ and 1.5–2.0 kV cm⁻¹, (Fig. 7b). However, the betaxanthin and betacyanin yield after the treatment 3 pulses at 2 kV cm⁻¹ pulse strength was significantly higher than the yields obtained after 50 pulses at 0.5 kV cm⁻¹ and 10 pulses at 1 kV cm⁻¹. On the other hand, the total specific energy input of PEF treatment at 2 kV cm⁻¹ was 2.53 kJ kg⁻¹ and 2.01–2.04 for the other groups. Therefore, the 0.50 kJ kg⁻¹ difference in the total specific energy input may have resulted in higher extraction. At ~4.0 kJ kg⁻¹ group, no significant ($p < 0.05$)

differences in betacyanin yield were detected after the applications of 25 pulses at 1.0 kV cm⁻¹, 10 pulses at 1.5 kV cm⁻¹ and 5 pulses at 2.0 kV cm⁻¹ (Fig. 7c).

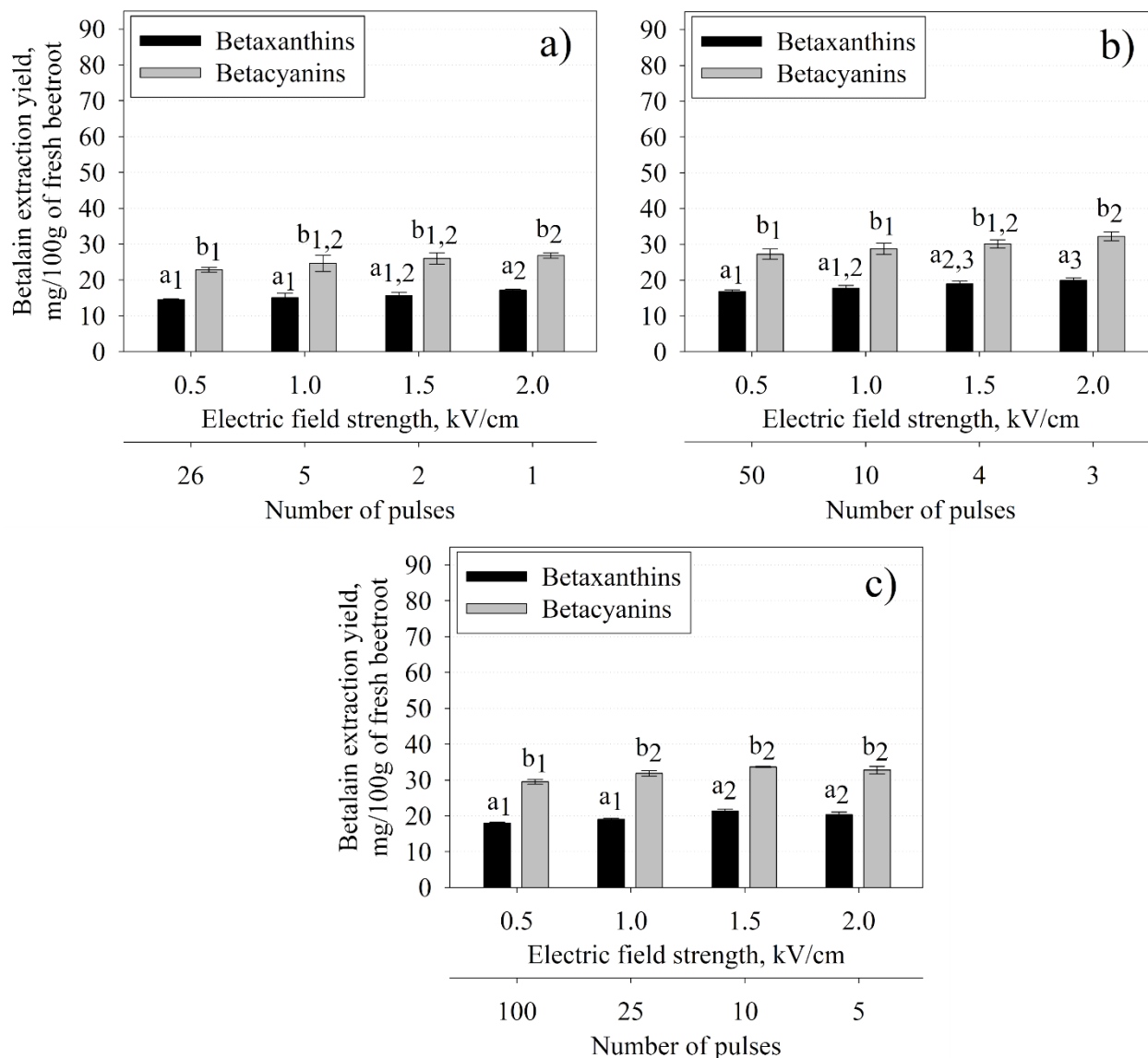


Fig. 7. Betalain extraction yield after the PEF treatment of ~ 0.8 kJ kg⁻¹ (a), ~ 2.0 kJ kg⁻¹ (b) and ~ 4.0 kJ kg⁻¹ c). The lowercase indices signify the statistical significance groups ($p < 0.05$ between bars with different indices, no significance between bars with the same index)

The findings of this study partially agree with the conclusion made by López et al. (2009). The authors stated that the number of pulses applied at lower PEF strengths (1.0 kV cm⁻¹) does not have any significant effects on the extraction yield of the betaine from the fresh beetroot. This was also observed in our study when shorter durations of PEF treatments were applied (Fig. 6a and 7a). However, we found that at low PEF pulse strengths, a substantial increase in the number of pulses (and, subsequently, the duration of the treatment) has some influence on the betalain extraction efficiency (Fig. 8).

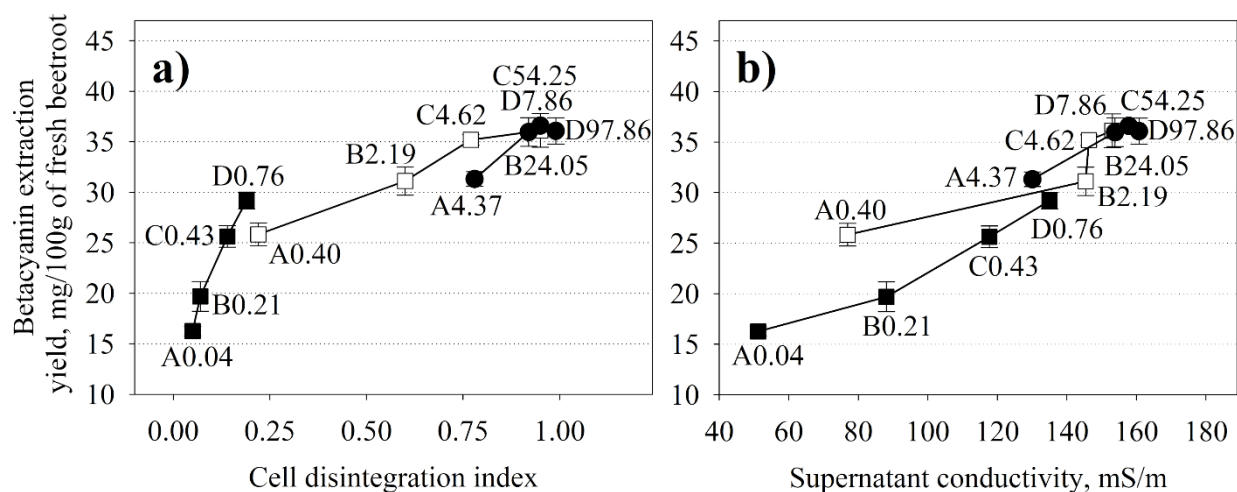


Fig. 8. The relationship between betacyanin extraction yield, cell disintegration index (a) and the conductivity of supernatant (b) in different PEF conditions with constant number of pulses delivered. ■ signifies 1, □ signifies 10 and ● signifies 100 pulses applied. The letter A represents electric field strength of 0.5 kV cm^{-1} , B – 1.0 kV cm^{-1} , C – 1.5 kV cm^{-1} and D – 2.0 kV cm^{-1} . The numbers next to the letters represent the total specific energy input in kJ kg^{-1}

Results shown in Fig. 8 revealed a clear relationship between betacyanin extraction yield and cell disintegration index as well as a relationship between betacyanin extraction yield and supernatant conductivity at the pulse parameters used. The influence of the PEF strength to the extraction yield of betacyanins becomes lower when the number of applied pulses is increased (Fig. 8).

According to Lebovka et al. (2002), to reach the desirable effect of electroporation at lower PEF strengths, more pulses have to be applied. The same can be seen in our results, for example, Fig. 8, A0.40 (10 pulses 0.5 kV cm^{-1}) and C0.43 (1 pulse at 1.5 kV cm^{-1}) yield similar results. Nevertheless, it was still difficult to describe the relationship between the number of pulses and the total specific energy input. However, our findings demonstrate that the energy consumption of the PEF-assisted betalain extraction from the fresh beetroot could be reduced by optimizing the number and strength of applied pulses – for example, in Fig. 8, it is clear that A4.37 (100 pulses at 0.5 kV cm^{-1}) and B2.19 (10 pulses at 1.0 kV cm^{-1}) yield very similar results although the total specific energy input is different by $\sim 2 \text{ kJ kg}^{-1}$.

Previous studies also suggested that the PEF utilizing higher strength pulses is more energy efficient to reach the complete disintegration of plant tissue (Töpfl, 2006; Jäger, 2013). However, our results show that PEF applications with lower electric pulse strengths ($< 1.0 \text{ kV cm}^{-1}$) can be equally effective for the betalain extraction to the PEF applications with higher electric pulse strengths as long as the threshold for total specific energy input is reached. For example, in Fig. 8b, the B24.05 point (100 pulses at 1.0 kV cm^{-1}) show almost the same betalain extraction yield, cell

disintegration index and supernatant conductivity in comparison to D7.86 (10 pulses at 2.0 kV cm⁻¹), C54.25 (100 pulses at 1.5 kV cm⁻¹) and D97.86 (100 pulses at 2.0 kV cm⁻¹). This could be explained by the hypothesis that the extent of cell membrane electroporation above the critical electric field strength mostly depends on the specific energy input (Zimmermann et al., 1996).

We have also found that the main factor in determining the Z_p of the PEF-treated beetroot cells is the number of applied pulses, and not the electric field strength or even specific energy input, at least below the plateau levels (Fig. 9a).

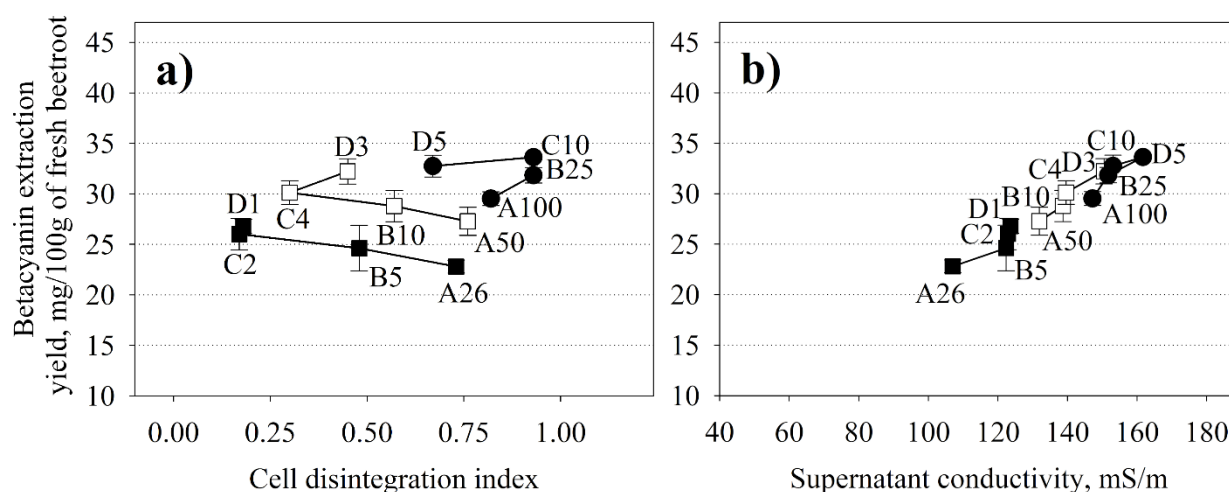


Fig. 9. The relationship between betacyanin extraction yield, cell disintegration index (a) and the conductivity of supernatant (b) at different PEF parameters preserving constant total specific energy of the pulses. ■ signifies specific energy input of 0.8 kJ kg⁻¹, □ – 2.0 kJ kg⁻¹, ● – 4.0 kJ kg⁻¹, the letter A represents pulses of 0.5 kV cm⁻¹, B - of 1.0 kV cm⁻¹, C – of 1.5 kV cm⁻¹, and D – of 2.0 kV cm⁻¹. The numbers next to the letters represent the number of applied pulses

These results somehow contradict the results obtained by Luengo et al., (2016) where the authors stated that the Z_p mainly depends on the applied energy rather than the strength and number of PEF pulses. We consider that this statement holds true only after the application of the electric field strengths higher than 1.5 kV cm⁻¹ and treatments using more than 10 pulses at the pulse duration of 100 μ s. It is noteworthy that in our experiments where pulse combinations that result in the same total specific energy were delivered, the cell disintegration index was a misleading parameter for the estimation of betalain extraction yield (Fig. 9a). The disintegration indices did not correlate with the extraction yield of betalains at PEF treatments delivering 0.8, 2.0 and 4.0 kJ kg⁻¹ total specific energy (Fig. 9a). Meanwhile, there was a direct relationship between the supernatant conductivities and the betalain extraction efficiency (Fig. 8b and Fig. 9b). There are a few reasons why the disintegration indices and the betalain extraction results mismatch. The most likely of them is the possible overestimation of impedance results, measured 5 s after the PEF treatment due to the PEF-induced osmotic imbalance, leading to cell swelling

and the reduced extracellular spaces (Abidor et al., 1994). Such effects are likely to influence the disintegration indices as the measurements of Z_{tr} (Donsi et al., 2010b) are usually carried out later than 50 ms after the treatment (Castellvi et al., 2016). On the other hand, at the fixed number of pulses, there was a direct relationship between Z_p and the betalain extraction yield (Fig. 8a), that mirrored the relationship between the conductivity of supernatants and the betalain extraction yield (Fig. 8b). This relationship can be explained assuming that higher permeabilization levels are achieved by applying higher PEF strengths (Teissie, 2017).

In summary, the results obtained in this study show that the betaxanthin and betacyanin extraction yield from fresh beetroot mostly depend on the electric field strength and the specific energy input. However, at lower ($\leq 1.0 \text{ kV cm}^{-1}$) PEF pulse strengths, the number of applied pulses also plays a significant role. Additionally, we show that supernatant conductivity measurements should be used instead of or together with the cell disintegration index (Z_p) as a way to evaluate the efficiency of PEF treatment with varying PEF parameters as the use of Z_p alone could lead to misleading interpretations of PEF treatment efficiency. The optimization of the PEF treatment showed that the application of 3 pulses with 100 μs duration and 2.0 kV cm^{-1} pulse strength (delivering total specific energy of 2.53 kJ kg^{-1}) managed to extract $\sim 70\%$ of both betaxanthins and betacyanins when compared to complete extraction while retaining the highest energy efficiency.

The development of the electroporated cell model

The mathematical finite element model was composed of 39 2D geometric structures (Fig. 8). Firstly, treatment chamber, composed of 2 parallel electrodes separated by external medium geometries was designed. 4 oval (ellipse) shapes were drawn in the centre of the chamber ($x=0; y=0$); those represented the two layers of cell membrane and two layers of vacuole tonoplast membrane. Together, these defined the width of the structure. Subsequently, 16 rectangular channels, representing the permeable pores forming after electroporation in the simplified manner, were inserted in the structure representing the cell membrane and spaced out evenly. The channel width was chosen to be 15 nm. This decision was based on kinetics studies which show that phospholipid pore size can reach 10 nm and more immediately after PEF treatment (Sowers et al., 1986). Similar changes have been made in the geometric structure of the vacuole tonoplast.

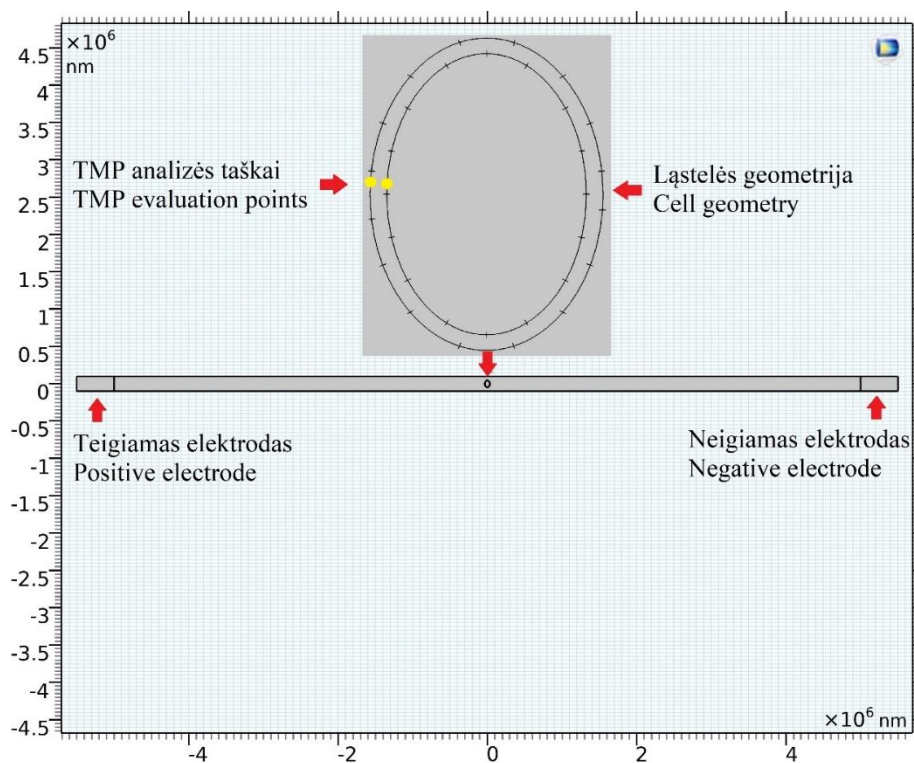


Fig. 10. Graphical view of the electroporated cell geometry in “Comsol Multiphysics”

Since a clear answer about how cell walls affect the transmembrane potential formation during the electroporation was not found in the literature, the plant cell wall was omitted from this model. In order to optimize the numerical calculations during the modelling of different electric conductivity conditions (see Tables 4–6), the cell dimensions were kept constant in all of the different modelling experiments. The values for these are presented in Table 2.

Table 2. Geometric parameters of the electroporated cell model

Name of geometric structure	Dimensions, μm
Vacuole	60 x 90
Cell	70 x 100
External medium	10000 x 200
Positive electrode	500 x 200
Negative electrode	500 x 200
Cell membrane thickness	0.015
Tonoplast thickness	0.015
Pore size	2 x 0.015

In order for the modelling data to fit in more closely with the experiments, the dimensions of the cell were selected based on the size of the plant cells as measured experimentally (Kondorosi et al., 2000). Although the plant cells are usually characterized by irregular, angular shapes, oval cell shape was chosen for the modelling. This was done because the higher steep number of the edges end up inaccurately forming the finite element mesh, leading to the software errors during the integration of Laplace equations (Teissie, 2017). However, previous studies have shown that solution of Laplace equations using, “Comsol Multiphysics” software allow the numerical calculation of TMP induced on the membrane of a spheroidal cell (Kotnik et al., 2009; Pucihar et al., 2009a).

Due to the restrictions of finite element mesh listed above, the thickness of cell tonoplast membranes in the model were set to 15 nm. This value is three times larger than 3–5 nm membrane thickness observed experimentally and used in standard numerical models of TMP models, (Pauly and Schwan 1959).

The results from previous studies show that magnitude of TMP induced on the cell membrane directly depends on the electric conductivity of the external medium (Pucihar et al., 2001; Pavlin and Miklavčič, 2003; Schmeer et al, 2004; Pavlin et al., 2005). However, the studies which define the relationship between the conductivity of the external medium and the magnitude of the TMP induced on vacuole tonoplast have not been carried out so far. However, it is known that the diffusive exchange of ions and molecules (both small and large) happens through electric field induced conductive pores happens immediately PEF treatment (Puc et al., 2003; Pucihar et al., 2008;). Therefore, it is feasible that the conductivity of the external medium would have a direct influence on the electric conductivity of the cytosol, which in turn would affect the magnitude of electric field induced TMP the vacuole tonoplast. Therefore, multiple simulation conditions mimicking the expected electric conductivity status during the electroporation were described (see Tables 4–6):

G. $\sigma_{t1} = \sigma_{c1} = \sigma_{v1}$, (Tables 4–6, conditions 1, 7, 13)

H. $\sigma_{t2} = \sigma_{t1} = \sigma_{c2} = \sigma_{c1}$; $\sigma_{v2} = \sigma_{v1}/3$, (Tables 4–6, conditions 2, 8, 14)

I. $\sigma_{t3} = \sigma_{t1} = \sigma_{v3} = \sigma_{v1}$; $\sigma_{c3} = \sigma_{c1}/3$, (Tables 4–6, conditions 3, 9, 15)

J. $\sigma_{t4} = \sigma_{t1}/3$; $\sigma_{c4} = \sigma_{c1} = \sigma_{v4} = \sigma_{v1}$, (Tables 4–6, conditions 4, 10, 16)

K. $\sigma_{t5} = \sigma_{t1}/3$; $\sigma_{c5} = \sigma_{c1}/3$; $\sigma_{v5} = \sigma_{v1}$, (Tables 4–6, conditions 5, 11, 17)

L. $\sigma_{t6} = \sigma_{t1}/3$; $\sigma_{c6} = \sigma_{c1}/3$; $\sigma_{v6} = \sigma_{v1}/3$, (Tables 4–6, conditions 6, 12, 18)

The electric parameters of electroperated cell model are shown in Table 3.

Table 3. *Electric parameters of the electroperated cell model*

Electric parameter	Values
Vacuole conductivity (σ_v)	See Tables 4–6
Tonoplast conductivity	$1 \cdot 10^{-8} \text{ S m}^{-1}$
Cytosol conductivity (σ_c)	See Tables 4–6
Conductivity of cell membrane	$1 \cdot 10^{-8} \text{ S m}^{-1}$
Conductivity of external medium (σ_t)	See Tables 4–6
Conductivity of electrodes	$1.74 \cdot 10^6 \text{ S m}^{-1}$
Dielectric constant of vacuole (ϵ_r)	80
Dielectric constant of tonoplast (ϵ_r)	3.2
Dielectric constant of cytosol (ϵ_r)	80
Dielectric constant of cell membrane (ϵ_r)	3.2
Dielectric constant of cell medium (ϵ_r)	80
Dielectric constant of electrodes (ϵ_r)	1
Pulse voltage	1000 V

Note. During all simulations, the electric parameters of the pores on the cell membrane are the same as the electric parameters of the external medium, and the electric parameters of the pores on tonoplast membrane pores are the same as the parameters of cell cytosol

Results from the previous studies have shown that the largest cell membrane surface is electroperated after the first pulse, pulse train or sequence (Son et al., 2016). Therefore, 1 pulse with 100 μs duration was chosen for this modelling.

In the further development of the model, separate geometric areas were defined as substances. The biophysical characteristics of external medium, cytosol and vacuole were described to be equivalent to those of water, and those of the membranes (cell membrane and vacuole tonoplast) were described to be equivalent to those of the olive oil. After this, the finite element mesh was calibrated to solve fluid dynamics tasks.

The finite element mesh was composed of 1 680 476 surface elements – free triangles. The minimum size of an element was 222 μm , and the maximum size of an element was 7.79 μm . The mesh has been pre-defined in the fine elements regime (Fig. 11).

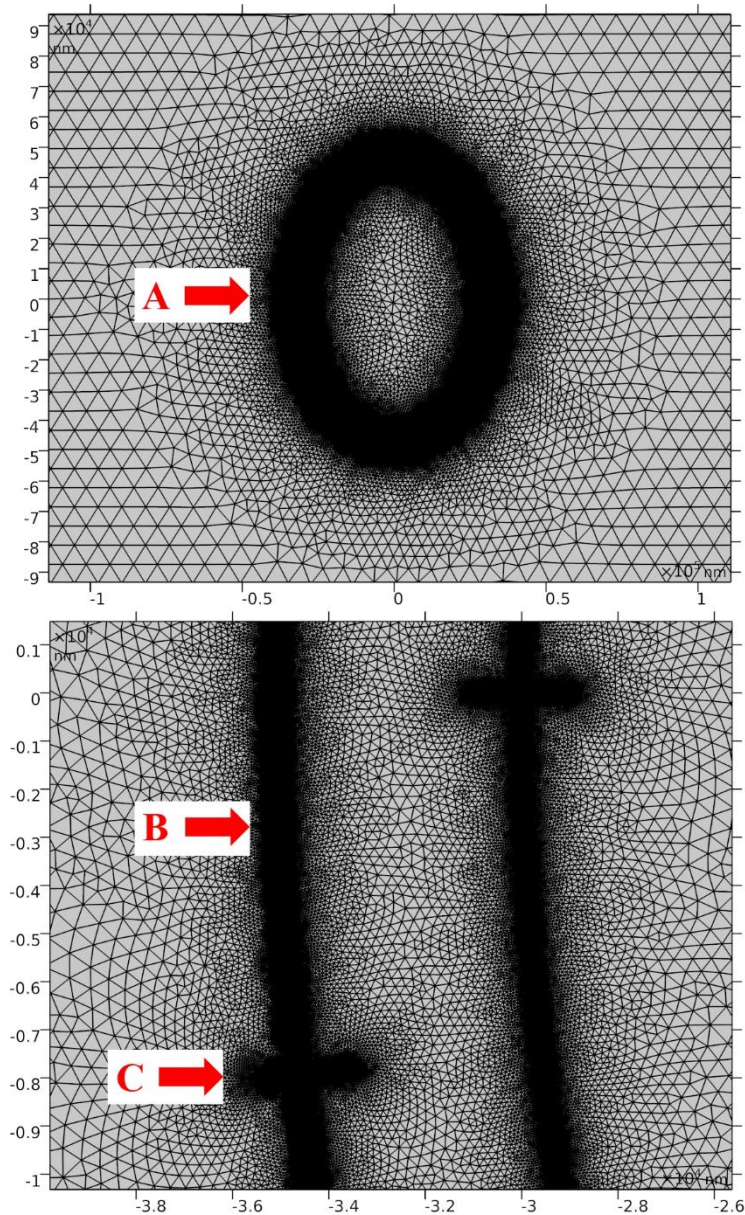


Fig. 11. The finite element mesh of cell A), cell membrane B) and the conductive pore C)

In order to increase the reliability of the results of the calculations, the conductivities were selected based on the experimentally measured electric conductivity of red beetroot, blueberry and chilli pepper juice. According to these measurements, the electric conductivity of the red beet (cv. 'Kestrel H '), blueberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and chilli peppers (cv. 'Habanero') was 1.46, 0.29 and 0.76 S m⁻¹, respectively. Six simulation conditions per cell type were described. Each of those had a different electric conductivity regime. The parameters used for each simulation are described in Tables 4–6. The same numbers of modelling conditions will be used in the TMP graphs shown below (Fig. 12–14).

Table 4. The electrical conductivities of beetroot cell compartments

Number of modelling condition	$\sigma_t, S m^{-1}$	$\sigma_c, S m^{-1}$	$\sigma_v, S m^{-1}$
1	1.46	1.46	1.46
2	1.46	1.46	0.48
3	1.46	0.48	1.46
4	0.48	1.46	1.46
5	0.48	0.48	1.46
6	0.48	0.48	0.48

Table 5. The electrical conductivities of blueberry cell compartments

Number of modelling condition	$\sigma_t, S m^{-1}$	$\sigma_c, S m^{-1}$	$\sigma_v, S m^{-1}$
7	0.28	0.28	0.28
8	0.28	0.28	0.09
9	0.28	0.09	0.28
10	0.09	0.28	0.28
11	0.09	0.09	0.28
12	0.09	0.09	0.09

Table 6. The electrical conductivities of the chili pepper cell compartments

Number of modelling condition	$\sigma_t, S m^{-1}$	$\sigma_c, S m^{-1}$	$\sigma_v, S m^{-1}$
13	0.76	0.76	0.76
14	0.76	0.76	0.25
15	0.76	0.25	0.76
16	0.25	0.76	0.76
17	0.25	0.25	0.76
18	0.25	0.25	0.25

According to Schwan equation (Schwan, 1957), the magnitude of the transmembrane potential induced on a spherical cell membrane is linearly dependent on the cell shape (f), electric field strength (E, V/m), cell radius (r, μm) as well as on the angle between the cell normal and the electric field lines (θ).

However, the linear Schwan equation is no longer valid when the cell shape is irregular or when the high voltage pulse duration is in the order of nanoseconds (Gimsa and Wachner, 2001; Valič et al., 2003). In this case, the magnitude of the TMP is calculated using Laplace equations (Valič et al., 2003). Dependently on the direction of the electric field lines the position of the cell relative to these lines, the TMP may be several times larger than the one calculated by Schwan equation for a spherical cell (Kotnik, 2016).

It is experimentally known that the threshold of transmembrane potential on biological cells at which the electroporation process happens can range from 0.2 to 1 V (Teissié and Rols, 1993; Weaver, 2003). However, given that the thickness of the phospholipid membrane may vary depending on the type of lipids and the influence of abiotic stressors (Karp and Marshall, 2013), it can be assumed that the TMP measured at a given point in the membrane may be greater than in the conductive pore area. Therefore, the TMP of the cell membrane and vacuole tonoplast obtained in this study are calculated at equal distances from the permeable pores at the evaluation points (yellow) (Fig. 10). The results of the TMP analysis are shown in Fig. 12–14.

➤ Simulation results for the electroporated red beetroot cell:

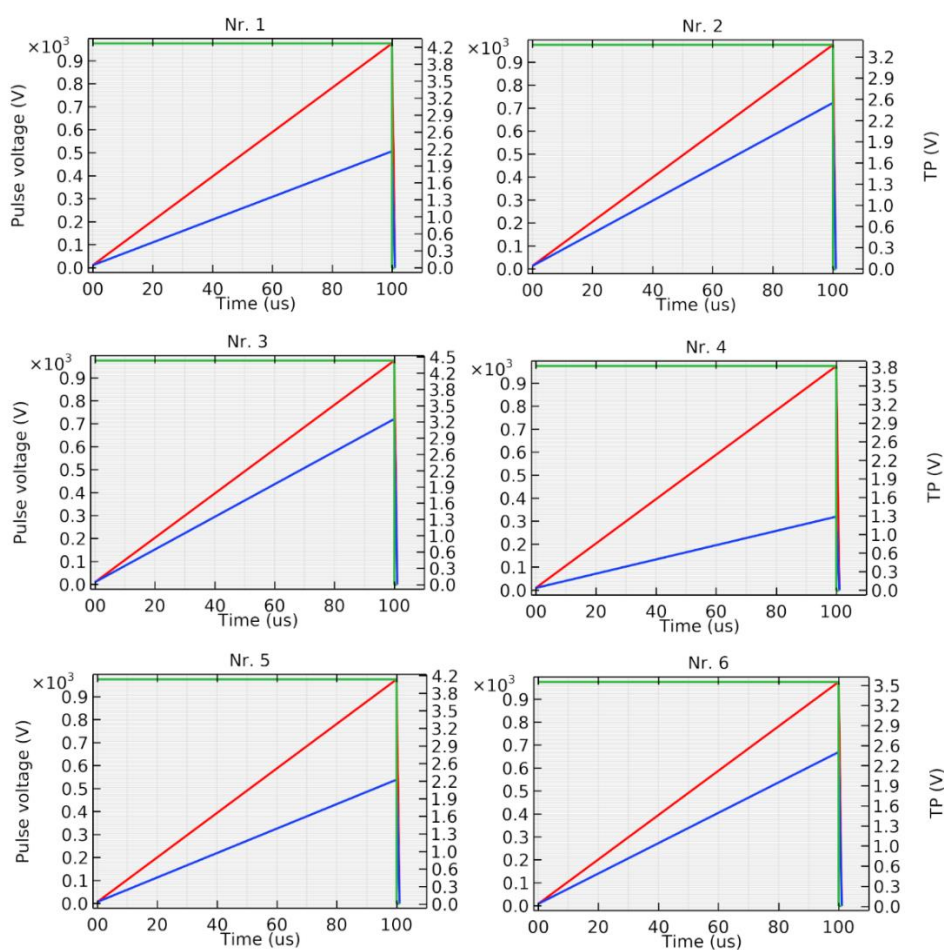


Fig. 12. The simulated transmembrane potential (TP) on beetroot cell membrane (red line) and tonoplast (blue line). The 1000 V voltage and 100 μs duration pulse is depicted as green line

➤ Simulation results for the electroperated blueberry fruit cell:

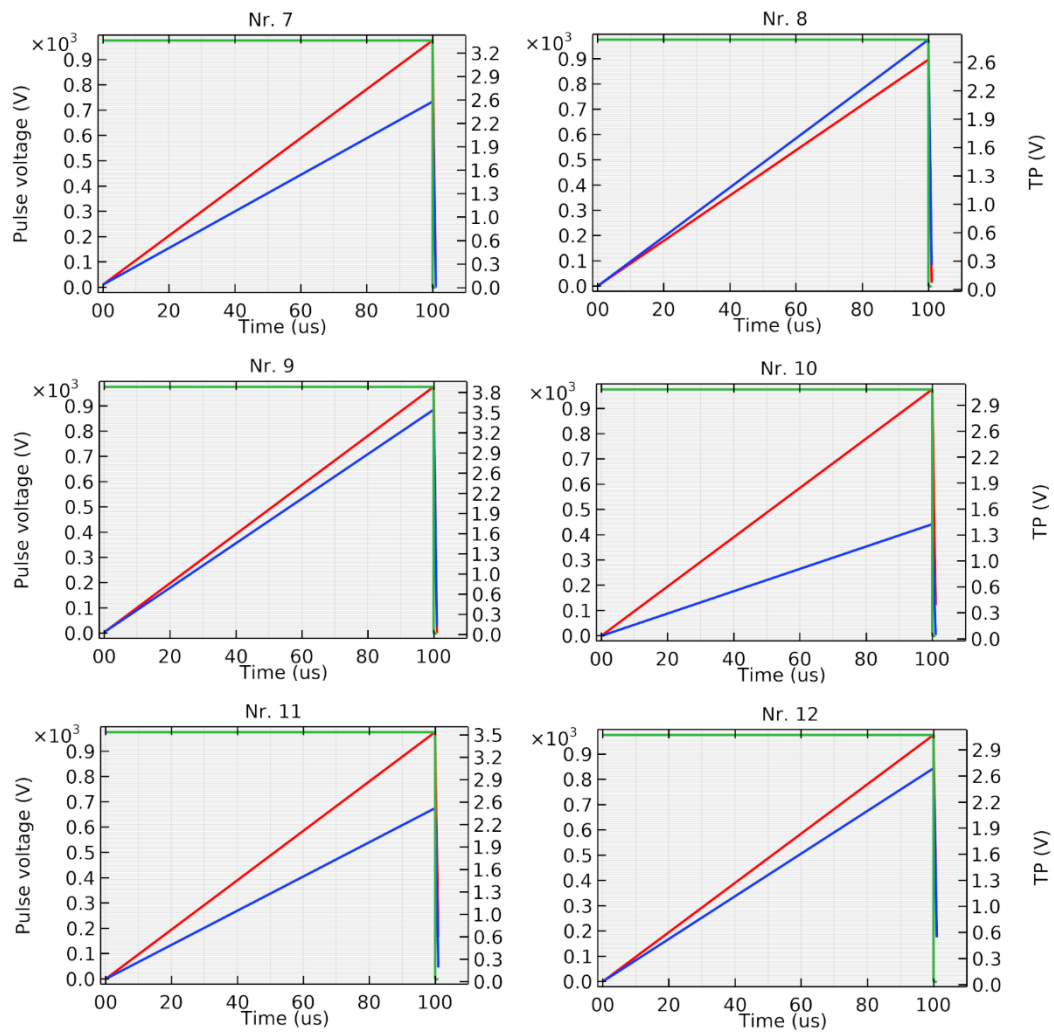


Fig. 13. The simulated transmembrane potential (TP) on the blueberry cell membrane (red line) and tonoplast (blue line). The 1000 V voltage and 100 μs duration pulse is depicted as green line

➤ Simulation results for the electroporated chili pepper cell:

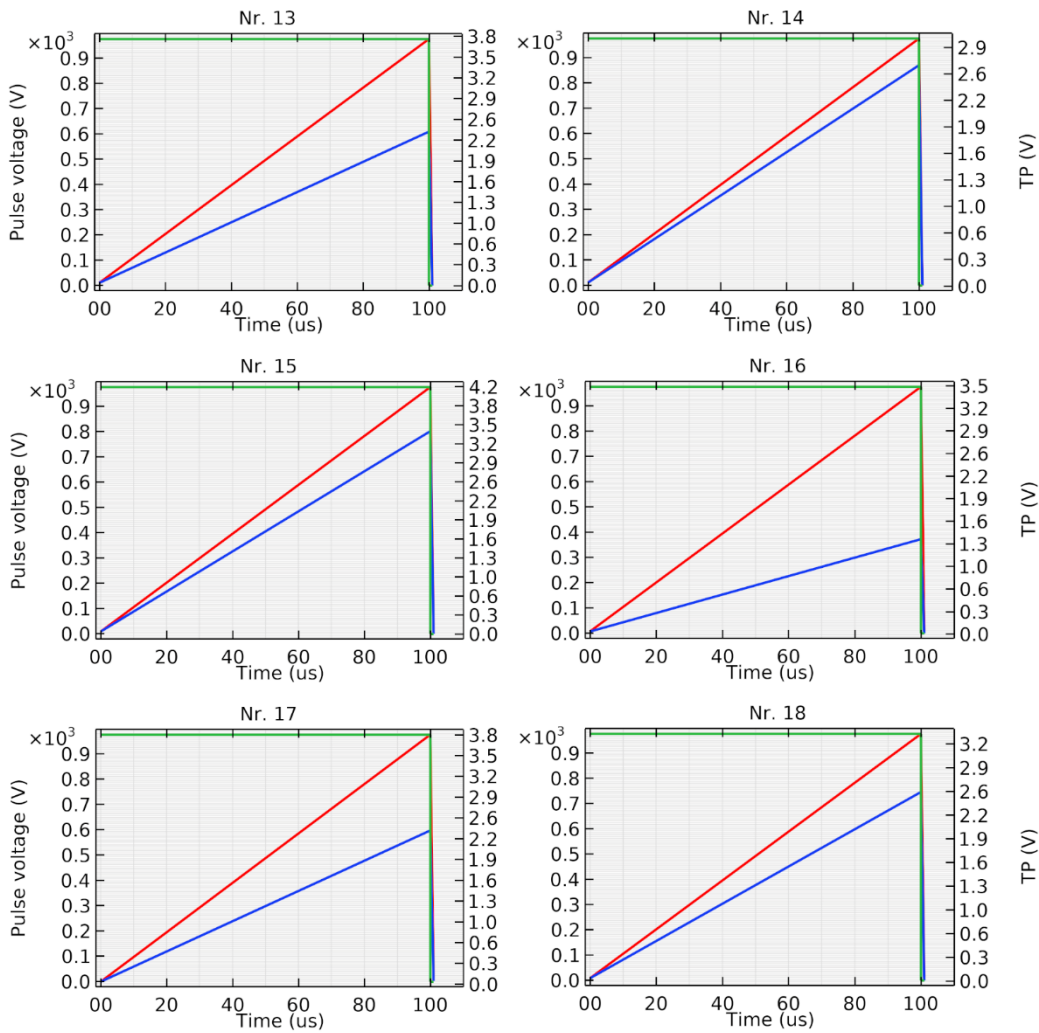


Fig. 14. The simulated transmembrane potential (TP) on chili pepper cell membrane (red line) and tonoplast (blue line). The 1000 V voltage and 100 μs duration pulse is depicted as green line

Summarizing the results of the TMP analysis of beetroot, blueberry and chili pepper cells, it can be observed that, when the cell conductivity of the outer medium, cytosol and vacuole is the same ($\sigma_t = \sigma_c = \sigma_v$), the TMP induced on the cell membrane increases linearly with the electrical conductivity of the external medium. However, in these conditions the TMP induced on the tonoplast increases when the conductivity of external medium, cytosol and the vacuole decreases. Given that the number of conductive pores in this electroporated cell model is finite, which is limiting transmembrane current, it can be assumed that the increase in the induced TMP indicates a potentially greater efficiency of membrane electroporation. Therefore, the efficiency of tonoplast electroporation increases with decreasing electric conductivity on both sides of the cell membrane and vacuolar tonoplast. However, TMP induced on the tonoplast also changed with the change in the electric conductivity ratio.

Given that cells in a vacuole have a higher concentration of ions and charged molecules, it can be assumed that the electric conductivity inside the vacuole will be higher than that in the cytosol. This means that the results of analyses No. 4 (beetroot, Fig. 12), No. 10 (blueberry, Fig. 13) and No. 16 (chilli pepper, Fig. 14) are most likely to be reflective of the experimental situation. It is interesting to note that in specific conditions (No. 8, $\sigma_t = \sigma_c = 0,28$; $\sigma_v = 0,09$, see Fig. 12), the transmembrane potential, and, correspondingly, electroporation efficiency of the tonoplast membrane can become higher than that of the cell membrane. However, similar modelling conditions for the different plants (No. 2 and No. 14), where the electric conductivities were higher across the board, lead to lower transmembrane potential, and, presumably, lower electroporation efficiency of the tonoplast. This allows the conclusion that the electroporation of each plant tissue is different, and optimizations for that specific tissue have to be performed in order to achieve efficient electroporation and extraction of the intracellular compounds.

CONCLUSIONS

1. Treatment of blueberry berries (*Vaccinium myrtillus* L.) with different PEFs at the given specific energy levels showed that exposure to 1 kJ kg^{-1} PEF increased the yield of blueberry juice by 32%, total anthocyanin content in juice by 55 %, and total anthocyanin content in press cake extract by 75 %.
2. Treatment of blueberry berries (*Vaccinium myrtillus* L.) with different PEFs at the given specific energy levels showed that exposure to 10 kJ kg^{-1} PEF increased the antioxidant activity of the juice and press cake extract by 40.5% and 108.6%, respectively.
3. The PEF effect on the efficiency of capsaicin and dihydrocapsaicin extraction from the placenta of *Capsicum annum* L. was found to be higher in distilled water (pH 5.8) and lower in ethanol (96%, v/v). After PEF pulses with 1.1 kJ kg^{-1} specific energy and 3 kV cm^{-1} strength and aqueous extraction, the capsaicin and dihydrocapsaicin yield increased by 200 and 211%, respectively, in comparison to PEF untreated control. However, after the PEF pulses with 12.8 kJ kg^{-1} specific energy and 3 kV cm^{-1} strength and ethanol extraction, the yield of capsaicin and dihydrocapsaicin increased only by 29 and 21 %, respectively.
4. The treatment of red beet (*Beta vulgaris* L.) with PEF showed that the extraction efficiency of betaxanthin and betacyanin mainly depends on the PEF strength and the specific amount of energy provided, whereas the positive effect of the electrical pulse number the extraction yield of these biologically active compounds is only significant when the PEF strength is less than 1 kV cm^{-1} .
5. After treatment of red beet (*Beta vulgaris* L.) with different PEF conditions, the condition with specific energy content of 2.53 kJ kg^{-1} and PEF strength of 2 kV cm^{-1} was found to be optimal in

terms of betaxanthin and betacyanin extraction efficiency and energy consumption of. There was a direct relationship between the electric conductivity of the extract and the yield of betalaines, but an inverse relationship between the yield of these compounds (obtained after exposure to the same specific amount of energy and different PEF strength) and the cell disintegration index.

6. The results obtained by mathematical modelling showed that the magnitude of transmembrane potential induced on a vacuole tonoplast depends on the electrical conductivity of the cell external medium.

A LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION

Articles in periodical scientific publications with a citation index according to Clarivate Analytics Web of Science

1. Pataro, G., Bobinaitė, R., Bobinas, Č., Šatkauskas, S., Raudonis R., **Visockis, M.**, Ferrari, G., Viškelis, P. (2017). Improving the extraction of juice and anthocyanins from blueberry fruits and their by-products by application of pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 10 (9), 1595–1605. DOI: 10.1007/s11947-017-1928-x.

Articles in periodical scientific publications without a citation index according to Clarivate Analytics Web of Science

2. Bobinaitė, R., Pataro, G., **Visockis, M.**, Bobinas, Č., Ferrari, G., Viškelis, P. (2017). Potential application of pulsed electric fields to improve the recovery of bioactive compounds from sour cherries and their by-products. *FOODBALT 2017: 11th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food science and technology in a changing world" FOODBALT 2017*, Jelgava, Latvia, 27–28 April 2017, 70–74.

Articles in periodical scientific publications according to other databases

1. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Šatkauskas, S., Bobinaitė, R. (2016). Matematinio modeliavimo įrankiai elektroporacijos proceso optimizavimui (Apžvalga). *Sodininkystė ir daržininkystė*, 35 (1–2), 61–74.

PARTICIPATION IN CONFERENCES

1. **Visockis, M.**, Bobinaitė, R., Šatkauskas, S., Pataro, G., Ferrari, G., Viškelis, P. (2016). The Influence of Pulsed Electric treatments on juice yield and extraction of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus*). *Proceedings of 3rd School on PEF processing of food*. March 21–24, Dublin, Ireland, p. 188.

2. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Viškelis, P., Šatkauskas, S., Markevičius, V. (2016). Optimisation of 30 kV power pulsed electric field system. *1st International Conference on the Scientific Actualities and Innovations in Horticulture 2016, Program and Abstracts*. June 2–3. Kaunas, Lithuania.
3. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šatkauskas, S. (2016). Power Pulsed Electric Field Modulator with Capability of Pulse Shape Modifications. *EAPPC with BEAMS and MEGAGAUSS, Proceedings*, September 18–22, Caiscais and Estoril Coast, Portugal, 282.
4. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Markevičius, V., Šatkauskas, S. (2016). The influence of self-learning mathematically control algorithm on the PEF modulator output characteristics. *Proceedings of the Electroporation – based Technologies and Treatments*. November 13–19, Ljubljana, Slovenia, 123.
5. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Šatkauskas, S., Narbutas, S. (2017). Comparison of apple (*Malus domestica*) tissue permeabilization by means of both pulsed electric field generated by monopolar or bipolar pulses. *4th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology*. May 9–12, Vienna, Austria.
6. **Visockis, M.**, Viškelis, P., Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Markevičius, V., Šatkauskas, S. (2017). 1.2 kV unipolar/bipolar electroporation device designed to improve electropermeabilization. *2nd World Congress on Electroporation. Program and Book of Abstracts*. September 24–28, Norfolk, USA, 194.
7. Bobinaitė, R., Pataro, G., **Visockis, M.**, Bobinas, C., Ferrari, G., Viškelis, P. (2017). Potential application of pulsed electric fields to improve the recovery of bioactive compounds from sour cherries and their by-products. *11th Baltic Conference on Food Science and Technology “Food science and technology in a changing world” FOODBALT 2017*. April 27–28. Jelgava, Latvia.
8. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Ruzgys, P., Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šatkauskas, S. (2018). Evaluation of the industrial relevance of Pulsed Electric Field on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L) tubers. *5th PEF School*, May 14–18, Osnabruck-Quakenbruck, Germany.
9. **Visockis, M.**, Barakauskas, J., Ruzgys, P., Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šatkauskas, S. (2019). The dependence of the PEF treatment time and the efficacy of the betalains extraction from the red beetroot shreds with respect to the electrical energy input. *6th PEF School, Applications in Food and Biotechnology*, 2–8 June, Cesena, Italy.
10. **Visockis, M.**, Bobinaitė, R., Barakauskas, J., Ruzgys, P., Markevičius, V., Šatkauskas, S., Viškelis, P. (2019). The comparison of cell disintegration index and the conductivity of the extract in terms of the PEF-assisted aqueous extraction of betalains. *3rd World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, Food and Environmental Technologies. Program and Book of Abstracts*. September 2–7, Toulouse, France, 183.

CURRICULUM VITAE

Mindaugas Visockis

Date of Birth: 14th May 1990, Tauragė

E-mail: m.visockis@lsdi.lt

Education

2015–2019 Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture. Doctoral studies in Agricultural Sciences, Agronomy.

2013–2015 Kaunas University of Technology, Faculty of Electrical and Electronics Engineering. Gained Master degree in Biomedical Engineering.

2009–2013 Kaunas University of Technology, Faculty of Telecommunications and Electronics. Gained Bachelor degree in Electronic Engineering.

Workshops and International Schools

3–7 June 2019. 6th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology, University of Bologna, Cesena, Italy.

14–18 May 2018. 5th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology. University of Applied Sciences Osnabrück, German Institute of Food Technologies (DIL) and Elea, Osnabrück and Quakenbrück, Germany.

9–12 May 2017. 4th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology. University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria.

21–24 March 2016. 3rd School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology. University College Dublin, Dublin, Ireland.

13–19 November 2016. 10th International Scientific Workshop and Postgraduate Course “Electroporation-Based Technologies and Treatments”. University of Ljubljana and Institute of Oncology, Ljubljana, Ljubljana, Slovenia.

Membership in Scientific Organizations

2017 until now – a member of ISEBBT (International Society for Electroporation Based Technologies and Treatments).

PADĖKA

Esu nuoširdžiai dėkingas visiems, padėjusiems parengti šią daktaro disertaciją.

Labiausiai norėčiau padėkoti savo vadovui prof. dr. Pranui Viškeliui už supratingumą ir visapusę pagalbą doktorantūros studijų metu. Ypač dėkoju dr. Ramunei Bobinaitei už suteiktą pagalbą tada, kai jos reikėjo labiausiai. Esu labai dėkingas prof. dr. Sauliui Šatkauskui už profesionalias mokslines konsultacijas ir optimizmą studijų metu.

Taip pat norėčiau padėkoti Justinui Barakauskui už produktyvias inžinerines diskusijas, dr. Pauliui Ruzgiui – už geranoriškumą ir vertingus patarimus.

Dėkoju prof. dr. Gabijai Bankauskaitei ir dr. Mildai Jakutavičiūtei už pagalbą redaguojant disertacijos tekstą.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai – mamai ir tėčiui, sesei Sandrai, broliams Mantui ir Jonukui už meilę ir palaikymą.