



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Kiekybinis bioaktyviųjų junginių ir antioksidacinio
aktyvumo įvertinimas bei palyginimas ežiuolės (lot.
Echinacea), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*)
augaluose *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Agnė Jagminienė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Kiekybinis bioaktyviųjų junginių ir antioksidacinio
aktyvumo įvertinimas bei palyginimas ežiuolės (lot.
Echinacea), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*)
augaluose *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Agnė Jagminienė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Neringa Petrašauskienė

Recenzentė

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Agnė Jagminienė

Kiekybinis bioaktyviųjų junginių ir antioksidacinio aktyvumo įvertinimas bei palyginimas ežiuolės (lot. *Echinacea*), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*) augaluose *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Agnės Jagminienės, baigiamasis projektas tema „Kiekybinis bioaktyviųjų junginių ir antioksidacinio aktyvumo įvertinimas bei palyginimas ežiuolės (lot. *Echinacea*), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*) augaluose *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Agnė Jagminienė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Jagminienė, Agnė. Kiekybinis bioaktyviųjų junginių ir antioksidacinio aktyvumo įvertinimas bei palyginimas ežiuolės (lot. *Echinacea*), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*) augaluose *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *in vitro*, ežiuolė, gvazdikinis serentis, paprastasis kietis, kartusis kietis, vaistinis kietis, kaliaus kultūros, antibakterinis, antioksidacinis.

Kaunas, 2020. 68 p.

Santrauka

Magistro baigiamajame projekte aptariama ežiuolės (lot. *Echinacea*), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*) augalų *in vivo* ir kaliaus kultūrų *in vitro* antioksidacinis aktyvumas bei bioaktyvieji junginiai. Šie vaistiniai augalai pasižymi priešvėžinėmis, priešuždegiminėmis, antibakterinėmis, antioksidacinėmis savybėmis. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad intensyviausias kaliaus kultūros *in vitro* formavimasis buvo vaistinio kiečio iš lapų. Didžiausias prieaugis buvo nustatytas MS terpėje su augimo hormonais BAP 2,5 mg/l + NAR 0,5 mg/l. Rezultatai parodė, kad didžiausios koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: chlorofilo *a* (171,63 mg/100mg) ir karotinoidų (56,73 mg/100mg) gvazdikinio serenčio lapuose, chlorofilo *b* vaistiniame kietyje *in vivo* (62,13 mg/100mg). Pagal DPPH metodą, didžiausią antioksidacinę aktyvumą parodė paprastojo kiečio lapų *in vivo* ekstraktas (92,41 %), naudojant FRAP metodą – gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* ekstraktas (630,94 μmol/l). Antioksidantinių fermentų didžiausią aktyvumą parodė vaistinio kiečio kaliaus kultūros *in vitro* iš lapų ekstraktai: katalazės (1232,13 vnt/mg), superoksido dismutazės (2,08 vnt/mg) ir askorbatperoksidazės (0,23 mmol/mg). Didžiausia *L*-prolino koncentracija buvo nustatyta karčiojo kiečio stiebų *in vivo* ekstrakto (84,50 μmol/g). Daugiausia fenolinių junginių sukaupė karčiojo kiečio stiebų *in vivo* (2,86 mg/100mg) bei vaistinio kiečio *in vitro* (5,92 mg/100mg) ekstraktai. Intensyviausiomis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo gvazdikinio serenčio lapų ekstraktas prieš bakterijų kultūras *Xanthomonas campestris* ir *Escherichia coli*.

Jagminienė, Agnė. Evaluation and Comparison of Quantitative Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in *Echinacea*, *Artemisia*, *Tagetes* Plants *in Vivo* and Callus Cultures *in Vitro*. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: *in vitro*, callus cultures, antibacterial, antioxidation, *Artemisia dracunculus* L., *Tagetes erecta* L., *Artemisia absinthium* L., *Artemisia vulgaris* L. *Echinacea purpurea* L.

Kaunas, 2020. 68 p.

Summary

The final thesis aims at describing and analyzing the following research issue related with *Echinacea*, *Artemisia*, *Tagetes* plants *in vivo* and callus cultures *in vitro*, antioxidant activity and determination of quantities of bioactive compounds. These medicinal plants have anti-cancer, anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant properties. The research showed that the most intense callus culture *in vitro* formation was of *Artemisia dracunculus* L. from the leaves in MS medium with growth hormones BAP 2.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l. The results showed that the highest concentrations of pigments were found in the extracts: chlorophyll *a* (171.63 mg/100mg) and carotenoids (56.73 mg/100mg) in *Tagetes erecta* L. leaves, chlorophyll *b* in *Artemisia dracunculus* L. *in vivo* (62.13 mg/100mg). According DPPH method, the highest antioxidant activity was shown *in vivo* extract of *Artemisia vulgaris* L. leaves (92.41 %), using FRAP method – *in vivo* extract of *Tagetes erecta* L. (630.94 μmol/l). The highest activities of antioxidant enzymes were shown of *Artemisia dracunculus* L. callus cultures: catalase (1232.13 units/mg), superoxide dismutase (2.08 unit/mg) and ascorbate peroxidase (0.23 mmol/mg). The highest concentration of *L*-proline was found *in vivo* extract of *Artemisia absinthium* L. (84.50 μmol/g). The highest amount of the total amount of phenolic compounds was accumulated in *Artemisia absinthium* L. *in vivo* (2.86 mg/100mg) and *Artemisia dracunculus* L. (5.92 mg/100 mg) extracts. The most intensive antibacterial properties were characterized in *Tagetes erecta* L. extracts of leaves against bacterial cultures of *Xanthomonas campestris* ir *Escherichia coli*.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	7
Įvadas	8
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Astrinių šeimos apibūdinimas	10
1.1.1. Rausvažiedės ežiuolės (lot. <i>Echinacea purpurea</i> L.) apibūdinimas	10
1.1.2. Vaistinio kiečio (lot. <i>Artemisia dracuncululus</i> L.) apibūdinimas	12
1.1.3. Karčiojo kiečio (lot. <i>Artemisia absinthium</i> L.) apibūdinimas	14
1.1.4. Paprastojo kiečio (lot. <i>Artemisia vulgaris</i> L.) apibūdinimas	15
1.1.5. Serenčio (lot. <i>Tagetes erecta</i> L.) apibūdinimas	16
1.2. Kaliaus kultūrų apibūdinimas	17
1.2.1. Augimo fitohormonai	18
1.2.2. Augalų pirminiai metabolitai	19
1.2.3. Antriniai metabolitai	20
1.2.4. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų antioksidacinis aktyvumas	20
1.2.5. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūros <i>in vitro</i> bioaktyvumo tyrimai	21
1.2.6. Liuteinas	24
1.2.7. Karotinoidai	25
1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	26
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	27
2.1. Tyrimuose naudotos įrangos sąrašas	27
2.2. Tyrimuose naudoti reagentai	27
2.3. Sėklų sterilinimas	27
2.4. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas	27
2.5. Augimo reguliatorių paruošimas	28
2.6. Tiriamųjų junginių tyrimų metodika	28
2.6.1. Vaistinių augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	28
2.6.2. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną ²⁹	
2.6.3. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų nustatymas augaluose	29
2.6.4. Bendras fenolinių junginių nustatymas Folino-Kiokalto metodu	30
2.6.5. Katalazės aktyvumo nustatymas	31
2.6.6. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas	31
2.6.7. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas	32
2.6.8. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas	33

2.6.9. <i>L</i> -Prolino koncentracijos nustatymas.....	33
2.6.10. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose	34
2.6.11. Flavonoidų koncentracijos nustatymas augaluose	34
2.6.12. Liuteino koncentracijos nustatymas augaluose	35
2.6.13. Antibakterinis tiriamųjų junginių nustatymas	35
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	37
3.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą	37
3.2. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas augaluose.....	38
3.3. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną.....	41
3.4. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu.....	43
3.5. Katalazės aktyvumo įvertinimas	45
3.6. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas	46
3.7. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas	47
3.8. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas	49
3.9. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas	50
3.10. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose.....	51
3.11. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas augaluose	52
3.12. Liuteino koncentracijos įvertinimas augaluose.....	54
3.13. Antibakterinis augalų ekstraktų įvertinimas	55
4. Rekomendacijų dalis	59
Išvados.....	62
Literatūros sąrašas.....	63

Santrumpų ir terminų sąrašas

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia;

LB – Luria-Bertani terpė;

MS – Murashige ir Skoog terpė;

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;

MDA – malondialdehididas;

BAP – 6-benzilaminopurinas.

Įvadas

Astrinių augalų šeimos Lietuvoje priklauso daugiau nei 183 rūšys. Didžioji dalis augalų gali būti priskiriami vaistiniams augalams tik dėl jiems būdingų savybių. Jie pasižymi antioksidacinėmis, antibakterinėmis, priešvėžinėmis, prieuždegiminėmis savybėmis. Svarbiausi trys augalai, pasižymintys vaistinėmis savybėmis yra: rausvažiedė ežiuolė, vaistinis, kartusis ir paprastas kietis bei gvazdikinis serentis. Rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) šaknys vaistams naudojamos daug dažniau nei žiedynai. Jas panaudoti galima tinktūroms, ekstraktams ir milteliams gaminti. Šaknyse gausu eterinių aliejų, polisacharidų, dervų. Dervos pasižymi antiseptinėmis ir fungicidinėmis savybėmis, kurios stiprina imuninę sistemą (didina atsparumą užkrečiamosioms ligoms, ypač gripui). O augale esantys glikozidai – slopina bakterijų ir virusų dauginimąsi. Mokslininkai atlikę *in vitro* tyrimus nustatė, kad preparatai veiksmingi prieš virusus, sukeliančius pūslelinę. Taip pat nustatyta, jog naudojant šio augalo ekstraktus padidėja fagocitų aktyvumas, dėl to svetimkūniai žmogaus organizme yra suvirškinami [1, 2]. Paprastojo kiekčio (lot. *Artemisia vulgaris* L.) augaluose randama eterinio aliejaus, flavonoidų, kurie yra bioaktyvūs antioksidantai. Taip pat yra kumarinų ir fitosterolių, kurie veikia panašiai kaip moters hormonas – estrogenas. Kinų mokslininkai nustatė, kad kiekčio preparatai slopina bakterijų dauginimąsi. Šiais augalų ekstraktais gydomi odos uždegimai, reumatas, labai naudingi preparatai karščiavimui mažinti. Taip pat kietyje esantis eterinis aliejus ir seskviterpenų laktonai yra naudojami nuo paratizuojančiųjų kirmėlių esančių žmogaus žarnyne [3, 2]. Vaistinio kiekčio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) augaluose pagrindinės naudojamos dalys yra krūmų viršūnėlės. Šis augalas pasižymi jame esančiu eteriniu aliejumi, kartumynais, dervinėmis bei rauginėmis medžiagomis. Jis padeda nuo kraujagyslių ligų ir yra gera prevencinė priemonė apetitui gerinti. Vaistinis kietis padeda lengvinti žmogaus kvėpavimą ir įsisavinti reikiamus vaistus bei gerina miego kokybę [2]. Karčiojo kiekčio (lot. *Artemisia absinthium* L.) augale, kaip ir vaistiniame kietyje gausu rauginių medžiagų, flavonoidų, eterinio aliejaus, kartumynų. Šis kietis pasižymi prieuždegiminiu, antimikrobinu poveikiu, didina prakaitavimą, kuris palengvina karščiavimą. Karčiojo kiekčio preparatai yra skiriami parazitinėms kirmėlėms naikinti, esančių žmogaus žarnyne. Jį galima naudoti gydyti atviras žaizdas, sumušimus ar šalinti nemalonų burnos skonį ir kvapą [2, 4]. Gvazdikinis serentis (lot. *Tagetes erecta* L.) yra svarbus ne tik dėl eterinių aliejų pritaikymo maisto pramonėje, bet ir dėl savo vaistinių savybių. Dažniausiai naudojama augalo dalis – žiedynai. Jie pasižymi labai dideliu liuteino kiekiu, kurio didžioji dalis randama žiedynuose dėl intesyvios geltonai oranžinės spalvos. Liuteino šaltiniu gali būti ir lapai, kurie irgi pasižymi didesne liuteino bei karotinoidų koncentracija. Liuteinas yra antioksidantų šaltinis, pasižymintis priešuždegiminėmis savybėmis ir naudojamas vaistuose, kurie padeda mažinti katarakto priepuolius ir akių geltonosios dėmės degeneracijos riziką. Tai puiki priemonė nuo vėžio, širdies ir kraujagyslių ligų. Dėl galimybių iš serencio išskirti svarbius bioaktyvius junginius ir juos panaudoti vaistiniams preparatams yra tinkami detalesniems tyrimams, kurie gali būti naudingi naudojant *in vitro* kaliaus kultūras. Tai padidina galimybes patikimai metabolitų sintezei bei norimoms bioaktyvioms medžiagoms išskirti [2, 5, 6].

Tyrimo tikslas – kiekybiškai įvertinti ir palyginti bioaktyvius junginius bei antioksidacinį aktyvumą ežiulės (lot. *Echinacea*), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*) augaluose *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*.

Tyrimo uždaviniai:

1. suformuoti tiriamųjų augalų kaliaus kultūras *in vitro*;
2. nustatyti ir įvertinti tiriamųjų augalų kaliaus kultūrose *in vitro* ir augaluose *in vivo*:
 - a) pigmentų (chlorofilo *a*, *b* bei karotinoidų) koncentracijas;
 - b) antioksidacinį aktyvumą, FRAP, DPPH metodais ir redukcines (antioksidacines) savybes;
 - c) antioksidacinį fermentinį aktyvumą: superoksido dismutazės, katalazės ir askorbatperoksidazės;
 - d) bendrųjų fenolinių junginių, flavonoidų, *L*-prolino, MDA koncentracijas;
3. įvertinti tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinį aktyvumą, naudojant *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* ir *Bacillus subtilis* bakterijas;
4. pateikti siūlomą liuteino gamybos iš vaistinio kiečio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* aparatūrinę schemą.

1. Literatūros apžvalga

Šioje dalyje bus analizuojama mokslinėje literatūroje ir duomenų bazėje pateikiama informacija apie Astrinių augalų šeimą. Didesnis dėmesys bus nukreiptas į ežiuolės (lot. *Echinacea*), kiekio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*) genties tiriamuosius augalus. Taip pat šiame skyriuje aptariamos šių augalų cheminės bei gydomosios savybės. Pateikiama informacija apie tam tikrus svarbius metabolitus ir bioaktyvius junginius.

1.1. Astrinių šeimos apibūdinimas

Astriniai augalai yra viena didžiausių – magnolijūnų (lot. *Magnoliophyta*) augalų šeima su daugiau nei 1620 genčių ir 23600 rūšių žolinių augalų, krūmų ir medžių (tropinio ir subtropinio klimato juostose lianos ar medžiai, tačiau anatominė sandara artimi žoliniams augalams), paplitusių visame pasaulyje. Šeima yra paplitusi visame pasaulyje, išskyrus Antarktida, tačiau ypač įvairi tropiniuose ir subtropiniuose Šiaurės Amerikos, Andų, Brazilijos rytuose, pietų Afrikoje, Viduržemio jūros regione, Centrinėje Azijoje ir pietvakarių Kinijoje. Lietuvoje žinomos 189 rūšys iš 64 genčių, kelios rūšys įrašytos į Raudonąją knygą [7, 8, 9].

Tai vienmečiai ar daugiamečiai žoliniai augalai arba maži krūmai taip pat gali būti nedideli medžiai ar vijokliai. Šaknys liemeninės, rečiau kuokštinės, kai kurie augalai su šakniastiebiais. Stiebas nešakotas arba šakotas, pasitaiko bestiebių su lapų skrotele. Žiedai susitelkę į įvairaus dydžio žiedynus, vadinamus graižais. Gali sudaryti sudėtinius žiedynus: šluoteles, netikras kekes, rutuliškas galvutes. Vaisius – lukštavaisis. Žiedus apdulkina vabzdžiai. Šeimoje yra maistinių, vaistinių, dažinių, taip pat dekoratyvinių augalų, techninių kultūrų. Astriniams augalams priklauso: paprastoji kraujažolė, kiaulpienė, medetka, ramunė, šermukšnis, ežiuolė, kietis, serentis. Rausvažiedė ežiuolė, gvazdikinis serentis, paprastasis, kartusis kietis aprašyti tolimesniuose poskyriuose [8, 9, 10].

1.1.1. Rausvažiedės ežiuolės (lot. *Echinacea purpurea* L.) apibūdinimas

Ežiuolė – *Echinacea Moench.* gentis priklauso astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimai. Gentyje yra 9 rūšys, kurios kilusios iš Šiaurės Amerikos. Genties vardą *Echinacea* pirmasis 1794 m. paminėjo C. Moenchas. *Echinacea* – nauja gentis Europoje, pirmiausiai auginta kaip dekoratyvus augalas. 1699 m. J. Banister'is ežiuolę pradėjo auginti angliškuose soduose. Tik XIX amžiaus pabaigoje ežiuolė aprašyta kaip vaistinis augalas. Ežiuolės panaudojimas vaistams Europoje ypač išpopuliarėjo 1930–1960 m [1].



1.1 pav. Rausvažiedė ežiuiolė (lot. *Echinacea purpurea* L.) [11]

Rausvažiedė ežiuiolė priklauso Astrinių šeimai. Tai yra daugiametis 60–100 cm (auginamas kultūroje – daugiau kaip 180 cm) žolinis augalas su šakotine šaknų sistema. Stiebas status, standus, apaugęs smulkiomis, trumpais plaukeliais, apatinėje dalyje apvalus, viršutiniame trečdalyje – šakotas, tuščiaviduris, šiek tiek briaunotas. Lapai pražanginiai, raukšlėtu paviršiumi, šiurkštūs, paprasti, ištisiniai, plačiai kiaušiniški arba kiaušiniškai lancetiški, širdiškais pamatais, nusmailėjusia dantyta viršūne, viršutinė pusė ryškiai žalia. Pamatiniai lapai ilgakočiai, 17–24 cm ilgio ir 6–10 cm pločio; stiebų lapai trumpesniais koteliais arba bekočiai. Pavieniai mišriažiedžiai graižai apsupti 10–20 sterilių, rausvai purpuriško raudonumo, 4–6 cm ilgio ir 0,6 cm pločio liežuviškų žiedų. Žydėjimo pradžioje jie būna horizontalioje padėtyje, o pabaigoje nusvyra žemyn. Vidiniai graižo žiedai dvilyčiai, vamzdiški, geltoni, pridengti žvynelių, žydi spirale aukštyn (akropetaliskai). Žiedynostį gaubia linijiškai lancetiški, plaukuoti ar pliki, blakstienoti skraistalapiai, sudarantys dvieilę – ketureilę skraistę. Žiedynostis žydėjimo pradžioje būna plokščias, 1,5–3,5 cm skersmens, žydėjimo metu – iškilus, 2–3,5 cm aukščio, vaisių brandos metu – kūgiškas su daugybe pažiedžių, šeriuotas. Pažiedės siaurai lancetiškos su yliškais (šerio pavidalo) tamsiai raudonos spalvos smaigaliais. Žydi liepą – rugsėjį. Vaisius – 4,0–5,5 mm ilgio pilkai rudos spalvos lukštavaisis (sėkla). Jos vaistinėje augalinėje žaliavoje sukaupiama daugiau nei 200 biologiškai aktyvių medžiagų [10].

Cheminė sudėtis:

- 0,2–2 % eterinio aliejaus, dervos, fitosterinai;
- organinės rūgštys (sočiosios ir nesočiosios);
- polisacharidai (arabinozė, manozė, ksilozė, gliukozė, lektinai ir kt);
- polifenoliniai junginiai – flavonoidai (kvercetas, kemferolio glikozidai, rutinas);
- fenilkarboninės rūgštys (kavos, cikorinė, ferulo, kumaro);
- rauginės medžiagos;
- pagrindiniai komponentai yra cikorinė rūgštis (0,6–2,1 %);
- šarminės medžiagos (0,01–0,04 %);
- poliacetileno dariniai, polisacharidai ir glikoproteinai;

- saponinai, vitaminas C [12].

Augalas taip pat kaupia alkilamidus (daugiausia izobutilo amidą), kavos rūgšties darinius (echinakozidus), flavonoidus, eterinį aliejų, kuris turtingas seskviterpenais, makroelementais, mikroelementais ir kitais junginiais Augalo sudėtyje esančios fenilkarboninės rūgštys (kavos rūgštis, cikoro rūgštis ir jų glikozidai) veikia bakteriocidiškai, analgetiškai bei aktyvina imunitetą. Cikoro rūgštis, kuri pagal cheminę struktūrą yra kavos rūgšties esteris, pasižymi didžiausiu fiziologiniu aktyvumu. Ežiuolės sudėtyje esantiems flavonoidams taip pat būdingas imunostimuliuojantis veikimas [12].

Gydomosios savybės. Iš ežiuolių pagaminti preparatai yra veiksmingi gydyti gripą, viršutinių kvėpavimo takų, šlapimo takų infekcijų sukeltus negalavimus. Jie naudojami kaip profilaktinė priemonė imuninei sistemai stiprinti, apsaugoti nuo užkrečiamų ligų ir padėti organizmui sustiprėti. Gliukoproteinai – lektinai lemia imuninę sistemą stimuliuojamąjį poveikį. Preparatai stimuliuojamai veikia imuninę sistemą – stiprina ne tik suaugusių, bet ir vaikų bei pagyvenusių žmonių nusilpusią imuninę sistemą. Ežiuolės preparatai veikia stimuliuojamai smegenų čiulpų funkciją, ypač kraujo kūrimo funkciją. Sergant lėtinėmis, uždegiminėmis ligomis ar ilgai vartojant chemoterapinius preparatus, antibiotikus bei sutrikus medžiagų apykaitai vartojami šio augalo preparatai. Taip pat patekus į organizmą sunkiesiems metalams, pesticidams, insekticidams, fungicidams naudojami vaistai savo sudėtyje turintys ežiuolės ekstraktų. Fenilpropanoidai lemia antibakterinį, antivirusinį poveikį. Veikia *Herpes* viruso padermes. Be imuninę sistemą stimuliuojamosios funkcijos preparatai veikia antibakteriškai virusus, grybelius. Ekstraktai sulėtina streptokokų, žarnyno lazdelių, *Herpes* viruso vystymąsi. Naudojama stomatitams gydyti. Ežiuolės preparatai pasižymi interferoną indukuojamuoju veikimu. Šio savybės sąlygojo preparatų panaudojimą viršutinių kvėpavimo takų uždegimams, šlapimo sistemos funkcijų sutrikimams gydyti, sergant gripu, peršalus, žaizdų gijimui gerinti (gerina audinių regeneraciją), uždegiminėms ligoms gydyti (reumatas, poliartritas, ginekologinės ligos). Į vidų ir išoriškai preparatai gali būti vartojami ilgai. Gaminami preparatai (Lymphozyl, Immunal, Echinacin, ir kt.) [13, 14, 15].

Kontraindikacijos. Žinoma jautrumas graižaziedžių šeimos augalams. Kaip ir visi imunostimuliantai, nerekomenduojama esant progresuojantiems sisteminiams susirgimams ar autoimuninės sistemos sutrikimams, tokiems kaip tuberkuliozė, leukozė, kolagenozė, išsėtinė sklerozė, AIDS, ŽIV infekcijos [14].

1.1.2. Vaistinio kiekio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) apibūdinimas

Kietis – *Artemisia* genties augalai. *Artemisia* genčiai priklauso daugiau kaip 400 augalų rūšių. Geriausiai žinomi ir labiausiai paplitę – kartusis kietis (liaudiškai pelynas), europinė ir amerikinė metelės, paprastasis, dirvoninis kiekiai, peletrūnas (kitai vaistinis kietis). Be paprastojo kiekio Lietuvoje randamos ir kitos rūšys: baltasis, dirvinis, kartusis, melsvasis, pajūrinis, pontinis, puršo, siverso, šluotinis, vaistinis, vienmetis kietis [16, 17].



1.2 pav. Vaistinis kietis (lot. *Artemisia dracunculoides* L.) [18]

Vaistinis kietis, tai daugiametis žolinis augalas. Užauga nuo 60 iki 170 cm, o kartais pasitaiko ir 2 m aukščio. Jiems būdingos šaknys – šakotos, trumpos bei rudos spalvos. Augalo stiebai iš vienos pusės statūs, vagoti, žali, iš kitų pusių alyvinės spalvos, o viršūnėje šakoti. Lapai – skirtingos formos ir išsidėstę pražangiai. Arčiau stiebo apačios yra plunksniškai skaldyti, o artėjant prie viršūnės lygiakraščiai. Lapo viršutinė dalis yra blizgi ir tamsiai žalios spalvos. Apatinė lapo pusė dažniau pilka ir padengta smulkiais plaukeliais. Apatiniai lapai kotuoti, lapkočio gysla prie stiebo alyvinės spalvos, pereina į žalią. Viršutiniai lapai bekočiai. Paprastojo kiekio žiedai – susitelkę graižais stiebų viršūnėse, neišsiskiriančios, žalios spalvos. Žydi nuo liepos pradžios iki pat rudens pabaigos. Vaisiai – lukštavaisiai cilindriški, kiek išlekti ir suploti, viršūnės link siaurėjantys, o pačioje viršūnėje su žiediniu apvadėliu. Saitavietis irgi apsuptas apvadėliu. Lukštavaisis be skristuko, verpstiškos formos, rudas, smulkiai raukšlėtas, šiek tiek lenkta apačia, nežymiai suplotas, šviesiai geltona saitaviete 1,2–2 mm ilgio 0,3–0,6 mm pločio. 1000 lukštavaisių sveria 0,1–0,2 gramo. Vienas augalas užaugina 50–150 tūkstančių sėklų. Šis augalas auga dykvietėse, šiukšlynuose, pakelėse, pagrioviuose ir pamiškėse. Mėgsta trąšią dirvą, pakenčia ir skurdesnes [10].

Cheminė sudėtis:

- borenolis;
- cineolis (eteriniame aliejuje);
- inulinas;
- karotinas;
- kartumynai;
- tujonas;
- vitaminas C;
- flavonoidai [19].

Dvidešimt žinomų flavonoidų buvo išskirti ir identifikuoti paprastajame kietyje: tricinas, jaceozidinas, eupafolinas, chrizoeriolis, diosmetinas, homoeriodiktiolis, izorhamnetinas, apigeninas, eriodiktiolis, liuteolinas, liuteolino 7-gliukozidas, kamferolio 3-gliukozidas, kamferolio 7-gliukozidas, kamferolio 3-ramzamino, kamferolio 3-ramnozidas, kvercetino 3-galaktozidas, kvercetino rutinas ir viteksinas. Daugiausia buvo rasta eriodiktiolio ir liuteolino

junginių. Visų flavonoidų estrogeninis aktyvumas buvo ištirtas naudojant rekonstruotą estrogeno transkripcijos vienetą mielėse *Saccharomyces cerevisiae*, kurios buvo transformuotos tiek su žmogaus estrogeno receptorių ekspresijos plazmidėmis, tiek su reporterio plazmidėmis. Du flavonoidai, eriodiktiolis ir apigeninas, galėjo sukelti reporterio geno transkripciją transgeninėse mielėse. Transkripcijos aktyvumas proporcingai padidėjo, kai mielių ląstelėse buvo pridėta daugiau išgryninto eriodiktiolio ar apigenino [19, 20].

1.1.3. Karčiojo kiečio (lot. *Artemisia absinthium* L.) apibūdinimas

Herba Artemisiae absinthii –karčiųjų kiečių žolė, *Artemisia absinthium* – kartusis kietis, Š. *Asteraceae* – astrinių [20].

Vaistinė augalinė žaliava – karčiojo kiečio, žydėjimo metu surinkta ir išdžiovinta žolė. Žaliava – ne ilgesnės kaip 25 cm žydinčios stiebų viršūnės, neturinčios apatinių sumedėjusių stiebo dalių priemaišų. Žaliava kvapi. Skonis labai kartus. Ruošiama žolės ir lapų žaliavos. Lapai renkami išsivystę, iki augalo žydėjimo ar žydėjimo pradžioje gegužės – birželio mėn. Renkami skroteliniai ir apatiniai stiebų lapai. Žolės paruošos vykdomos birželio – rugpjūčio mėn. Pjaunamos 20–25 cm. ilgio stiebų viršūnės, neturinčios apatinių sumedėjusių stiebo dalių. Priemaišos gali būti paprastastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris* L.) žolė. Viršutinė lapų pusė tamsiai žalia, o apatinė pilkai žalios spalvos, plaukuota [10].



1.3 pav. Kartusis kietis (lot. *Artemisia absinthium* L.) [21]

Cheminė sudėtis:

- 0,2–1,5 % eterinių aliejų;
- 0,15–0,4 % kartumynų;
- seskviterpeniai laktonai: absintinas, anabsintinas, artemisininas;
- bicikliniai monoterpenoidai: tujonas, tujaninas, pinenas;
- flavonoidai;
- rauginės medžiagos [22].

Panaudojimas. Pelyno žolės galeniniai preparatai: refleksiškai skatina virškinamojo trakto liaukų sekreciją, pagerina virškinimą, sužadina apetitą. Tujonas ir tujolis yra labai nuodingi

junginiai ir veikia į CNS: CNS pakitimus, atminties netekimas, silpnaprotiškumas, gaminti tik vandeninius užpilus arba silpnos koncentracijos spiritines tinktūras, nes eteriniai aliejai mažai pereina į mažos koncentracijos spiritinius tirpalus. Žolė į apetitą ir virškinimą gerinančių arbatų sudėtį. *Species Amarae* sudėtį. Gaminami: užpilai bei ekstraktai. Ekstraktas įeina į *Zelenino* lašų sudėtį. Žolė į *Zdrenkos* mišinį. Eksperimentais įrodyta, kad žolėje esantys terpenai ir laktonai pasižymi priešūždegiminiu poveikiu [23, 24].

1.1.4. Paprastojo kiečio (lot. *Artemisia vulgaris* L.) apibūdinimas

***Herba Artemisiae* – paprastųjų kiečių žolė; *Artemisia vulgaris* L. – paprastasis kietis; Š. *Asteraceae* – astrinių [25].**

Paprastasis kietis, tai daugiametis, 100–150 cm aukščio žolinis augalas. Šakniastiebis tvirtas, viršutinėje dalyje sustorėjęs, su trumpais ūgliais ir šakotomis rudomis šaknimis. Stiebai keli, statūs, briaunoti, dažniausiai rausvi, viršutinėje dalyje daug kartų šakoti, apaugę prigludusiais plaukeliais. Lapai pražanginiai, bekočiai arba beveik bekočiai, 5–10 cm ilgio, į viršūnę mažėjantys, 1–2 kartus plunksniškai suskaldyti, galinis lapelis paprastai triskiltis, su žymiai ilgesne vidurine skiltimi. Žiedynuose lapai smulkūs, 3–5 kartus suskaldyti, pačioje viršūnėje paprasti. Žiedai sukrauti į pailgai kiaušiniškus arba elipsiškus, nedidelius, 2–3 mm skersmens, graižus, sudarančius šluotelę. Žydi liepos – rugpjūčio mėn. Auga prie namų, palaukėse, ant ežių, patvoriuose, dykvietėse [10, 25].

Be paprastojo, mūsų respublikoje paplitęs dirvinis kietis (lot. *A. campestris* L.), kurio stiebai tamsiai raudoni, lapai maži, 2–3 kartus plunksniškai suskaldyti į labai siauras, maždaug 1 mm pločio, skilteles. Iš pradžių jie būna apaugę sidabriškai žvilgančiais plaukeliais. Šis kietis vaistinėmis savybėmis nepasižymi [26].



1.4 pav. Paprastasis kietis (lot. *Artemisia vulgaris* L.) [27, 28]

Vaistinė augalinė žaliava – paprastojo kiečio, žydėjimo metu nupjauta ir išdžiovinta žolė. Žolė yra iki 35 cm stiebų viršūnės. Stiebai dažniausiai vagoti, plaukuoti, tamsiai raudonos spalvos. Lapai pražanginiai, jų priešiniai kraštai nulinkę į apačią. Viršutinė jų pusė žalia, plika, o apatinė – pilka ir labai plaukuota. Apatiniai lapai kotuoti, 1–2 kartus plunksniškai

suskilę į lancetiškas, aštriomis viršūnėmis skilteles. Viduriniai ir viršutiniai lapai bekočiai, smulkesni, triskiaučiai arba vientisiniai, lancetiški. Graižai panašūs į pailgą kiaušinį, susitelkę ilgame tankiame šluotelės formos žiedyne. Žiedai vamzdiški, rausvi. Žaliavos kvapas stiprus, savitas, skonis kartokas [10, 26].

Cheminė sudėtis:

- žolėje eterinis aliejus;
- 1,8 cineolis;
- kamparas, linaloolis;
- tujonas, borneolis;
- seskviterpeninis laktonas vulgarinas – tauremisinas ir kiti;
- flavonoidai (rutas ir izoramnetino glikozidai);
- kumarinai (aeskuletinas, aeskulinas, umbeliferonas, skopoletinas);
- sitosterolis, stigmasterolis, karotinoidai [20].

Panaudojimas.

- žolė naudojama į vidų kaip apetitą gerinanti priemonė;
- veikliosios medžiagos kartumynai;
- mažiau efektyvi nei pelynas;
- eterinis aliejus pasižymi antimikrobinu ir priešgrybeliniu poveikiu [26].

1.1.5.Serenčio (lot. *Tagetes erecta* L.) apibūdinimas

Serentis (lot. *Tagetes*) priklauso, astrinių (lot. *Asteraceae*) šeimos augalų genčiai. Vienametė ar daugiametė žolė, rečiau puskrūmis arba neaukštas krūmas su staciais, gausiai šakotais stiebais. Lapai priešiniai, ūglių viršūnėje kartais pražanginiai, 1–3 kartus plunksniškai suskaidyti. Žiedai susitelkę į graižus, kurie išaugę po vieną ūglių viršūnėse, rečiau sudaro skėčio pavidalo sudėtinius žiedynus. Kraštiniai graižo žiedai liežuviškieji, vienalyčiai, geltoni, oranžiniai, raudonai rudi, retai balti, viduriniai – vamzdiškieji, dvilyčiai, geltoni, raudonai rudi, retai raudoni. Lukštavaisiai linijiniški, prie pagrindo siaurėjantys, viršūnėje su skirtuku, kurį sudaro ilgos (10–12 mm ilgio) ir trumpos (6 mm ilgio) plevelės. Lukštavaisiai juodu ar rudu paviršiumi, apaugę į viršų nukreiptais, prigludusiais plaukeliais, išilgai vagoti, be skirtuko 7,5–10 mm ilgio, 0,8–0,9 mm sotrio. Liaudies medicinoje didžiojo serenčio, siūlalapio serenčio, blizgiojo serenčio, actekinio serenčio preparatai vartojami virškinimo sistemos ligoms gydyti. Daugelio rūšių serenčiai turi insekticidinių savybių. Serentis dažnai taip pat naudojamas, kaip dekoratyvinis augalas, nors žinomas kaip karotinoidų šaltinis, skirtas pramoniniams ir medicininiais tikslams, tačiau šiuo metu naudojamas daugiausia dekoratyviniams tikslams [10, 29, 30, 31].



1.5 pav. Serentis (lot. *Tagetes erecta* L.) [32]

Cheminė sudėtis:

Tagetes erecta L. lapų ir žiedų eteriniai aliejai buvo tirti GC ir GC/MS metodais. Buvo nustatyta keturiasdešimt keturios sudedamosios dalys, sudarančios 94,1 % lapų aliejaus, ir 45 žiedų aliejaus sudedamosios dalys, sudarančios 94,0 % [33].

Pagrindiniai lapų aliejaus bioaktyvūs junginiai buvo:

- limonenas (7,6 %);
- terpinolenas (11,2 %);
- (Z)-miroksidas (4,2 %);
- piperitonas (52,4 %) ir piperitenonas (5,0 %) [34].

Serenčio žiedų aliejuje bioaktyvūs junginiai buvo:

- limonenas (6,9 %);
- terpinolenas (4,7 %);
- (Z)-miroksidas (7,9 %);
- piperitonas (28,5 %);
- piperitenonas (10,9 %), piperitenono oksidas (7,2 %);
- β -kariofilenas (7,0 %) [34].

1.2. Kaliaus kultūrų apibūdinimas

Kalius – tai neorganizuotai bei netvarkingai ir nesistemiškai augantis audinys, kuris susidaro iš ląstelių, suskirstytų pagal tam tikrus požymius. Augalo audinių arba dalių mechaniniai pažeidimai yra pirminė kaliaus kultūrų susidarymo priežastis. Ant pažeistų augalo dalių susidaro kalius, jis apsaugo sužalotą augalo vietą nuo infekcijų šitaip apsaugodamas likusią augalo dalį bei leisdamas toliau jam augti, kai nepažeistos gyvybiškai svarbios augalo dalys ir augalas auga natūraliomis ne *in vitro* sąlygomis. *In vitro* sąlygomis kaliaus susidarymas nuo *in vivo* sąlygų skiriasi tuo, kad steriliose sąlygose kaliaus susidarymas ant eksplanto yra svarbus ir naudingas procesas biotechnologiniu požiūriu. Kaliaus augimo galimybė priklauso

nuo eksplanto tipo, dydžio, auginimo sąlygų, augalo rūšies, genetinės augalo informacijos, amžiaus, augimo tarpsnio, eksplanto tipo [35].

Eksplantas – audinio ar kurio nors organo dalis, kurie auginami savarankiškai maitinamojoje terpėje ir naudojama augalo audinių kultūrai. Eksplanto amžius gali nulemti kultūros sėkmę, nes kuo eksplantas yra jaunesnis, tuo geriau jis geba formuoti įvairias struktūras *in vitro*. Kultūros sėkmę taip pat lemia ir eksplanto dydis – didesni vystosi produktyviau, nes turi sukaupti didesnę maisto medžiagų, bei augimo reguliatorių kiekį. Eksplantai turi būti izoliuojami iš augalų nepažeistų ligų ir kenkėjų [35].

Kaliaus kultūra – tai nespecializuoto augalinio audinio auginimas maitinamojoje terpėje. Besivystantis kaliaus praplėšia išorinio audinio sluoksnį ir dažniausiai vystosi jo paviršiuje. Kaliaus gavimui yra naudojami įvairūs eksplantai pvz.: subrendusios sėklos, subrendę ar nesubrendę sėklų gemalai; jaunų lapų segmentai, žiedynai [35].

1.2.1. Augimo fitohormonai

Augalų augimo reguliatoriai dar kitaip vadinami fitohormonais (ir sintetiniai, ir natūralios kilmės fitohormonai) – tai organinės medžiagos, kurios vykdo sintezę augalų audiniuose bei mažomis koncentracijomis veikia augalų raidos pakitimus. Jie dalyvauja fiziologinėse augalo eigose ir įvairiai veikia vystymąsi ir specifines biochemines reakcijas. Fitohormonai nėra specifiniai, nes vienas jis nedidelėmis koncentracijomis gali veikti įvairius fiziologinius procesus. Jie skirstomi į penkias pagrindines grupes:

- auksinai;
- citokininai;
- giberelinai;
- abscizo rūgštis;
- etilenas [35].

Auksinai. Šiai grupei priklauso natūraliai augaluose randamas 3-indolilacto rūgštis (IAR) ir sintetiniuose junginiuose esantys: 3-indolilsviesto rūgštis (ISR), 1-naftilacto rūgštis (NAR), 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D), 3-indoliletanolis, 3-indolilacetaldehidas, 3-indolilacetonitrilas, 3-indolilbutano rūgštis, 2-fenilacto rūgštis, 2,4,5-trichlorfenoksiacto rūgštis (2,4,5-T). Natūralūs auksinai tokie, kaip IAR nėra toks aktyvus, kaip sintetiniai, priežastis kodėl taip – nes greitai nesudaro augalo audiniuose veikiančios fermentinės sistemos. Pagrindinė vieta, kurioje vyksta sintezės yra stiebo apikalinėse merisistemose, o mažiausia vykstanti sintezė vieta yra lapuose (senuose lapuose auksino susidaro mažiau negu jaunuose). 3-indolilacto rūgštis (IAR) – vienas svarbiausių šios grupės fitohormonų, kuris susidaro iš aminorūgšties triptofano. Šios rūgšties augaluose yra ne daug ~6 μg 1 kg žalios masės [35].

Auksinų atliekamos funkcijos: skatina augimą ir tįsimą ląstelių, palaiko ramybės būseną, slopina augalo senėjimą lapų, slopina vaisių nokimą, stimuliuoja etileno sintezę [35].

Citokininai. Jie randami ir kaupiami aukštesniuosiuose augaluose, samanose, grybuose, bakterijose, prakriotų bei eukoriotų tRNR. Šio fitohormonų taip pat egzistuoja dvi formos tiek natūralūs, tiek sintetiniai. Jų aptinkama apie daugiau nei 200 natūraliai susidarančių. Daugiausia yra bręstančiose ir dygstančiose sėklose, jaunuose lapuose bei stiebų viršūnėse. Šių fitohormonų greitis didesnis nei auksinų, ypač daug jų yra meristemose ir sėklose. Citokininai yra sintetinami augalo šaknyse ir poto transportuojami vandens indais į stiebo ūglius. Citikonino biosintezė vyksta modifikuojant adeniną. Šiai grupei priklauso natūraliai augaluose esantis zeatinas bei sintetiniai: 6-furfurilaminopurinas (kinetinas) ir 6-benzilaminopurinas (6-BAP). Sintetiniai pasižymi labai aukštu aktyvumu ir atparumu aukštoms temperatūroms [35].

Citokininų atliekamos funkcijos: skatina ląstelių dalijimąsi, stimuliuoja pumpurų formavimąsi, šaknų susidarymą augalų kultūrose, aktyviną RNR polimerazių veikimą, RNR susidarymą ir baltymų sintezę, stabdo lapų senėjimą, skatina chlorofilo sintezę [35].

Giberelinai yra augalų hormonai skatinantys tęstamąjį augimą, jis sukelia ląstelės ilgėjimą. Šiuo metu yra žinomi 100 šios grupės fitohormonų, kurie savo chemine sudėtimi mažai skiriasi. Veikiant augalą giberelinu, didžiausias poveikis pasireiškia stiebams, jų pailgėjimas. Jie svarbūs, nes nulemia augalo aukštį ir vaisių užmezgimui. Daugiausia randama žiedinių augalų jaunuose lapuose, šaknyse, gemaluose, sėklose bei vaisiuose [35].

Giberelinų atliekamos funkcijos: skatina – sėklų, svogūnų dygimą; žydėjimą; tarpubamblių tįsimą, slopina lapų bei citrusinių vaisių senėjimą, nutraukia ramybės laikotarpį [35].

Abscizo rūgštis – tai izoprenoidinis augimo hormonas. Ši rūgštis stabdo ląstelių dalijimąsi, todėl dar vadinama streso hormonu. Šis hormonas randamas lapuose, vaisiuose, šaknų viršūnėse, sėklose. Patys svarbiausi ABR junginio bruožai, kad slopina augimą, ir pumpurų augimo reguliavimą. ABR kiekis didžiausias, kai sėklos ir vaisiai formuojasi, o mažiausias po ūglių formavimosi [35].

Abscizo rūgšties funkcijos: skatina – žiotelių užsivėrimą, sandėlinių baltymų gamybą sėklose, slopina – ląstelių dalijimąsi, augimą, stimuliuoja amilazės sintezę, kitų fitohormonų veikimą [35].

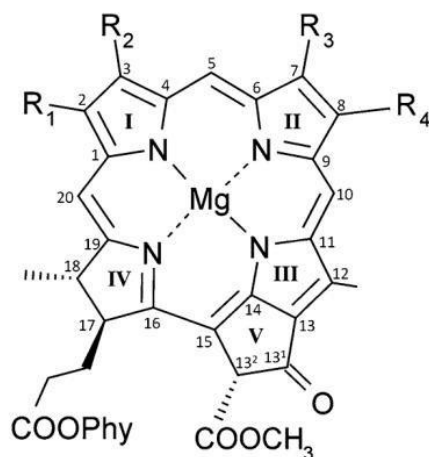
Etilenas – tai dujinis, natūralus bei turintis paprasčiausią struktūrą augalų hormonai. Gaminą etileną aukštesnieji augalai. Jis augaluose aptinkamas šaknyse, ūglių apikalinėje mersistemoje, lapų viršūnėse, nokstančiuose vaisiuose [35].

Etileno funkcijos: skatina – lapų ir vaisių kritimą, žiedų skleidimąsi, vaisių nokimą, taip pat lemia šaknų formavimąsi neįprastose augalo vietose [35].

1.2.2. Augalų pirminiai metabolitai

Augalų metabolitai – organiniai junginiai, kurie susidaro augalų ląstelėse, audiniuose ir organų medžiagų apykaitos metu. Pirminiai metabolitai augalų ląstelėms yra gyvybiškai būtini. Tai – riebalai, baltymai, aminorūgštys, nukleorūgštys, sacharidai, chlorofilas *a* ir *b* [36].

Chlorofilas. Augalų ląstelėse fotosintezės metu saulės energiją sugeria chloroplastuose tilakoidų membranose esantys pigmentai – chlorofilai ir karotinoidai. Chlorofilas yra svarbiausias fotoreceptorius, o karotinoidai – tik pagalbiniai. Yra keletas chlorofilų: *a*, *b*, *c1*, *c2*, *d* ir bakterijose esantys chlorofilai. Chlorofilo *a* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) turi visi fotosintezėje dalyvaujantys augalai, chlorofilo *b* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) turi aukštesnieji augalai ir žaliadumbliai. Labiausiai paplitęs ir chlorofilas *b*, tačiau visuose augaluose jo yra mažiau nei chlorofilo *a*. Trims pastarojo molekulėms vidutiniškai tenka viena chlorofilo *b* molekulė, o kartais tas santykis gali siekti 5:1 [35].



1.6 pav. Įvairių chlorofilų struktūrinė formulė [37]

1.1 lentelė. Įvairių chlorofilų struktūrinės formulės radikalai [37]

Pavadinimas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Chlorofilas <i>a</i>	CH ₃	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₂ -CH ₃
Chlorofilas <i>b</i>	CH ₃	CH=CH ₂	CHO	CH ₂ -CH ₃
Chlorofilas <i>d</i>	CH ₃	CHO	CH ₃	CH ₂ -CH ₃
Chlorofilas <i>f</i>	CHO	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₂ -CH ₃

1.2.3. Antriniai metabolitai

Antriniai augalų metabolitai – tai organiniai junginiai, kurie susidaro medžiagų apykaitos metu augalų ląstelėse, audiniuose bei organuose. Antriniai metabolitai yra tarpiniai ir galutiniai medžiagų apykaitos produktai. Jie nebūtinai naudojami/gaunami tiesiogiai, bet turi svarbų biologinį potencialą bei platų panaudojimą pramonėje. Šie metabolitai gali būti: fenoliai, alkaloidai, terpenoidai, gliukozinolatai, cianogeniniai gliukozidai. Augalai kaupia šiuos metabolitus: flavonoidus, kavos rūgšties darinius, alkilamidus, polisacharidus, lektinus, eterinius aliejus, terpenus, steroidus, kumarinus, lignanus ir t.t [35, 38].

1.2.4. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų antioksidacinis aktyvumas

Antioksidantai – tai tokios medžiagos, kurios gali stabilizuoti ir inaktivuoti laisvuosius radikalus, kurie puola įvairias ląstelių struktūras. Jie gali būti skirstomi į fermentinius, nefermentinius, pagal šaltinius į vidinius ir išorinius. Fermentiniams priklauso superoksido dismutazė (SOD), katalazė, nefermentiniams – fenoliniai junginiai, taninai, vitaminai (A, C,

E). Vidiniams priklauso tokie junginiai, kurie laisvuosius radikalus verčia į mažiau toksiškus junginius. Išoriniai – gaunami su maisto medžiagomis, kurios veikia pagal tokią pat sistemą kaip ir vidiniai antioksidantai [35, 39].

Tiriant vaistinius augalus, taikomi įvairūs antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai:

– superoksido dismutazės, kai laisvas superoksido radikalas paverčiamas į vandenilio peroksidą. Laisvas superoksido radikalas gali padaryti didelę žalą ląstelėms. Vandenilio peroksidas ląstelėse skaidomas į vandenį naudojant katalazės sistemoms [39];

– DPPH radikalo, kai reakcijos metu dėl jame esančio azoto atomo nelyginio elektrono, redukuojamas antioksidantais į geltonos spalvos hidraziną. Analizė yra pagrįsta antioksidacinio sujungimo gebos matavimu [40];

– FRAP – tai katijono surišimo metodas, kuriam naudojama rūgštinė terpė (pH = 3,6) [41].

1.2.5. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūros *in vitro* bioaktyvumo tyrimai

Ežiuolės augalų tyrimai. Ežiuolės augalai labai plačiai taikomi komerciniams tikslams: medicinoje antioksidaciniam ir antibakteriniam bei biotechnologiniam panaudojimui. Iš ežiuolės išskirti eteriniai aliejai yra laikomi potencialiais vaistiniais preparatais. Šio augalo dalys gali būti panaudotos visos: šaknys, stiebai, lapai, žiedai. *E. purpurea* augalų ekstraktai buvo ištirti mokslininkų ir nustatyta, kad jie turi antibakterinių ir antioksidacinių savybių [42, 43].

Ežiuolės ekstraktų antioksidaciniai tyrimai. Oksidacinis stresas yra disbalanso būseną, kai reaktyviųjų deguonies rūšių susidarymas viršija ląstelių antioksidantų pajėgumus. Buvo atlikti tyrimai su *E. purpurea* ir vertinamas šio augalo etanolio ekstraktas bei jo antiradikalinis aktyvumas, naudojant DPPH metodą. Antioksidanto galia buvo didesnė, nei kad askorbo rūgšties ir pagal bendrąją fenolinių junginių koncentraciją (353,6 mg galo rūgšties ekvivalento/100 ml). Šie komponentai gali veikti keliais būdais: kaip reduktoriai, vandenilio donorai, pavieniai deguonies suardytojai ir metalų chelatai. Mokslininkų teigimu šio augalo šaknys nuslopina sintetinį laisvąjį radikalą DPPH (nuo 104 iki 2165 µg/ml) [43].

UV įtaka ežiuolės kaliaus kultūroms. Šis augalas kaupia daug antrinių metabolitų, kuriuos galima ištirti naudojant ultravioletinę spinduliuotę. Buvo atliktas tyrimas su kaliaus ir ląstelių suspensijų kultūrų augimu ir antrinių metabolitų išskyrimu stebint 24, 48 ir 72 valandas ir veikiant UV. *In vitro* augimas buvo inicijuotas hipokotilio eksplantais ant MS terpės, papildytos 1,5 mg/l BA ir 1 mg/l NAR. Kaliaus ir ląstelių suspensijos kultūros buvo veikiamos UV – C spinduliuotės 15, 30 ir 60 minučių. Rezultatai parodė, kad bendroji visų augimo parametrų tendencija žymiai padidėjo, ilgėjant inkubacijos laikotarpiui. Didžiausią teigiamą efektą parodė, kai poveikio laikas buvo po 30 ir 15 min, naudojant kaliaus ir ląstelių suspensijos kultūras po 72 val inkubacinio laikotarpio. Tyrimas parodė didžiausias ląstelių suspensijos, kavos rūgšties darinių ir bendrųjų fenolinių junginių koncentracijas, kai inkubacinis laikotarpis buvo 72 val, o šviesos spinduliuotės poveikio laikas – 60 min. Kaliaus ir ląstelių suspensijos kultūrose buvo užfiksuotas reikšmingas nefermentinio antioksidacinio aktyvumo padidėjimas, esant 72 valandų inkubaciniam laikotarpiui [44].

Šviesos įtaka ežiuolės metabolitų kaupimui. Šviesa ne tik veiksminga fotosintezėje, augime ir vystymosi etapuose, bet turi ir svarbų vaidmenį pirminių ir antrinių metabolitų biosintezėje. Mokslininkai atliko tyrimą siekdami nustatyti šviesos poveikį alkamido, kavos rūgšties darinių ir echinakozido biosintezei – ežiuolės ląstelių suspensijos kultūrose. Stiebo eksplantai buvo panaudoti kaliaus kultūroms, kurioms auginti naudojama B5 terpė papildyta 1 mg/l BAP ir 2 mg/l NAR. Po 8 dienų inkubacijos ląstelių kultūros šviesoje ir tamsioje aplinkoje – ląstelių paėmimas buvo vykdomas 3 dienų intervale 5 kartus. Iš kaliaus kultūrų – alkilamido, kavos rūgšties darinių ir echinakozido koncentracijos buvo nustatytos naudojant HPLC metodą. Alkilamido, kaftaro rūgšties ir echnikozido koncentracijos reguliariai padidėjo naudojant šviesos aplinką. Naudojant šviesą alkilamido kiekis vidutiniškai padidėjo 57 %, palyginus su tamsia aplinka. Ląstelių kultūros paveiktos 12 dienų inkubaciniu laikotarpiu šviesoje – padidino alkilamido koncentraciją, palyginus su su tamsia aplinka. Veikiant šviesa 12 dienų, kaftaro rūgštis padidėjo 70 %, o echnikozidas 63 %. Šis tyrimas parodė, kad ežiuolės ląstelių suspensijos kultūros pritaikymas turi didelį potencialą, norint kai kuriuos svarbius fitochemikalus [45].

Kiečio augalų tyrimai. *Artemisia* gentis sulaukė didelio susidomėjimo dėl savo cheminės ir biologinės įvairovės. Didžiausias atradimas ir išskyrimas šios genties vaistine reikšme buvo atrasti vaistai nuo maliarijos – artemisinino pagrindu [24].

Karčiojo kiečio antioksidaciniai tyrimai. *Karčiojo kiečio* – (lot. *A. absinthium*) kaliaus kultūrų augimas buvo optimizuotas, siekiant padidinti fenolinių junginių gamybą ir nustatyti antioksidacinį aktyvumą. Kaliaus kultūros buvo suformuotos iš sėklų išaugintų lapų eksplantų, inkubuotų ant MS terpės, papildytų TDZ 0,5–5 mg/l atskirai arba kartu su NAR 1 mg/l. Kas savaitę ir 49 dienų periode buvo tiriamos šių kaliaus kultūrų augimo kinetika, bendroji fenolinių junginių koncentracija ir antioksidacinis aktyvumas. Buvo stebimas didžiausias 8,73 g/l sausos biomasės kaupimasis 42 dieną, kai terpė buvo papildyta 1 mg/l TDZ ir 1 mg/l NAR. Didžiausia bendroji fenolinių junginių koncentracija 8,53 mg (GAE/g DW) ir didžiausias DPPH radikalų inaktyvinimo aktyvumas buvo 72,6 % 42 dieną. Rezultatai parodė bendrosios fenolinių junginių koncentracijos ir DPPH radikalų slopinimo aktyvumą daugumoje *A. absinthium* L. kaliaus kultūrų [4].

Šviesos įtaka kiečio metabolitų kaupimui. Dėl savo įtakos morfogenezei šviesa yra pagrindinis aplinkos veiksnys, keičiantis augalų struktūrinę raidą, tačiau supratimas, kaip šviesa kontroliuoja augalų augimą ir vystymąsi, vis dar silpnas ir reikia atlikti papildomus tyrimus mokslininkams. Šiame tyrime mokslininkai stebėjo įvairių monochromatinių šviesų ir augalų augimo reguliatorių derinių poveikį morfogeniniam ir biocheminiam kitimui, naudojant kaliaus kultūras iš lapų gautų *A. absinthium* L. Derinant NAR 1 mg/l ir TDZ 2 mg/l buvo gautas optimalus kaliaus susidarymo efektyvumas (90 %), kai jis buvo laikomas 4 dienas (16/8 h) fluorescencinėje šviesoje. Priešingai nei kontrolinis (baltas spektras) raudonasis spektras padidino peroksidazės aktyvumą, preoteazės aktyvumą, bendrą baltymų koncentraciją ir chlorofilo *a/b* santykį. Žaliasis spektras buvo nustatant bendrą fenolinių junginių, flavonoidų koncentraciją ir antioksidacinį aktyvumą. Geltonos šviesos spektras padidino MDA koncentraciją, o balta ir žalia šviesa pagerino bendrą chlorofilo ir karotinoidų koncentraciją. Atliekant šį tyrimą pastebėtas ryšys tarp kaliaus susidarymo atsako, antioksidantų aktyvumo ir antioksidacinio fermento aktyvumo. Tyrimo metu buvo suprasti

šviesos įtaka komerciškai svarbių antrinių metabolitų gamybai ir jų optimizavimui *n vitro* kultūrose *A. absinthium* L [46].

Paprastojo kiečio tyrimai. *Paprastasis kietis* – *Artemisia vulgaris* yra viena iš svarbiausių *Artemisia* genties vaistinių augalų rūšių dėl savo lakiųjų aliejų. Šis vaistinis augalas pasižymi plačiu terapiniu savybių spektru: priešmaliariniu, priešuždegiminiu, antihipertenziniu, antioksidaciniu, imunomoduliaciniu, hepatoprotektiniu, antispaziminiu ir antiseptiniu poveikiu. Šie poveikiai priskiriami antrinių metabolitų buvimui ir gavimui, įskaitant tokius, kaip: flavonoidai, seskviterpeno laktonai, kumarinai, acetilenus, fenolinės rūgštys, organinės rūgštys, mono- ir seskviterpenai. Mokslininkų tyrimai susiję su *A. vulgaris* morfologija, anatomija ir fitochemija sukėlė didelį susidomėjimą apie šios rūšies terapinių junginių kaupimąsi ir gavimą [3, 47].

Buvo ištirta bakterija *A. rhizogenes* tarpininkaujanti tarp genetinės transformacijos poveikio su *A. tilessi*, *A. vulgaris*, *A. dracunculus* ir *A. annua* transgeninių šaknų antioksidacinei būklei. Vandeningų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas naudojant metodus, pagrįstus gebėjimu redukuoti DPPH ir ABTS⁺ radikalus. Kiečio ekstraktų (50 %), gautų iš transgeninių šaknų, antioksidacinis aktyvumas (DPPH) buvo didesnis nei aktyvumo, kurį turėjo ekstraktai iš netransformuotų šaknų. Kiečio ekstraktų (80 %) buvo pastebėtas padidėjęs gebėjimas redukuoti ABTS⁺ radikalą. Aktyviausi buvo *A. annua* ir *A. tilessi* transgeninių šaknų ekstraktai, o mažiausias aktyvumas pasireiškė *A. dracunculus* ekstraktų. *A. rhizogenes* sukelta transformacija pakeitė kelių *Artemisia* rūšių šaknų antioksidacinį pajėgumą, išskyrus *A. vulgaris*. *A. vulgaris* gali būti naudojamas padidinti augalų natūralias antiradikalines savybes, priklausančias *Artemisia* genties augalams [48].

Taip pat, mokslininkai atliko tyrimą su „*Toxoplasma gondii*“ parazitu, nuo kurio kenčia beveik trečdalis žmonių visame pasaulyje, sukeldami tokius sutrikimus, kaip abortus ar įgimtas ligas. Ankstesni tyrimai parodė, kad *Artemisia annua* yra labai efektyvus šiam parazitui, tačiau atlikti tyrimai su *Artemisia vulgaris* parodė, kad šio vaistinio augalo eterio frakcija pasižymėjo reikšmingu antitoksoplazmozės poveikiu, kas rodo, kad nepoliniai terpenoidai gali būti atsakingi už šį poveikį [49].

Serenčio (lot. *Tagetes erecta* L.) augalų biologinio aktyvumo tyrimai. Serentis – (lot. *Tagetes erecta* L.) būdamas dekoratyviniu augalu, pasižymi vaistinėmis savybėmis, tokiomis, kaip: antimikrobinės, insekticidinės, priešgrybėlinės, antioksidacinės taip pat jis pasižymi geromis kraujo krešėjimo savybėmis. Mokslininkai atliko tyrimą dėl kraujo krešėjimo gebos. Kraujo krešėjimo aktyvumas iš lapų ekstrakto buvo tiriamas naudojant protrombino laiko testą-Owreno metodą. Eksperimentai parodė, kad padidėjus lapų ekstrakto koncentracijai, krešėjimo laikas sutrumpėjo. Serenčio lapų ekstraktas parodė labai gerą kraujo krešėjimą mažesniu kiekiu, t. y. net esant µl kiekiams buvo nustatyti ir kiekybiškai įvertinti fenoliniai junginiai (pvz., galo rūgštis, skopoletinas, ferulo rūgštis, kvercetas), o tai rodo, kad dėl jų buvimo serenčio lapų ekstraktas pasižymi krešėjimo savybėmis [50, 51, 52].

Taip pat svarbus *Tagetes erecta* iš kurio gaunamas eterinis aliejus, kurio sudėtyje yra monoterpeno ir seskviterpenoidų junginių. Mokslininkai atliko tyrimą, norėdami nustatyti serenčio herbicidinį poveikį prieš *Echinochloa crus-galli* (piktžolė) augalus. Iš *T. erecta*

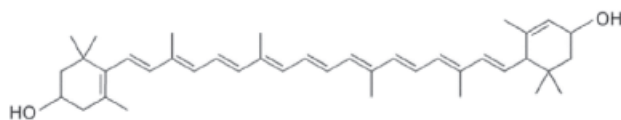
išskirto eterinio aliejaus išeiga buvo 0,72 mg/kg šviežio svorio. Eterinio aliejaus cheminei sudėčiai nustatyti buvo naudojama dujų chromatografija – masių spektrometrija. Aptikti monoterpenai daugiausia susidedantys iš piperitono (17,12 %), piperitenono (10,46 %) ir ocimino (8,59 %). Identifikuotus seskviterpenoidus daugiausia sudarė neofitadienas (16,18 %) ir kariofilenas (11,10 %). Eterinis aliejus buvo paruoštas kaip emulsinis koncentratas, skirtas naudoti kaip herbicidas. Nustatyta, kad *T. erecta* gali stipriai nuslopinti sėklų daigumą *Echinichloa crus-galli* dėl slopinamo α -amilazės aktyvumo. Emulsinta koncentruoto eterinio aliejaus struktūra slopino *Echinochloa crus-galli* augalus. Emulsiklio koncentrato struktūra pagerino eterinio aliejaus herbicidinį potencialą ir stabilumą lauko sąlygomis. *T. erecta* eterinis aliejus turi fitotoksinių junginių, kurie galėtų būti naudojami kaip natūralūs herbicidai piktžolių kontrolei [31, 53, 54].

1.2.6. Liuteinas

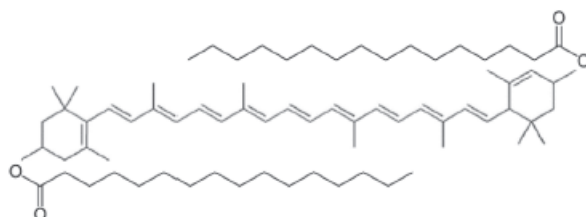
Liuteinas yra karotinoidas ir randamas daugelyje organizmų, nuo bakterijų iki dumblių, mielių ir augalų. Konkrečiau jis randamas gėlėse, grūduose, vaisiuose, daržovėse (tokiose kaip špinatai, kopūstai). Grynas liuteinas dažniausiai yra geltonai oranžinis, kristalinis, lipofilinis, kietas, kurio molekulinė formulė yra $C_{40}H_{56}O_2$. Liuteinas naudojamas farmacijos, maisto papildų, gyvūnų – žuvų pašarų, maisto pramonės šakose. Tačiau maisto pramonėje jo naudojimas yra ribojamas dėl nestabilumo, kuris susidaro perdirbant maistą (nes maistas perdirbiamas aukštoje temperatūroje). Jis tirpsta riebaluose ir yra jautrus šviesai, šilumai, deguoniui ir rūgštimis, ekstremaliam pH. Taip pat ekstremalus pH mažesnis nei 4,0 arba didesnis nei 8,0, gali sukelti esterifikaciją ir cis/trans molekulės izomerizaciją. O esant šviesai gali susidaryti bespalviai mažos molekulinės masės junginiai. Dėl šios priežasties labai svarbu, kad preparatai būtų sukurti taip, kad būtų užtikrintas liuteino stabilumas galutinio produkto saugojimo metu [55, 56, 57].

Vištienos kiaušinio trynys buvo pripažintas puikiu liuteino šaltiniu gyvūniniu šaltiniu. Liuteino koncentracija vištienos kiaušinio trynyje yra 1622 ± 650 $\mu\text{g}/100$ g trynio, o dėl didelio riebumo liuteino biologinis prieinamumas yra didelis. Šiuo metu pagrindinis liuteino šaltinis yra serentis. Serentio augalo ekstrakto yra nemažas kiekis liuteino *Tagetes erecta* L. $21,600$ – $2,794600$ $\mu\text{g}/100$ g naudojant tirpiklį tetrahidrofuraną. Liuteino kiekis serentyje priklauso nuo spalvos intensyvumo. Jo žiedai geltonai oranžiniai, ir juose gausu šio karotino, kuo spalva ryškesnė ir intensyvesnė nuo geltonai oranžinės iki tamsiai oranžinės, tuo daugiau liuteino randama. Liuteino gamybos išlaidos yra didelės, nes jis gali būti išgaunamas tik *Tagetes erecta* L. gelės žydėjimo metu nuo liepos iki spalio mėn [55, 58].

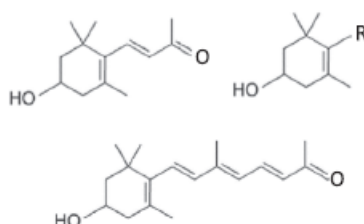
Liuteinas būdamas antioksidantu turi įtakos mažo tankio (MTL) lipoproteinų oksidacijai ir limfocitų DNR oksidacinei žalai ir veikia kaip slopintojas. Plačiai žinomas dėl laisvųjų radikalų šalinimo, foto sukeltų reaktyvių deguonies rūšių nuslopinimo, jis pasižymi priešuždegiminėmis savybėmis bei padeda stiprinti imunitetą. Vartojant liuteiną gali sumažėti kataraktos priepolių ir akių geltonosios dėmės degeneracijos rizika (kuri didėja su amžiumi). Liuteinas kaip prevencinė priemonė prieš vėžio aterosklerozės ir širdies bei kraujagyslių ligas [59].



1.7 pav. Liuteinas [55]



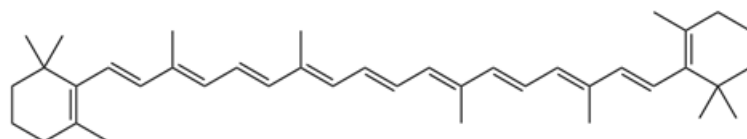
1.8 pav. Esterifikuotas liuteinas [55]



1.9 pav. Liuteino oksidacijos produktai [55]

1.2.7. Karotinoidai

Karotinoidai (lot. *carota* – morka) yra nesotieji angliavandeniliai, žinomi kaip riebaluose tirpūs, biologiškai aktyvūs pigmentai, sąlygojantys oranžinę – raudoną arba geltoną spalvą. Augaluose karotinoidai absorbuoja šviesą fotosintezės proceso metu, versdami ją energija, taip pat apsaugo augalus nuo fotooksidacijos. Žmogaus organizme karotinoidai svarbūs kaip provitamino A šaltiniai, antioksidantai. Karotinoidai skirstomi į dvi pagrindines grupes: **karotinus** ir **ksantofilus**. Į karotinų sudėtį įeina tik anglies ir vandenilio atomai; iš jų labiausiai paplitęs β-karotinas. Ksantofilų sudėtyje yra vienas ar daugiau deguonies atomų; pagrindinis jų atstovas – liuteinas, tačiau yra ir daugiau karotinoidams priklausančių junginių, tačiau jie savo sandara labai artimi vienas kitam. Karotinoidai – tai tik pagalbiniai chloroplastų tilakoiduose esantys pigmentai [55, 60, 61].



1.10 pav. β-karotino struktūrinė formulė [35]

Karotinoidai yra lipofiliniai junginiai. Jie netirpsta vandenyje, tačiau gerai tirpsta organiniuose tirpikliuose tokiuose, kaip acetonas, dietilo eteris, alkoholis, chloroformas, etilo acetatas, todėl

jie iš augalų ekstrahuojami organiniais tirpikliais. Karotinai – geriau tirpsta heksane ir toluene, o ksantofilai – metanolyje ir etanolyje. Karotinoidų skilimas gali įvykti ir dėl cheminio ar fizikinio poveikio, dėl fermentų katalizuojamų reakcijų. Jie ypač jautrūs šilumos, šviesos, deguonies ir rūgščių poveikiui. Pagrindinė karotinoidų degradacijos priežastis – oksidacija. Oksidacija priklauso nuo esamo deguonies, karotinoidų struktūros ir fizinių sąlygų [35, 55, 60].

Pagrindinis karotinoidų poveikis sveikatai yra jų stiprus antioksidantų potencialas. Be to, specifiniai karotinoidai gali turėti papildomų privalumų, tokių kaip β -karotinas, kuris turi gebėjimą veikti kaip vitaminas A. Liuteinas ir zeaksantinas gali apsaugoti akis nuo UV spindulių ir yra būtinas smegenų vystymuisi. Kiti karotinoidai gali padėti išvengti širdies ligų, blokuodami mažo tankio lipoproteinų susidarymą [55].

1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Literatūros apžvalgos skyriuje supažindinta su ežiuolės (lot. *Echinacea*), kiečio (lot. *Artemisia*) ir serenčio (lot. *Tagetes*) morfologinėmis, cheminėmis savybėmis. Pateikta informacija apie šių augalų chemines sudėtis, gydomąsias savybes bei galimą jų panaudojimą pramonėje. Analizuoti pirminiai, antriniai metabolitai bei augimo fitohormonai. Svarbiausi aptarti pirminiai metabolitai analizuojami tiriamuosiuose augaluose buvo chlorofilas *a* ir *b* ir antriniai metabolitai, tokie kaip: liuteinas, karotinoidai, fenoliniai junginiai, flavonoidai. Aptarti tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų antioksidaciniai aktyvumai bei jų nustatymo metodai: superoksido dismutazės, DPPH, FRAP. Išnagrinėti tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų *in vitro* bioaktyvumo tyrimai. Apžvelgti ežiuolės augalų ekstraktų antioksidaciniai tyrimai, UV įtaka šio augalo kaliaus kultūroms bei šviesos įtaka metabolitų kaupimuisi. Aptarti kiečio augalų antioksidaciniai tyrimai ir jų reikšmė kaliaus kultūroms, šviesos įtaka metabolitų kaupimuisi. Aprašyti serenčio augalų biologinio aktyvumo tyrimai.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimuose naudotos įrangos sąrašas

- autoklavas „*Certoclav Labor-Autoclav*“;
- laminaras „*Telstar BV-100*“;
- laminaras „*Holten LaminAir*“;
- termostatuojama vandens vonelė „*Biosan ultratherm BWT-U*“;
- termostatuojama vandens vonelė „*Memmert*“;
- centrifuga „*Hettich Universal 320R*“;
- spektrofotometras „*Shimadzu UV-1280*“;
- spektrofotometras „*mrc Windaus D-38678 Clausthal-Zellerfeld*“;
- maišyklė „*Biosan Environmental Shaker-Incubator ES-20*“;
- svarstyklės „*Shimadzu ATX84*“.

2.2. Tyrimuose naudoti reagentai

300 mM acetato buferis (pH=3,6), 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas), 40 mmol/l HCl, FeCl₃ x 6H₂O (20 mmol/l), FRAP reagentas, Folino-Kiokalto reagentas (1 N), natrio karbonatas (20 %), standartinis tanino rūgšties tirpalas (0,1 mg/ml), 0,05 M K/Na fosfatinis buferis, 1 mM ditiotritolis (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluoridas (PMSF), 0,1 M vandenilio peroksidas, 0,066 M K/Na fosfatinis buferis, 1 mM ditiotritolis (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluoridas (PMSF), DMSO, polivinilpirolidonas, 40 mM Tris-HCl buferis; 10 mM L-metioninas, 54 μM nitromėlynasis tetrazolis; 0,025 % tritonas X-100; 3 μM riboflavinai, 0,1 M fosfatinis buferis (pH=7), 1mM ditiotritolis (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluoridas (PMSF), 0,5 mM askorbo rūgštis, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM vandenilio peroksidas, acto rūgštis, ninhidrinai, 6 M H₃PO₄, natrio fosfatinis buferis 0,2 M (pH=6,6), 1 % K₃[Fe(CN)₆], 10 % trichloracto rūgštis, 0,1 % FeCl₃, metanolis, kvercetas, acetonas, triptonas, mielių ekstraktas, mikro agaras, natrio chloridas.

2.3. Sėklų sterilinimas

Ežiuolės augalų sėklų gemaliukai sterilinami ACE 20 % – 15 min, 3 kartus nuplaunami steriliu distiliuotu vandeniu, 70 % etanolyje – 2 min, ir 3 kartus nuplaunami steriliu distiliuotu vandeniu.

Kiečio sėklos sterilinamos 70 % etanolyje – 1 min, HgCl₂ 0,1 % tirpale – 10 min, NaClO 1,5 % tirpale – 10 min, 3 kartus nuplaunamos steriliu distiliuotu vandeniu.

Serenčio sėklos sterilinamos etanolyje 70 % – 5 sekundes, NaClO 1,5 % tirpale – 20 min, 3 kartus plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu. Sėklos sodinamos į *Petri* lėkštes laminare. Laminare sterilinamas ultravioletiniais spinduliais ir 70 % etanoliu.

2.4. Augalų ląstelių maitinamosios terpės paruošimas

Augalų ląstelėms auginti yra reikalinga maitinamoji terpė ir joms auginti reikalinga optimali temperatūra ir šviesa. Kultivuojant augalų ląsteles *in vitro* maitinamoji terpė buvo sudaryta iš:

makroelementų, mikroelementų, geležies šaltinio, organinių priedų, anglies šaltinio bei augimo hormonų.

Ežiuolės, kiečio augalų sėklų augimui buvo naudota Murashige ir Skoog (MS) terpė. Ši terpė viena plačiausiai naudojama dėl aukštos nitratų ir kalio bei amonio jonų koncentracijos joje. Terpė sterilizuojama autoklave 120 °C, esant 0,75 – atmosferos slėgiui ir 15 minučių.

Optimali augalų kultivavimo temperatūra buvo 20–22 °C, fotoperiodas – 24 val, MS terpės pH 5,7. Eksplantai reguliariai perkeliama į šviežią maitinamąją terpę kas mėnesį. MS terpės pH reguliuojamas 0,1 N NaOH ir 0,1 N H₂SO₄.

2.1 lentelė. MS terpės reagentų kiekiai, kurie paimami iš pradinių tirpalų

Reagentai	Reagentų kiekiai reikalingi 1 l terpės
Makro druskos	50 ml
Mikro druskos	5 ml
Fe-EDTA	5 ml
Sacharozė	30 g
Agaras	5 g
Organiniai priedai	5 ml

2.2 lentelė. Tyrimui naudotos terpių sudėtys

Terpė	Terpės sudėtis
Ežiuolės kaliaus kultūra	BAP (3mg/l) + NAR (0,5 mg/l)
Kiečio kaliaus kultūra	BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l)
Serenčio kaliaus kultūra	BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l)

2.5. Augimo reguliatorių paruošimas

Augimo reguliatorių medžiagos 0,1 mg/ml tirpalo paruošiama – pasverta 10 mg tiriamojo junginio ir suberta į matavimo kolbą bei ištirpinta 2–5 ml tirpiklio (distiliuotas vanduo). Kai milteliai visiškai ištirpę praskiedžiama iki reikiamo tūrio, tai yra 100 ml. Paimti reikalingas tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris iš pradinio tirpalo skaičiuojamas pagal pateiktą 2.1 formulę:

$$X = \frac{A \times B}{C}; \quad (2.1)$$

Čia

X – reikalingas paimto tirpalo tūris iš pradinio paruošto tirpalo su tiriamąją medžiaga, ml;

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąją medžiaga, koncentracija, mg/ml;

2.6. Tiriamųjų junginių tyrimų metodika

2.6.1. Vaistinių augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

0,2 g susmulkinta augalinės medžiagos užpilta 2 ml metanoliu ir homogenizuota 10 min kratytuve 25 °C. Homogenizatas centrifuguotas 9000 aps/min 10 min ir filtratas surinktas [40].

Tiriamajam tirpalui paruošti į mėgintuvėlį įpilama 0,077 ml paruošto ekstrakto, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir po 15 minučių laikymo tamsoje matuojama tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje. Palyginamajam tirpalui į mėgintuvėlį įpilama 0,077 ml metanolio, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Etaloninis tirpalas DPPH ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje. DPPH radikalo slopinimas procentais apskaičiuojamas pagal 2.2 formulę:

$$\% \text{ slopinimas} = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100 \%; \quad (2.2)$$

Čia

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis [40].

2.6.2. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6 tripiridil-s-triaziną

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C, 30 min. Ekstraktą centrifuguojamas 10 min ir supernatantas naudojamas tolimesniam tyrimui. Gautas ekstraktas 100 µl yra sumaišomas su 3 ml FRAP reagentu. Reakcijos mišinys matuojamas 593 nm bangos ilgyje. Kalibravimo kreivė ruošiamą iš $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (5, 10, 15, 20, 25 µmol/l). Kalibravimo kreivės reikšmė apskaičiuojama µmol/l Fe(II) /l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [41].

Geležies chlorido paruošimas (10ml):

$$X = \frac{0,02 \times 10 \times 270,3}{1 \times 1000} = \frac{54,06}{1000} = 0,054 \text{ g}$$

Kalibracinė tiesė $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$:

1. $\frac{5 \mu\text{l} \times 10}{2000 \mu\text{l}} = 0,025 \text{ ml} + 3 \text{ ml FRAP}$
2. $\frac{10 \mu\text{l} \times 10}{2000 \mu\text{l}} = 0,05 \text{ ml} + 3 \text{ ml FRAP}$
3. $\frac{15 \mu\text{l} \times 10}{2000 \mu\text{l}} = 0,075 \text{ ml} + 3 \text{ ml FRAP}$
4. $\frac{20 \mu\text{l} \times 10}{2000 \mu\text{l}} = 0,1 \text{ ml} + 3 \text{ ml FRAP}$
5. $\frac{25 \mu\text{l} \times 10}{2000 \mu\text{l}} = 0,125 \text{ ml} + 3 \text{ ml FRAP}$

Ir praskiedžiame iki 10 ml H_2O . Sugertis matuojama prie 593 nm bangos ilgis [41].

2.6.3. Chlorofilo a ir b bei karotinoidų nustatymas augaluose

Chlorofilo a ir b nustatymui pasveriami 0,1 g augalų lapų, kurie susmulkinami grūstuvėlyje. Įpilama 10 ml 96 % etanolio, sumaišoma iki vientisos masės ir filtruojama. Nufiltruoto ekstrakto tūris išmatuojamas cilindru. Ekstraktai praskiedžiami etanoliumi iki tol, kol šviesos sugerties praskiestų tirpalų būtų nuo 0,1 iki 0,8 ribose. Filtratas supilamas į matavimo kiuvetę ir matavimai atliekami spektrofotometru 662 nm (chlorofilo a), 644 nm (chlorofilo b) ir 441 nm (karotinoidams) bangų ilgiuose [62].

Pigmentų koncentracija (mg/l) apskaičiuojama pagal 2.3; 2.45; 2.6 formules:

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg/l): } C_a = 9,784 \times D_{662} - 0,99 \times D_{644}, \quad (2.3)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg/l): } C_b = 21,426 \times D_{644} - 4,65 \times D_{662}, \quad (2.4)$$

$$C_a + C_b = 5,134 \times D_{662} + 20,436 \times D_{644}, \quad (2.5)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija (mg/l): } C_k = 4,695 \times D_{441} - 0,268 \times C_A + C_B, \quad (2.6)$$

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojama pagal 7 formulę:

$$X = \frac{C \times V \times V_2 \times 100}{n \times V_1 \times 1000}, \quad (2.7)$$

Čia C – pigmentų koncentracija, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml (paimtas praskiedimui);

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g [62].

2.6.4. Bendras fenolinių junginių nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Sausa, susmulkinta augalinė medžiaga (0,1 g) yra pasveriami ir į mėgintuvėlį įpilama 10 ml acetono (70 %) ir maišoma termostatuojamajame kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Mėginys centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min 4 °C. Supernatantas surenkamas ir laikomas ant ledo [63].

Kalibravimo kreivės parengimas. Paimama 0,0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 110; 120; 130 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo, pridedama distiliuoto vandens, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų lygus 500 µl. Į šį tirpalą pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje tamsoje. Po 40 min iš matuojama šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje prieš tuščią mėginį [63].

Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas. Paimama paruošto ekstrakto (10, 20, 30, 50, 100 µl) ir praskiedžiama vandeniui iki 500 µl. Pridedama į jį 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir tada įpilama 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir matuojama tirpalo šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje po 40 min laikyto tamsoje [63].

Bendra fenolinių junginių koncentracija mg/100mg apskaičiuojama iš 2.8 formulės:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{n \times V_1}; \quad (2.8)$$

Čia a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg [63].

2.6.5. Katalazės aktyvumo nustatymas

0,1 augalinės žaliavos susmulkinama ir tirpių baltymų ekstrakcija vykdoma 0,05 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH=7,8) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditiotreitolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1–3 mg polivinilpirolidono. Mėginys centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min, surinktas supernatantas dar kartą centrifuguojamas Eppendorf mėgintuvėliuose. Baltymų nustatymui paimama 200 μl mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošiama baltymų kiekio kalibravimo kreivė pagal albuminą. Reakcijos mišinyje 4 ml tūrio yra 100 μl fermentinio preparato, 3900 μl 0,05 M K/Na fosfatinio buferio. Prieš matavimą į reakcijos mišinį įpilama 0,1 M 0,2 ml vandenilio peroksido. Šviesos sugerties matavimo dinamika registruojama 3 minutes 240 nm bangos ilgyje. Matavimo rodmenys nuimami kas 2 sekundes. Fermento aktyvumas apskaičiuojamas naudojant 2.9 formulę:

$$A = \frac{1000 \times \Delta \bar{E} \times V}{k \times m}; \quad (2.9)$$

Čia A – sunaudoto vandenilio peroksido kiekis per 1 minutę/1 mg baltyminio preparato;

$\Delta \bar{E}$ – vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;

V – bendras mišinio tūris, m;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 32,57;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg. (Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal kalibravimo kreivę) [64].

2.6.6. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinama ir vykdoma ekstrakcija, 0,066 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH=7,4) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditioteritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1–3 mg polivinilpirolidono. Mėginys maišomas kratytuve 10 min 25 °C. Mėginys centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir supernatantas (400 μl) dar kartą centrifuguojamas Eppendorf tipo mėgintuvėliuose [39].

Baltymų nustatymui paimama 200 μl mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošiama baltymų kiekio kalibravimo kreivė pagal albuminą. Į kitą mėgintuvėlį įpilama 40 μl mėginio, 400 μl 40 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8); 200 μl 10 mM L-metionino; 200 μl 54 μM nitromėlynojo tetrazolio; 500 μl 0,025 % Tritono X-100; 20 μl 3 μM riboflavinai, 620 μl distiliuoto vandens. Taip pat paruošiamas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato. Mėginiai apšviečiami liuminescentinėmis lempomis 30 min. Šviesos sugertis matuojama 560 nm bangos ilgyje [39].

Fermento SOD aktyvumas apskaičiuojamas pagal 2.10 formulę:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \times m}; \quad (2.10)$$

Čia A – SOD aktyvumas vnt/mg;

E_K – šviesos sugertis kontrolinio mėginio;

E_T – šviesos sugertis tiriamojo mėginio;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg (Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordo metodą) [39].

Albumino kalibracinė tiesė. Albumino tirpalas ruošiamas taip: 25 mg albumino ištirpinama 25 ml vandens. Iš pradinio tirpalo imami žinomo tūrio mėginiai (ml) ir iki 10 ml skiedžiami distiliuotu vandeniu [39].

2.3 lentelė. Albumino kalibravimo kreivės sudarymas [39]

Eil. Nr.	Albumino pradinio tirpalo tūris, ml	Iki 10 ml skiesto tirpalo koncentracija mg/ml
1	0,2	0,02
2	0,4	0,04
3	0,6	0,06
4	0,8	0,08
5	1,0	0,1
6	1,2	0,12
7	1,4	0,14
8	1,6	0,16
9	1,8	0,18

Kalibravimo kreivei į pirmą mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml distiliuoto vandens, o į 2–10 mėgintuvėlius po 0,2 ml skiesto albumino tirpalo. Į visus mėgintuvėlius įpilama 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišomi ir matuojami spektrofotometru bangos ilgyje 595 nm. Braižoma kalibravimo kreivė [39].

2.6.7. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas

Augalinė žaliava (100 mg) homogenizuojama su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi ir tirpalas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min 4 °C. Supernatantas (0,3 ml) sumaišomas su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) ir inkubuojamas 95 °C temperatūroje 30 min, atšaldomas ir centrifuguojamas 15 min 9000 aps/min. Šviesos sugertis išmatuojama 532, 600 nm bangos ilgiuose. MDA koncentracija apskaičiuojama:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \times V_e \times 2}{k \times m_s \times V_a}, \quad (2.11)$$

Čia

C_x – MDA koncentracija $\mu\text{mol/g}$;

E – tirpalo šviesos sugertis;

V_e – ekstrakto tūris, ml;

V_a – ekstrakto tūris analizei, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas $156 \text{ Mm}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;

m_s – bandinio masė, ekstrakcijai, g [65].

2.6.8. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos susmulkinama su atšaldytu 4 ml 0,1 M fosfatinio buferiu (pH=7), kuris turi 1 mM ditioteritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO. Mėginys maišomas kratytuve 10 min 25 °C. Mėginys centrifuguojamas 9000 aps/min 20 min ir supernatantas (400µl) dar kartą centrifuguojamas Eppendorf mėgintuvėliuose. Baltymų nustatymui paimama 200 µl mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento bei šviesos sugertis išmatuojama 595 nm bangos ilgyje. Patuošiamas albuminą kalibravimo kreivė pagal albuminą. Reakcijos mišinyje (6ml) yra 3 ml 0,1 M fosfatinio buferio (pH=7), 0,6 ml 0,5 mM askorbo rūgšties, 0,06 ml 0,1 mM EDTA, 0,06 ml 0,1 mM vandenilio peroksido ir 0,2 ml fermentinio preparato. Reakcija prasideda pridėjus vandenilio peroksido ir matuojama šviesos sugertis 290 nm bangos ilgyje ir fiksuojama 3 minutes. Askorbatperoksidazės aktyvumas nustatomas pagal 2.12 formulę:

$$A = \frac{\Delta E_{min} \times \frac{V_{pav}}{1000} + V_{buf} + V_{perok}}{k \times m}, \quad (2.12)$$

Čia A – fermento aktyvumas, mmol/mg;

ΔE_{min} – vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;

V – pavyzdžio tūris, µl;

V_{buf} – buferio tūris, ml;

V_{peroks} – vandenilio peroksido tūris, ml;

k – molinės ekstinkcijos koeficientas 2,8 mmol/cm;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg. (Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordą).

2.6.9. L-Prolino koncentracijos nustatymas

100 mg vaistinės augalinės žaliavos susmulkinama ir užpilama 4 ml distiliuotu vandeniu mėgintuvėlyje. Mėgintuvėlis su augaline žaliava 3 kartus užverdama iki virimo ir atšaldoma. Atšaldytas mėgintuvėlis reikia centrifuguoti 10 min 9000 aps/min. Gautas ekstraktas praskiedžiamas iki 6 ml ir toliau naudojamas tyrimams [66].

Į kitą mėgintuvėlį įpilama 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento (1,25 g ninhidrino, 20 ml 6 M H_3PO_4 , 30 ml acto rūgšties) ir verdama 1 val verdančioje vandens vonelėje. Į kontrolinį mėginį vietoj ekstrakto įpilama 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis išmatuojama 520 nm bangos ilgyje. Prolino koncentracija apskaičiuojama naudojantis kalibravimo kreive pagal 2.13 formulę:

$$C_X = \frac{E \times k \times V_{bendras}}{V_{paimta} \times m}, \quad (2.13)$$

Čia

C_X – prolino koncentracija µmol/g;

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – prolino kiekis, gautas pagal kalibravimo kreivę (µmol);

$V_{bendras}$ – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;
 m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g [66].

2.6.10. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose

Išdžiovinta augalinė masė (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas ir naudojamas tyrimamas. Į 0,5 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginius, supilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml $K_3[Fe(CN)_6]$. Sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Centrifuguojama 10 min [47].

Viršutinio tirpalo (2,5 ml) sumaišoma su 2,5 ml distiliuotu vandeniu ir 0,5 0,1 % $FeCl_3$. Mėginiai išmatuojami 700 nm bangos ilgyje. Didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes [47].

$$FeCl_3 \text{ 10 ml} = \frac{0,1 \times 100}{10} = 0,01 \text{ g;}$$

Koncentracijos:

$$X = \frac{0,1 \times 1}{5} = 0,02 \text{ g/ml}$$

Naudojam 0,005 ir 0,0025 koncentracijas

$$X = \frac{0,005 \times 0,5}{0,02} = 0,125 \text{ ml}$$

$$X = \frac{0,0025 \times 0,5}{0,02} = 0,0625 \text{ ml}$$

0,5 ml – 0,125 ml = 0,375 ml (metanolio)

0,5 ml – 0,0625 ml = 0,4375 (metanolio).

2.6.11. Flavonoidų koncentracijos nustatymas augaluose

0,5 g susmulkintos augalinės žaliavos maišoma su 5 ml 80 % metanolio parą laiko esant 150 aps/min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir supernatantas naudojamas tolimesniam tyrimui. Bendra flavonoidų koncentracija nustatoma su aliuminio chloridu. Į augalo ekstraktą 0,1 ml įpilama metanolio 80 % iki 1 ml ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliekamas stovėti 30 min ir absorbcija išmatuojama 415 nm bangos ilgyje. Flavonoidų koncentracija apskaičiuojama pagal kvercetino koncentraciją, gautą iš kalibracinės kreivės. Flavonoidų koncentracija mg/g pagal kvercetiną apskaičiuojama pagal 2.14 formulę:

$$C = \frac{C_1 \times V}{g}; \tag{2.14}$$

Čia C_1 – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibravimo kreivę;

V – ekstrakto pradinis tūris, ml;

g – augalo masė, g [67].

Kvercetino kalibracinė tiesė. Kvercetas (1 mg/ml) ištirpinamas metanolyje. Toliau paruošiamos kvercetino koncentracijos: 10 mg/l; 20 mg/l; 30 mg/l; 40 mg/l; 50 mg/l.

1. Į pirmąjį mėgintuvėlį įpilama 0,1 ml kvercetino ir 0,15 ml aliuminio chlorido 20 % bei praskiedžiama iki 5 ml metanoliu.
2. Į antrąjį mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml kvercetino ir 0,15 ml aliuminio chlorido 20 % bei praskiedžiama iki 5 ml metanoliu.
3. Į trečiąjį mėgintuvėlį įpilama 0,3 ml kvercetino ir 0,15 ml aliuminio chlorido 20 % bei praskiedžiama iki 5 ml metanoliu.
4. Į ketvirtąjį mėgintuvėlį įpilama 0,4 ml kvercetino ir 0,15 ml aliuminio chlorido 20 % bei praskiedžiama iki 5 ml metanoliu.
5. Į penktąjį mėgintuvėlį įpilama 0,5 ml kvercetino ir 0,15 ml aliuminio chlorido 20 % bei praskiedžiama iki 5 ml metanoliu.

Absorbicija išmatuojama 415 nm bangos ilgyje. Braižoma kvercetino kalibracinė kreivė [67].

2.6.12. Liuteino koncentracijos nustatymas augaluose

Į augalinę žaliavą 100 mg įpilama 20 ml acetono ir maišoma 3 valandas 250 rpm 25 °C. Suspensija paliekama stovėti 5 min ir centrifuguojama 10 min 9000 aps/min 4 °C. Supernatantas yra surenkamas, nuosėdos maišomas pridėjus 10 ml acetono 1 valandą 250 rpm 25 °C. Mėginys yra centrifuguojamas 15 min 9000 aps/min ir šviesos sugertis išmatuojama 466 nm bangos ilgyje. Liuteino koncentracija nustatoma naudojant 2.15 formulę:

$$C = A_{466} / (14,45 \times 10^4) \times (1/b) \times 568,88 \times V/M \times 1L/10^3 \text{ml} \times 10^3 \text{mg/g} \times \text{Kg}/10^3 \text{g}; \quad (2.15)$$

Čia C – liuteino koncentracija (mg/g);

A_{466} – absorbcija;

b – bangos ilgis;

V – ekstrakto tūris, ml;

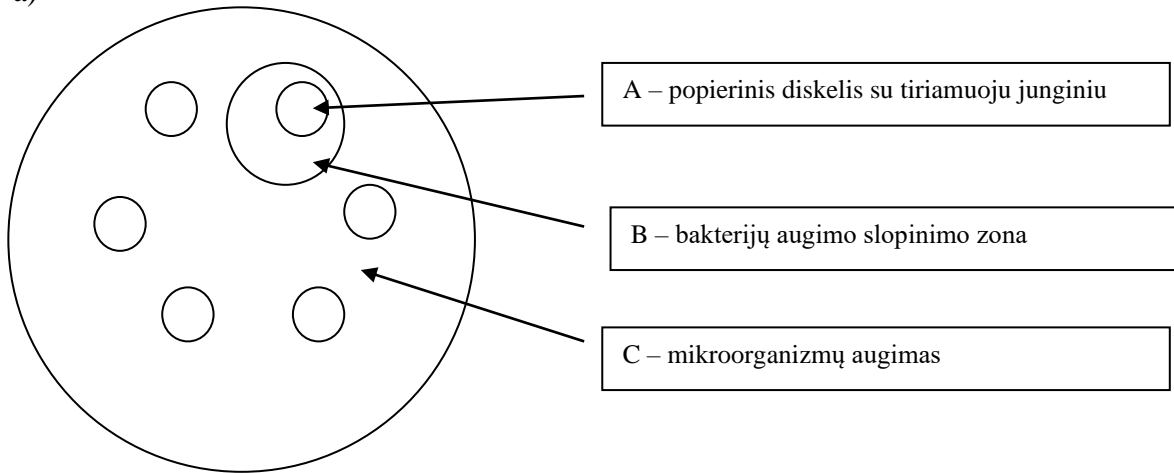
M – augalinė žaliava, kg;

$14,45 \times 10^4$ – molinės ekstinkcijos koeficientas ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [59].

2.6.13. Antibakterinis tiriamųjų junginių nustatymas

Į susmulkintą augalinę žaliavą (0,5 g) įpilama 5 ml DMSO ir paliekama 1–7 paroms kambario temperatūroje. Po 1–2 parų ekstraktas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min ir atliekamas antibakterinio aktyvumo įvertinimas prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas. Paruošiama LB terpė *Petri* lėkštelėse ir ant jų perkeliama gramteigiamos ir gramneigiamos bakterijos (50 μl). Po to į *Petri* lėkšteles įdedami diskeliai ir ant jų užpilama 25 μl tiriamųjų augalų ekstrakto (2.1 pav.). *Petri* lėkštelės įdedamos į termostatą 37 °C. Po paros stebimas vaistinių augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas. Bakterijų šviesos sugertis išmatuojama 600 nm bangos ilgyje.

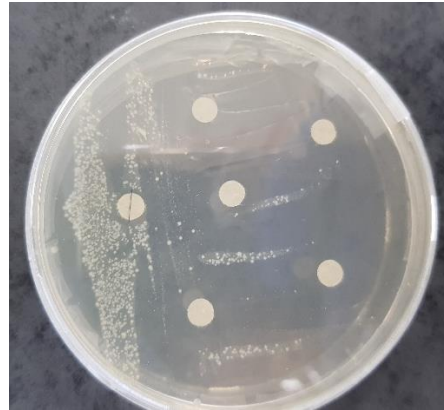
a)



b)



c)



2.1 pav. Antibakterinio poveikio įvertinimas: a) antibakterinio poveikio įvertinimas, b) *Petri* lėkštelė su kultivuojama bakterijų kultūra, c) diskelių išdėstymas *Petri* lėkštelėje

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

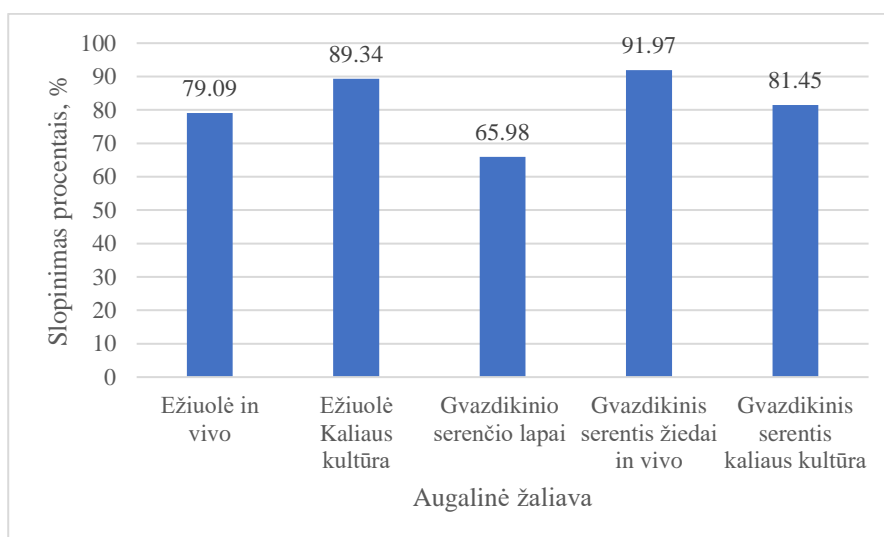
Svarbiausias augalų auginimas steriliomis sąlygomis ant maitinamųjų terpių vadinamas izoliuotų audinių kultūra. Tinkamoms augalų kultūrų augimo sąlygoms užtikrinti reikia: atrinkti atitinkamus kultūrų audinius, parinkti maitinimo terpes su mikro, makro elementais ir augimo hormonais (svarbu užtikrinti maitinamosios terpės konsistenciją), sterilias sąlygas [35]. Gvazdikinio serenčio ir kiekio kaliaus kultūros *in vitro* pateiktos 3.1 paveiksle.



3.1 pav. Gvazdikinio serenčio ir kiekio kaliaus kultūros *in vitro*

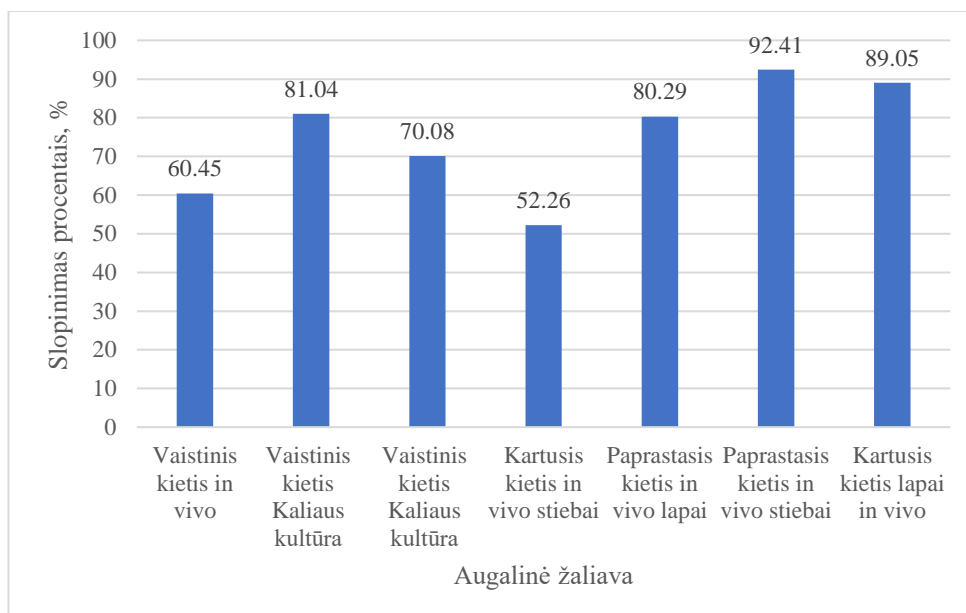
3.1. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą

Augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvertinamas kiek procentų stabilus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai. Fenoliniams junginiams būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo inaktyvinti laisvuosius radikalus [40].



3.2 pav. Augalų ekstraktų DPPH slopinimo įvertinimas

Vertinant ežiuolę ir serentį, buvo nustatytas antioksidacinis aktyvumas, kurio rezultatai pateikti grafike (3.2 pav.). Didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 91,97 % ir ežiuolės kaliaus kultūrų – 89,34 %, mažiausias aktyvumas buvo gvazdikinio serenčio lapų – 65,98 %.

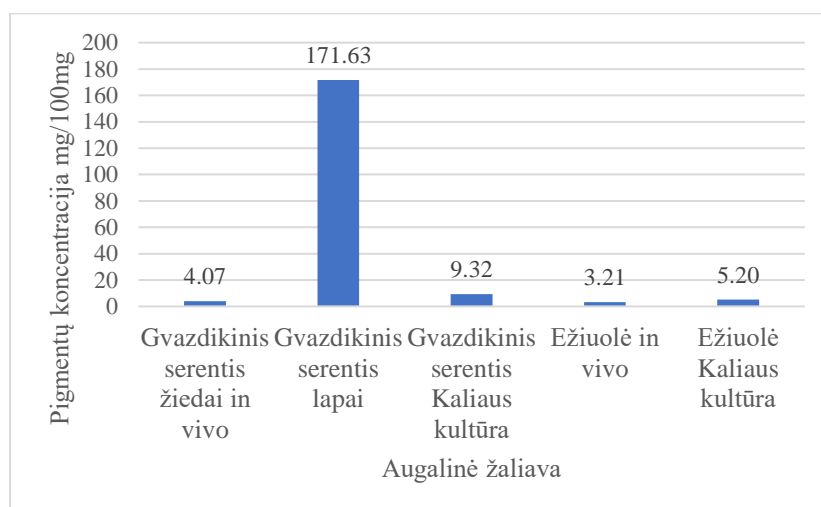


3.3 pav. Kiečio augalų ekstraktų DPPH slopinimo įvertinimas

Kiečio augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo pagal DPPH rezultatai pateikti grafike (3.3 pav.). Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas ekstraktuose: paprastojo kiečio *in vivo* stiebų – 92.41 %, karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 89,05 % ir vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 81,04 %. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas ekstraktuose: vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 70,08 %, vaistinio kiečio *in vivo* – 60,45 %, karčiojo kiečio *in vivo* stiebų – 52,26 %.

3.2. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas augaluose

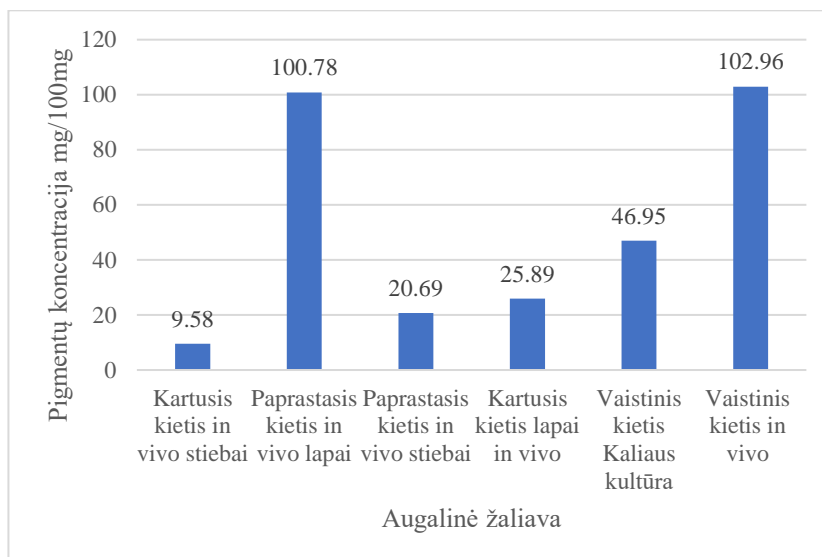
Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu spektrofotometru bangos ilgiuose: chlorofilui *a* (662 nm); chlorofilui *b* (664 nm); karotinoidams (441nm) [62].



3.4 pav. Chlorofilas *a* esantis ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

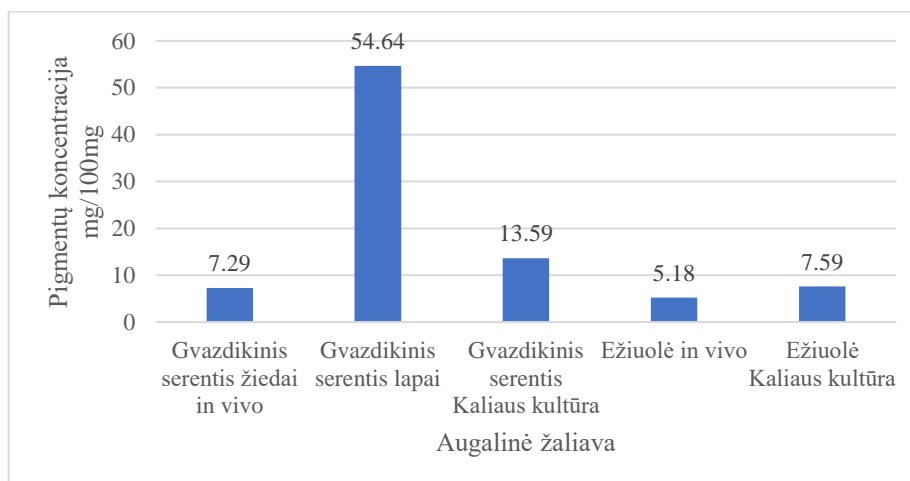
Pigmentų koncentracijos įvertinimo metu nustatyta, kad chlorofilo *a* koncentracija didžiausia buvo gvazdikinio serenčio lapų ekstrakto – 171,63 mg/100mg, o mažiausia ežiuolės *in vivo* ekstrakto – 3,21 mg/100mg. Taip pat, tokios pat mažos chlorofilo *a* koncentracijos buvo

ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 4,07%, ežiuolės kaliaus kultūrų – 5,20 % bei gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų 9,32%. Rezultatai pateikiami grafike (3.4 pav.).



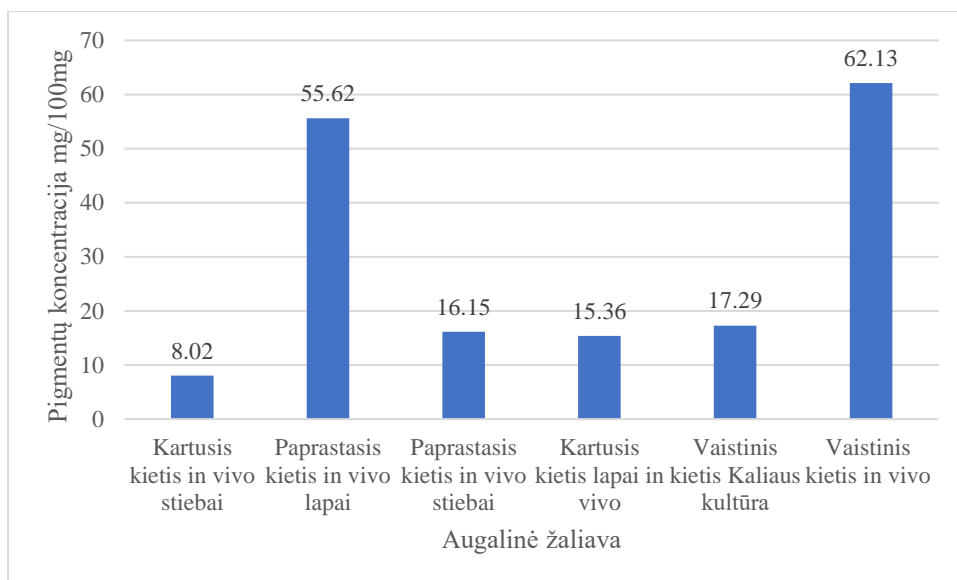
3.5 pav. Chlorofilas *a* esantis kiečio augalų ekstraktuose

Nustatytos trys didžiausios chlorofilo *a* koncentracijos ekstraktuose: vaistinio kiečio *in vivo* – 102,96 mg/100mg, paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 100,78 mg/100mg ir vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 46,95 mg/100mg. Trys mažiausios chlorofilo *a* koncentracijos nustatytos ekstraktuose: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 9,58 mg/100mg, paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 20,69 mg/100mg ir karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 25,89 mg/100mg. Rezultatai pateikiami grafike (3.5 pav.).



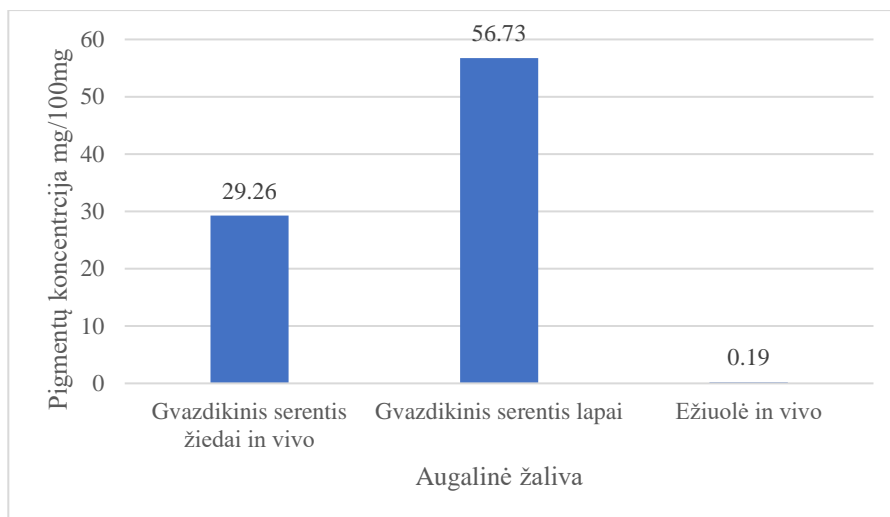
3.6 pav. Chlorofilas *b* esantis ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Chlorofilo *b* buvo koncentracija buvo gvazdikinio serenčio lapų ekstrakto – 54,64 mg/100mg, o mažiausia ežiuolės *in vivo* ekstrakto – 5,18 mg/100mg. Mažos koncentracijos buvo ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 7,29 mg/100mg, ežiuolės kaliaus kultūrų – 7,59 mg/100mg bei gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 13,59 mg/100mg. Rezultatai pateikiami grafike (3.6 pav.).



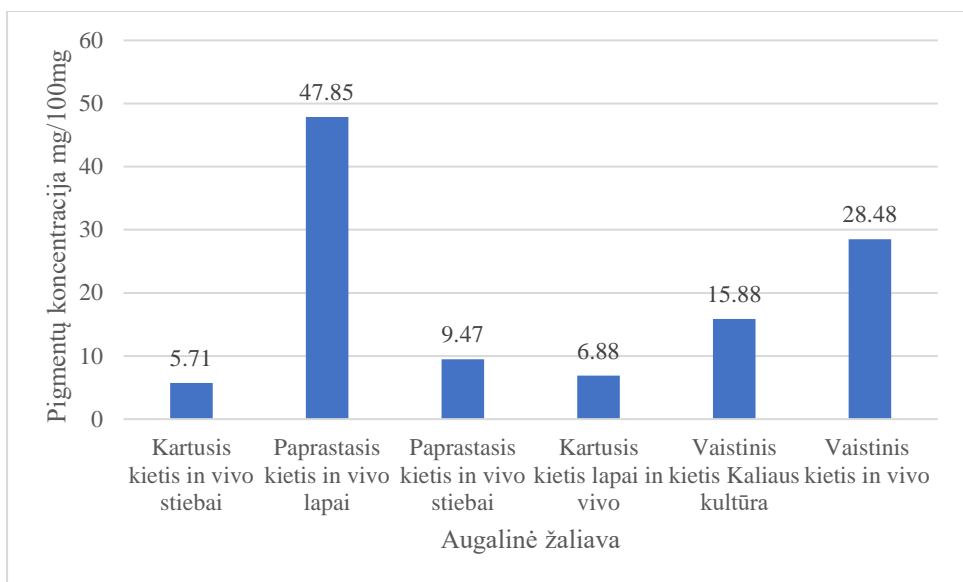
3.7 pav. Chlorofilas *b* esantis kiečio augalų ekstraktuose

Kiečio augalų ekstraktuose chlorofilo *b* koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: vaistinio kiečio *in vivo* – 62,13 mg/100mg, paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 55,62 mg/100mg. Mažiausios koncentracijos nustatytos karčiojo kiečio stiebų *in vivo* ekstrakto – 8,02 mg/100mg, karčiojo kiečio lapų *in vivo* ekstrakto – 15,36 mg/100mg, likusių augalų ekstraktų koncentracijos labai nežymiai skyrėsi nuo karčiojo kiečio lapų *in vivo* ekstrakto koncentracijos (3.7 pav.).



3.8 pav. Karotinoidų koncentracijos ežiulės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Didžiausios karotinoidų koncentracijos buvo ekstraktuose: gvazdikinio serenčio lapų – 56,73 mg/100mg ir gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 29,26 mg/100mg. Mažiausia karotinoidų koncentracija buvo ežiulės *in vivo* ekstrakto – 0,19 mg/100mg. Karotinoidų nebuvo aptikta gvazdikiniame serenčio kaliaus kultūrų ir ežiulės kaliaus kultūrų ekstraktuose (3.8 pav.).

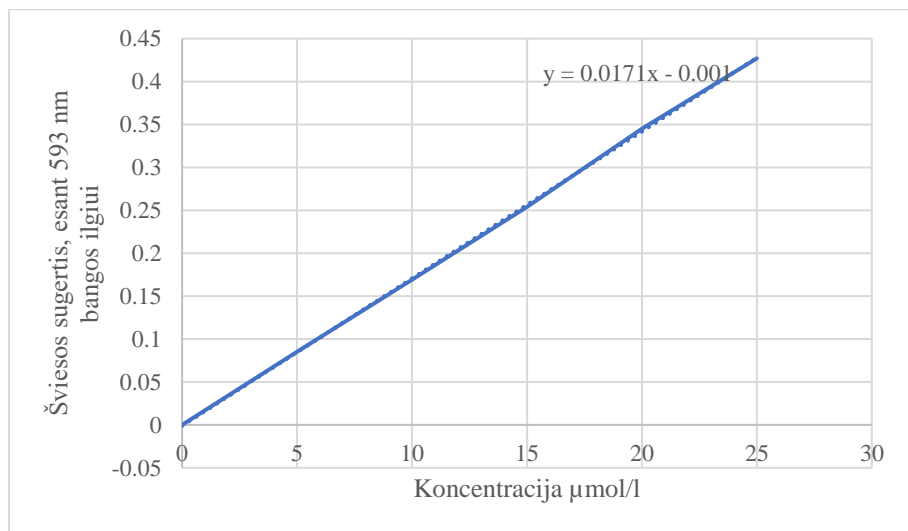


3.9 pav. Karotinoidų koncentracijos kiečio augalų ekstraktuose

Kiečio augalų ekstraktuose didžiausios karotinoidų koncentracijos buvo: paprastojo kiečio *in vivo* – 47,85 mg/100mg, vaistinio kiečio *in vivo* – 28,48 mg/100mg ir vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 15,88 mg/100mg. Mažiausios karotinoidų koncentracijos nustatytos – karčiojo kiečio stiebų, lapų *in vivo* ekstraktuose (3.9 pav.).

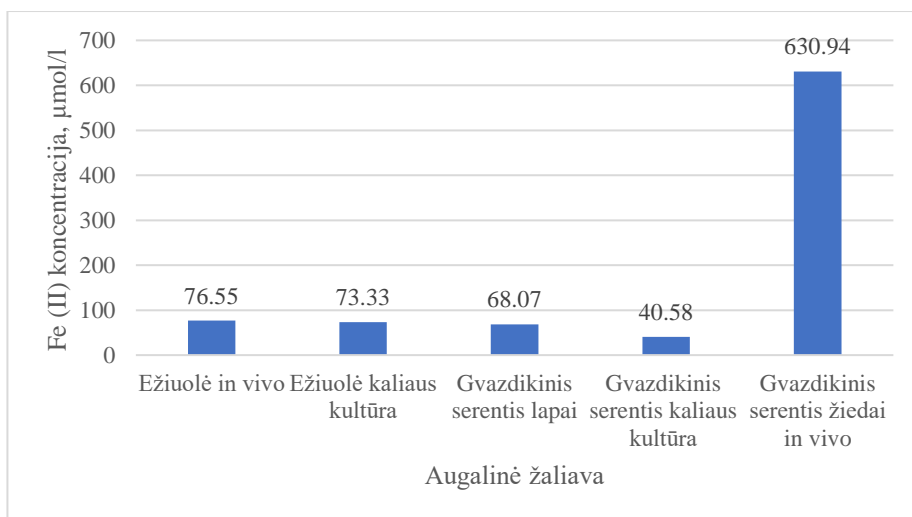
3.3. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Antioksidacinis aktyvumas augaluose buvo atliekamas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną. Šis metodas nurodo augalo redukuojančias savybes, pagal Fe^{3+} -TPTZ redukcija į Fe^{2+} -TPTZ (mėlyna spalva). Kuo redukuojančios savybės stipresnės tuo intensyvesnė tirpalo spalva. Pagal kalibravimo kreivę buvo gauta tiesinė Fe^{2+} jonų koncentracijos priklausomybė nuo šviesos sugerties [41].



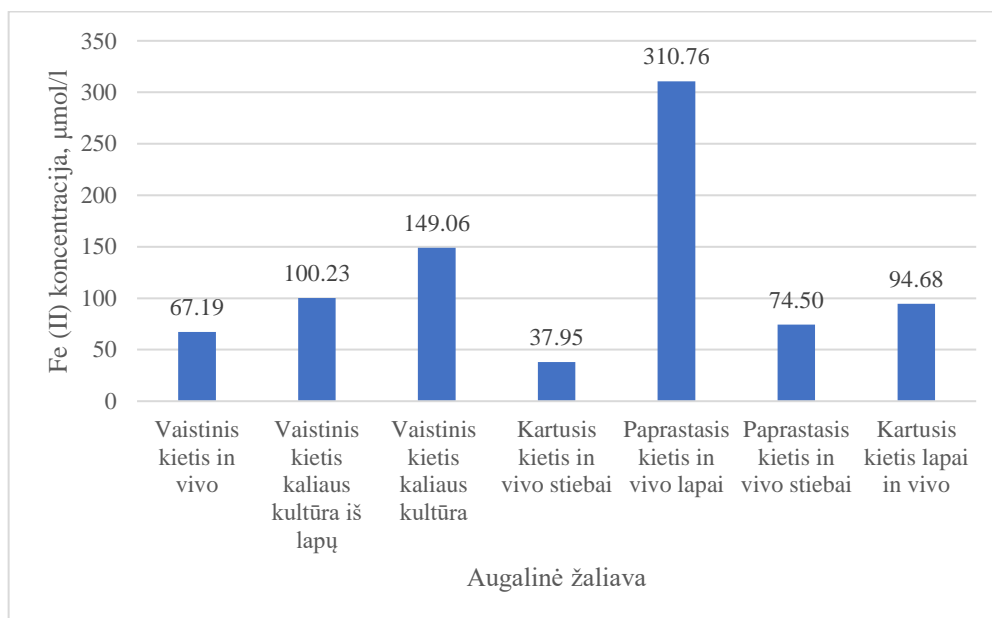
3.10 pav. $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{mol/l}$) kalibracinė kreivė

Išvesta lygtis $y=0,0171x-0,001$ (3.10 pav.) ir ji naudojama apskaičiuoti antioksidacinį aktyvumą tiriamųjų augalų ekstraktuose.



3.11 pav. Fe (II) koncentracijos (µmol/l) įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Įvertinant ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktų koncentracijas pagal FRAP metodą Fe (II) nustatyta, didžiausia Fe (II) koncentracija buvo gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* ekstrakto – 630,94 µmol/l, o mažiausia gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų ekstrakto – 40,58 µmol/l. Ežiuolės *in vivo* ekstrakto, ežiuolės kaliaus kultūrų ekstrakto bei gvazdikinio serenčio lapų ekstrakto Fe (II) koncentracijos nežymiai skyrėsi nuo 68,07–76,55 µmol/l (3.11 pav.).

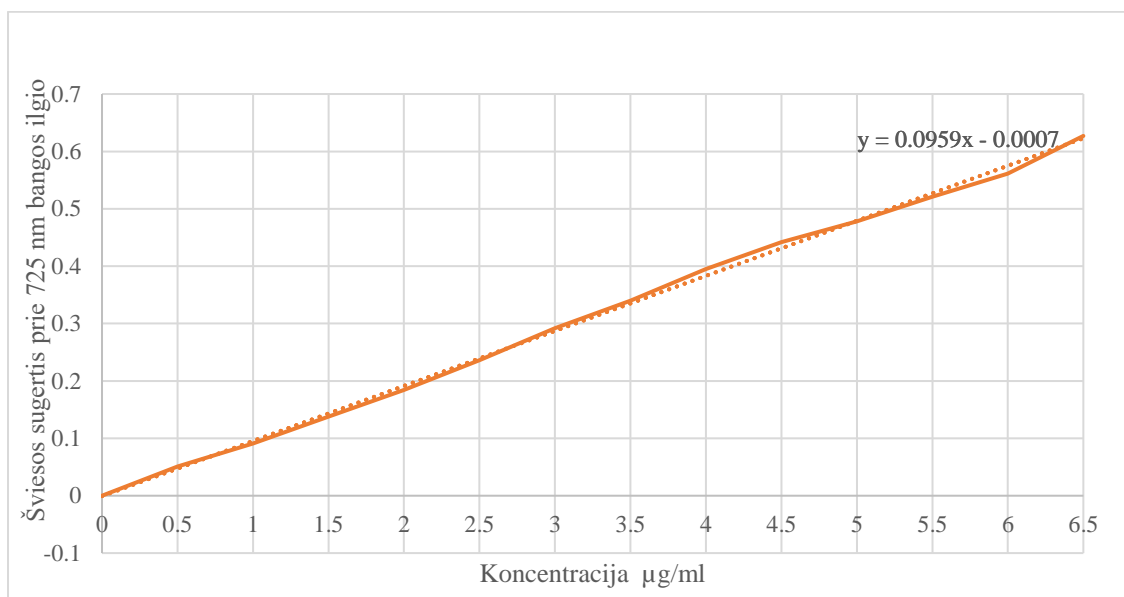


3.12 pav. Fe (II) koncentracijos (µmol/l) įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose

Įvertinant vaistinio, paprastojo ir karčiojo kiečio augalų ekstraktus, didžiausios Fe (II) koncentracijos nustatytos ekstraktuose: paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 310,76 µmol/l, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 149,06 µmol/l ir karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 94,68 µmol/l. Mažiausios Fe (II) koncentracijos buvo ekstraktuose: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 37,95 µmol/l, vaistinio kiečio *in vivo* – 67,19 µmol/l ir paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 74,50 µmol/l (3.12 pav.).

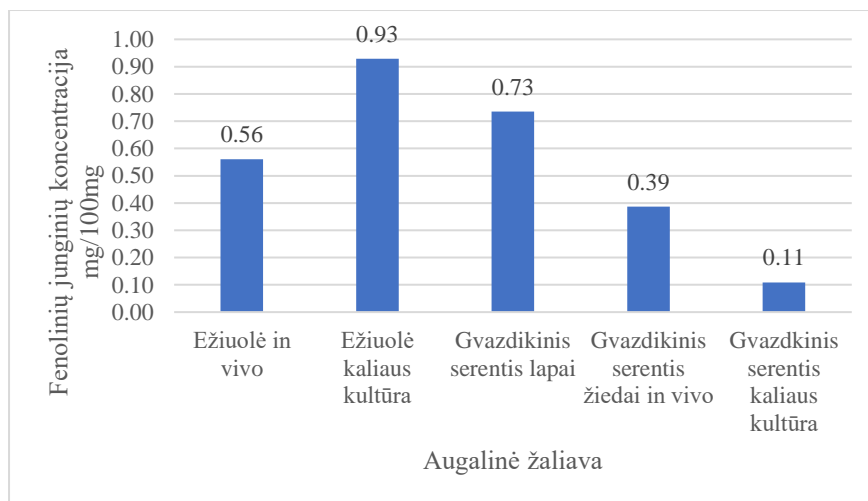
3.4. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Pagal Folino-Kiokalto metodą galima nustatyti bendrąsias fenolinių junginių koncentracijas augalų ekstraktuose (skirtingų tūrių 30, 50, 100).



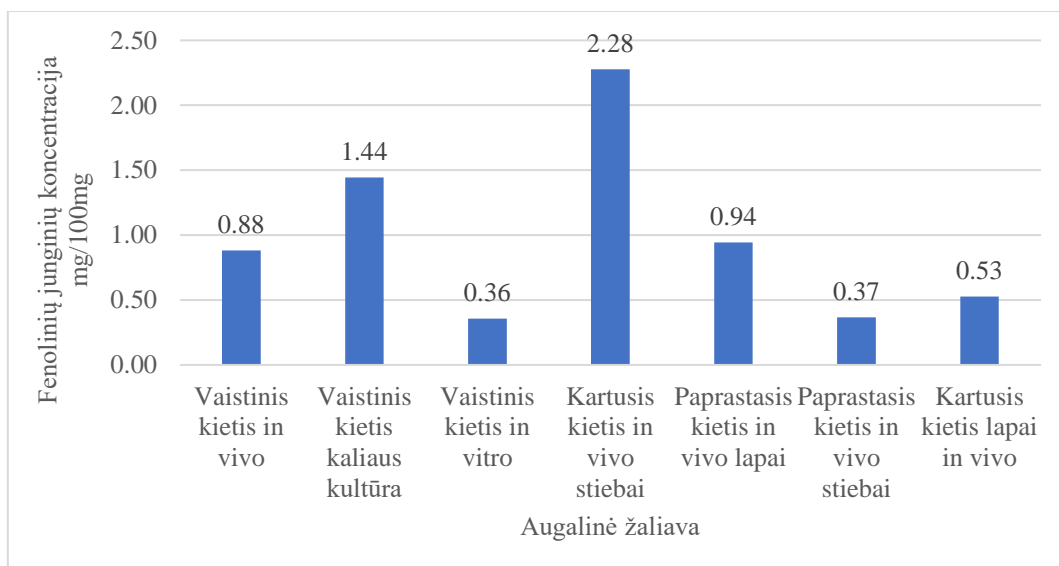
3.13 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

Kalibracinė kreivė reikalinga, tanino rūgšties koncentracijai apskaičiuoti. Gauta lygtis $y=0,0959x-0,0007$ (3.13 pav.).



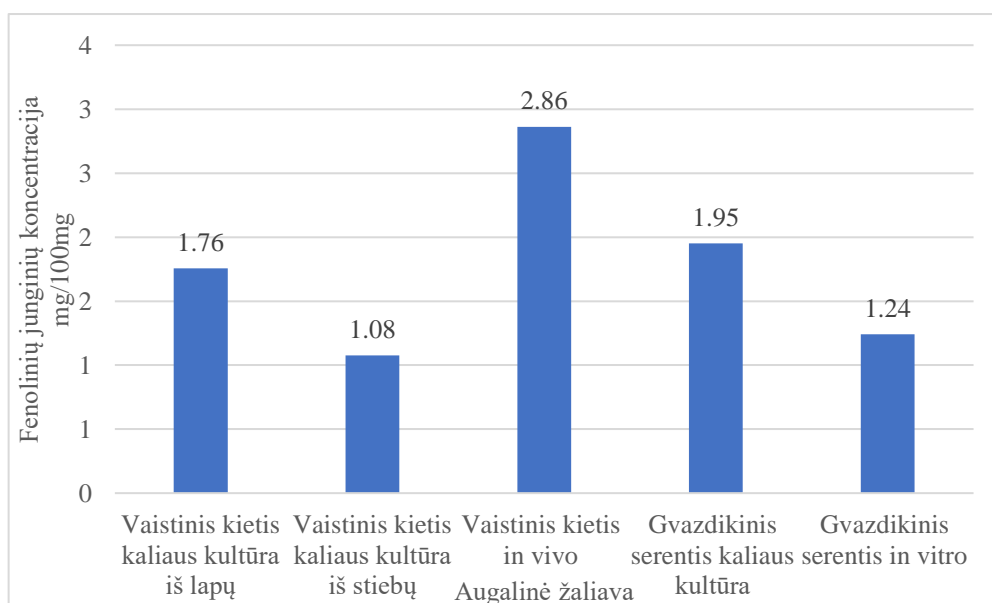
3.14 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose (30 μl ekstrakto tūris)

Didžiausios bendrosios fenolinių junginių koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: ežiuolės kaliaus kultūrų (30 μl) – 0,93 mg/100mg, gvazdikinio serenčio lapų – 0,73 mg/100mg ir ežiuolės *in vivo* – 0,56 mg/100mg. Mažiausios bendrosios fenolinių junginių koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 0,11 mg/100mg bei gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 0,39 mg/100mg (3.14 pav.).



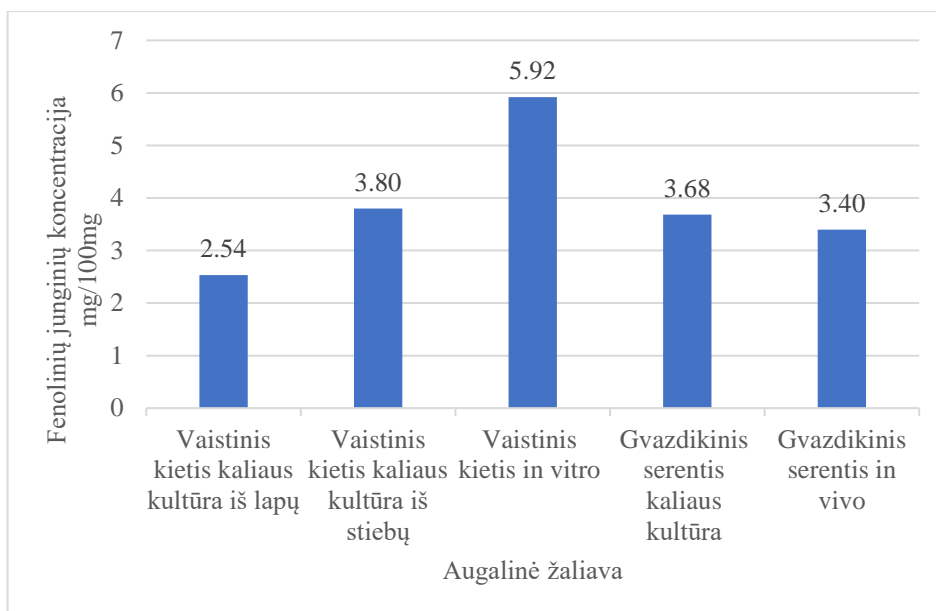
3.15 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose (30 μ l ekstrakto tūris)

Tame pačiame paimtame tūryje, lyginant kiečio augalų ekstraktus didžiausios Fe (II) koncentracijos nustatytos ekstraktuose: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 2,28 mg/100mg, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 1,44 mg/100mg ir paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 0,94 mg/100mg. Mažiausios Fe (II) koncentracijos nustatytos vaistinio kiečio *in vitro* – 0,36 mg/100mg, paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 0,37 mg/100mg ir karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 0,53 mg/100mg (3.15 pav.).



3.16 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas vaistinio kiečio ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose (50 μ l ekstrakto tūris)

Didžiausios bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos buvo nustatytos vaistinio kiečio ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose (50 μ l): vaistinio kiečio *in vivo* – 2,86 mg/100mg, gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 1,95 mg/100mg ir vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš lapų – 1,76 mg/100mg. Mažiausios bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš stiebų – 1,08 mg/100mg ir gvazdikinio serenčio *in vitro* – 1,24 mg/100mg (3.16 pav.).

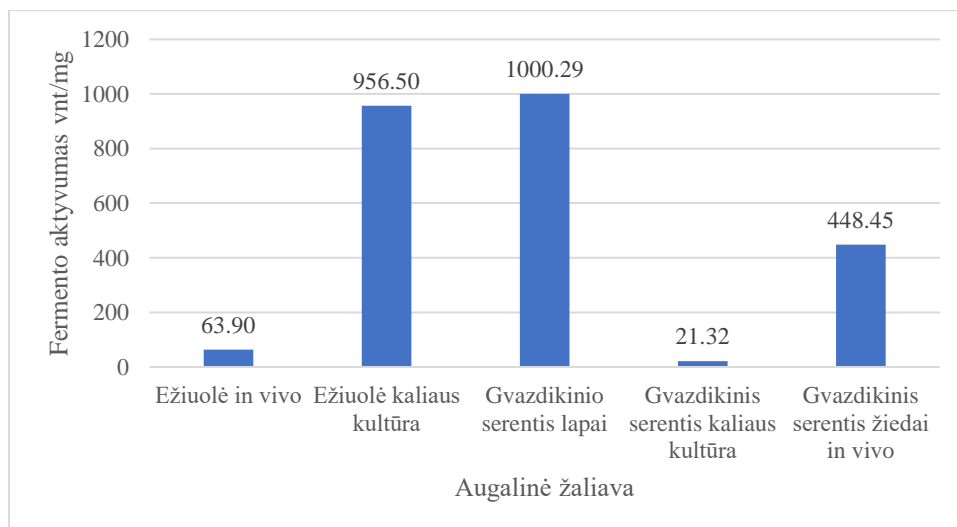


3.17 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas vaistinio kiekio ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose (100 μ l ekstrakto tūris)

Vaistinio kiekio ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose didžiausios bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: vaistinio kiekio *in vitro* – 5,92 mg/100mg, vaistinio kiekio kaliaus kultūrų iš stiebų – 3,80 mg/100mg ir gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 3,68 mg/100mg. Mažiausios fenolinių junginių koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: vaistinio kiekio kaliaus kultūrų iš lapų – 2,54 mg/100mg ir gvazdikinio serenčio *in vivo* – 3,40 mg/100mg (3.17 pav.).

3.5. Katalazės aktyvumo įvertinimas

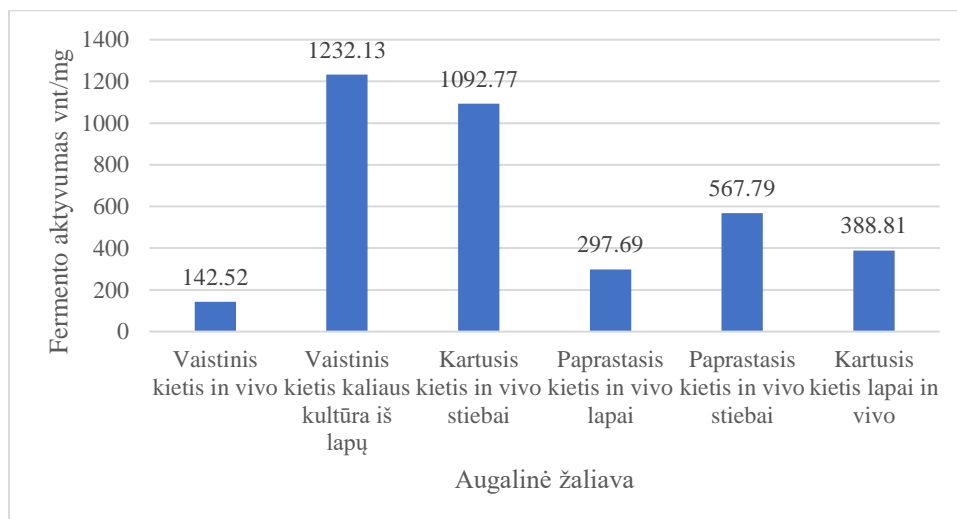
Katalazės aktyvumas nustatomas sunaudoto vandenilio peroksido kiekiu per 1 minutę/1mg baltyminio preparato.



3.18 pav. Katalazės aktyvumo įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Didžiausias fermento aktyvumas (palyginus ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalus) buvo ekstraktuose: gvazdikinio serenčio lapų – 100,29 vnt/mg, ežiuolės kaliaus kultūrų – 956,50 vnt/mg ir gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 448,45 vnt/mg. Mažiausias fermentų

aktyvumas buvo nustatytas ekstraktuose: gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 21,32 vnt/mg ir ežiuolės *in vivo* – 63,90 vnt/mg (3.18 pav.).

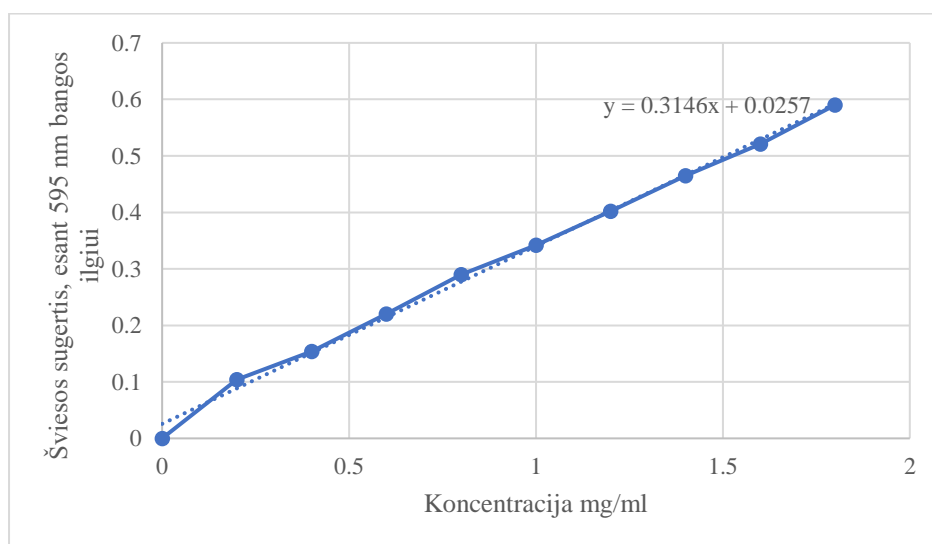


3.19 pav. Katalazės aktyvumo įvertinimas kiekio augalų ekstraktuose

Lyginant katalazės fermentų aktyvumą tarp kiekio augalų didžiausi fermento aktyvumai buvo ekstraktuose: vaistinio kiekio kaliaus kultūrų iš lapų – 1232,13 vnt/mg, karčiojo kiekio stiebų *in vivo* – 1092,77 vnt/mg ir paprastojo kiekio stiebų *in vivo* – 567,79 vnt/mg. Mažiausias katalazės fermentų aktyvumas buvo ekstraktuose: vaistinio kiekio *in vivo* – 142,52 vnt/mg, paprastojo kiekio lapų *in vivo* ekstrakte – 297,69 vnt/mg ir karčiojo kiekio lapų *in vivo* – 388,81 vnt/mg (3.19 pav.).

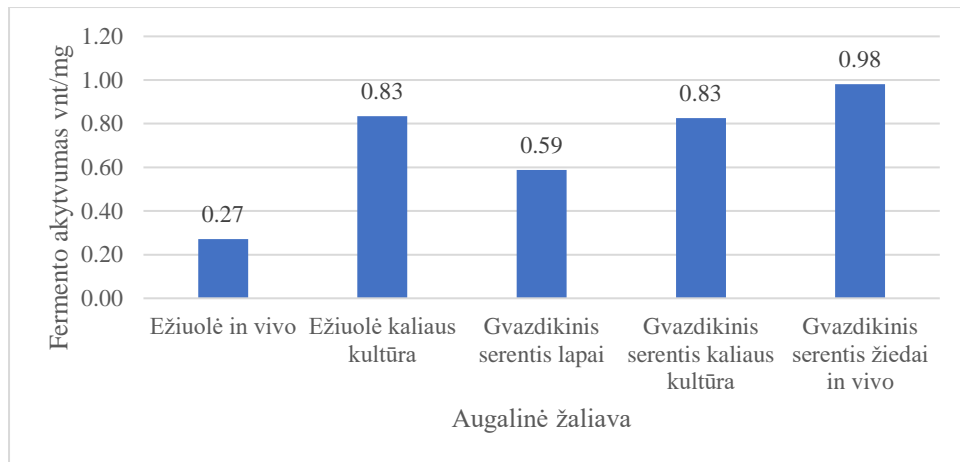
3.6. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Fermento SOD aktyvumo įvertinimui buvo naudojami ežiuolės, gvazdikinio serenčio ir kiekio augalų ekstraktai, būtina sužinoti baltymo masę preparato tūryje, todėl braižoma albumino kalibracinė kreivė [39].



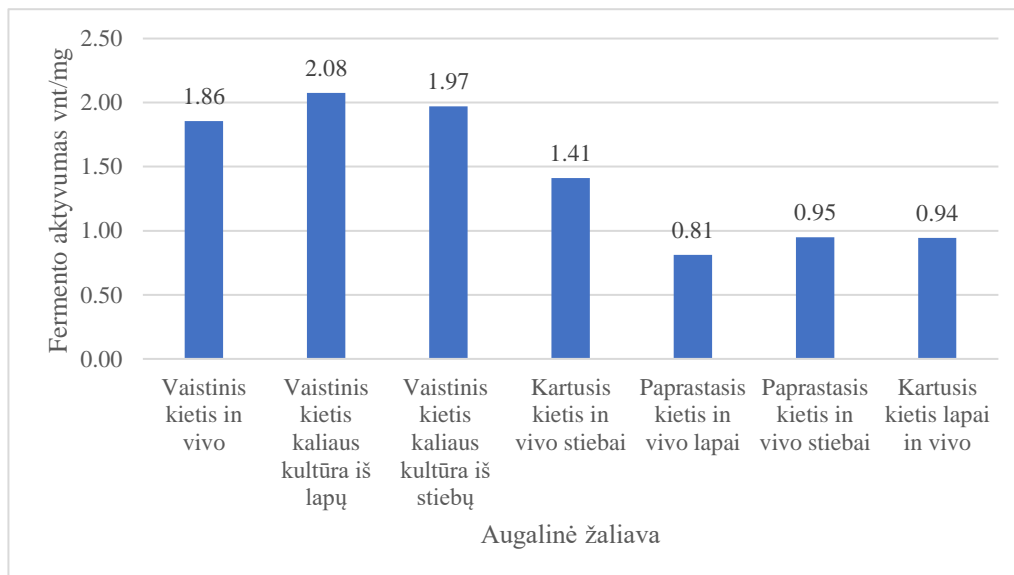
3.20 pav. Albumino kalibracinė kreivė

Išvesta lygtis baltymams skaičiuoti $y=0,3146x+0,0257$ (3.20 pav.).



3.21 pav. Fermento SOD aktyvumo įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Didžiausias SOD fermento aktyvumas (ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų) buvo nustatytas ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 0,98 vnt/mg, ežiuolės kaliaus kultūrų – 0,83 vnt/mg ir gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 0,83 vnt/mg. Mažiausias SOD aktyvumas buvo ekstraktuose: ežiuolės *in vivo* – 0,27 vnt/mg ir gvazdikinio serenčio lapų – 0,59 vnt/mg (3.21 pav.).



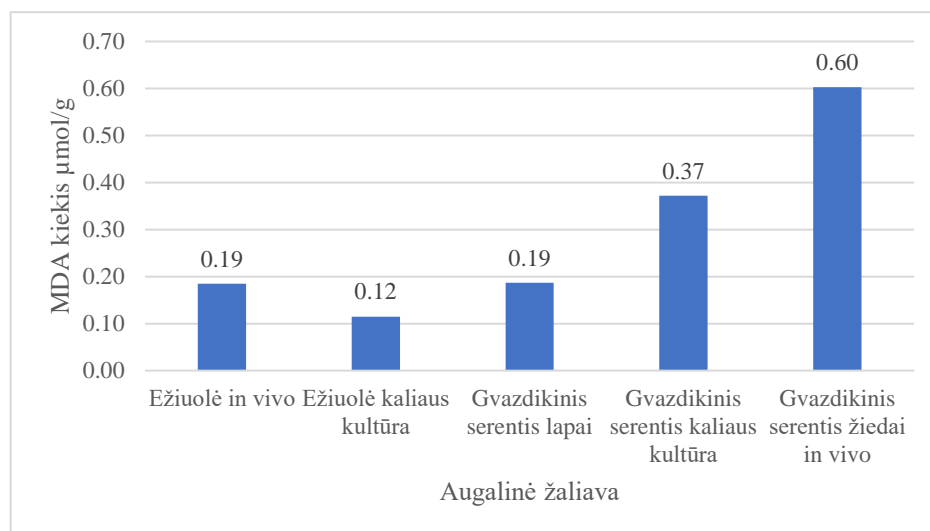
3.22 pav. Fermento SOD aktyvumo įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose

Didžiausias fermento SOD aktyvumas (vaistinio, karčiojo, paprastojo kiečio augalų) buvo nustatytas ekstraktuose: vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš lapų – 2,08 vnt/mg, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš stiebų – 1,97 vnt/mg bei vaistinio kiečio *in vivo* – 1,86 vnt/mg. Mažiausi fermento SOD aktyvumai buvo nustatyti ekstraktuose: paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 0,81 vnt/mg, karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 0,95 vnt/mg bei paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 0,94 vnt/mg (3.22 pav.).

3.7. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

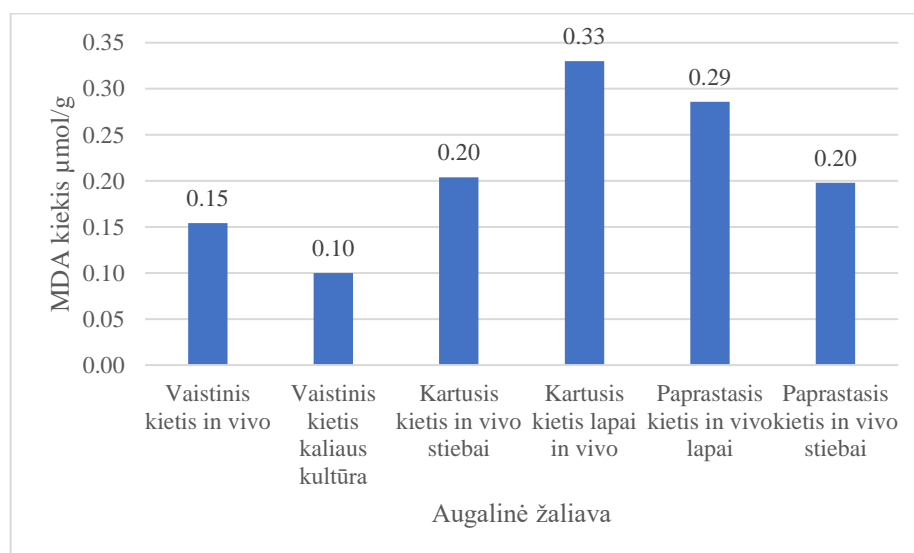
Vertinant lipidų peroksidaciją, aktyviosios deguonies formos jungiasi prie dvigubojo polinesočiųjų riebalų rūgščių ryšio ir susidaro lipidų hidroperoksidai. Kaip antriniai

oksidacijos produktai susidaro atitinkami aldehidai, vienas jų malondialaldehydas (MDA). Jis naudojamas, kaip molekulinis žymuo lipidų peroksidacijai [68].



3.23 pav. MDA koncentracijos įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose nustatytos didžiausios MDA koncentracijos: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 0,60 $\mu\text{mol/g}$ ir gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 0,37 $\mu\text{mol/g}$. Mažiausia koncentracija buvo nustatyta ekstraktuose: ežiuolės kaliaus kultūrų – 0,12 $\mu\text{mol/g}$, ežiuolės *in vivo* – 0,19 $\mu\text{mol/g}$ bei gvazdikinio serenčio lapų – 0,19 $\mu\text{mol/g}$ (3.23 pav.).

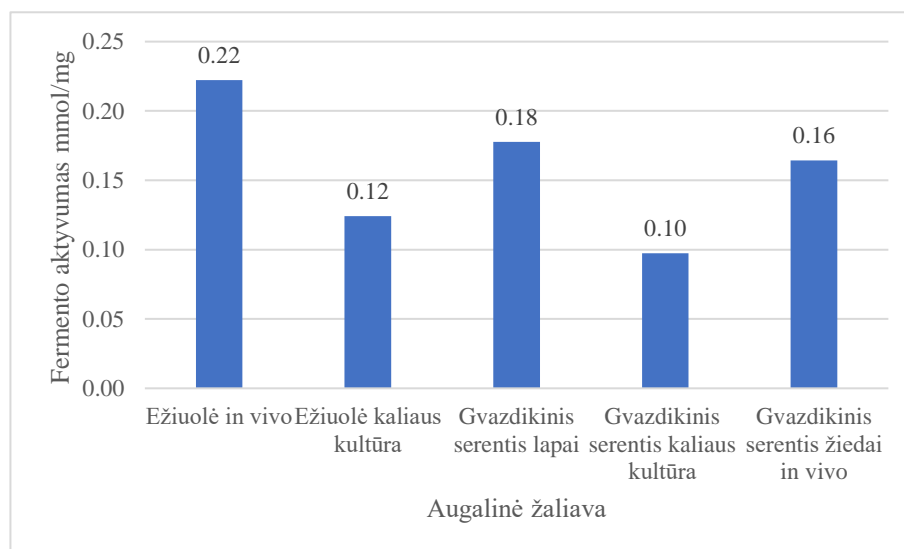


3.24 pav. MDA koncentracijos įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose

Kiečio augalų ekstraktuose MDA didžiausios koncentracijos buvo ekstraktuose: karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 0,33 $\mu\text{mol/g}$, paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 0,29 $\mu\text{mol/g}$ ir karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 0,20 $\mu\text{mol/g}$. Mažiausios koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: vaistinio kiečio kaliaus – 0,10 $\mu\text{mol/g}$, vaistinio kiečio *in vivo* – 0,15 $\mu\text{mol/g}$ ir paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 0,120 $\mu\text{mol/g}$ (3.24 pav.).

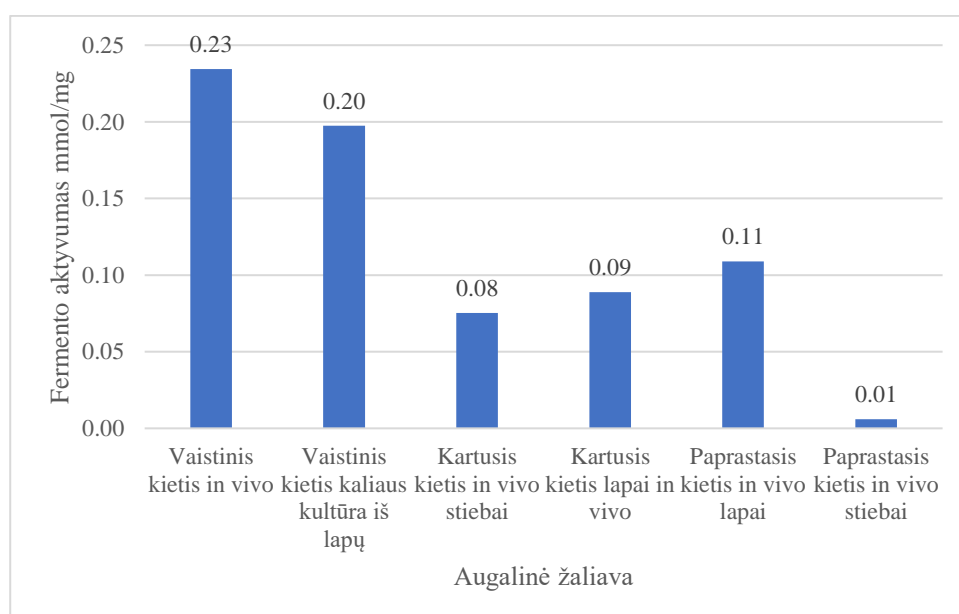
3.8. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas priklauso antioksidaciniam fermentiniam mechanizmui. Šiuo procesu vyksta reaktyvių deguonies formų bei kitų radikalų neutralizavimas, naudojant įvairius mechanizmus mažinančius keliamą stresą [69].



3.25 pav. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Didžiausi askorbatperoksidazės aktyvumas (ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų) buvo nustatyti ekstraktuose: ežiuolės *in vivo* – 0,22 mmol/mg, gvazdikinio serenčio lapų – 0,18 mmol/mg ir gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 0,16 mmol/mg. Mažiausi fermento aktyvumai buvo nustatyti ekstraktuose: gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 0,10 mmol/mg ir ežiuolės kaliaus kultūrų – 0,12 mmol/mg (3.25 pav.).



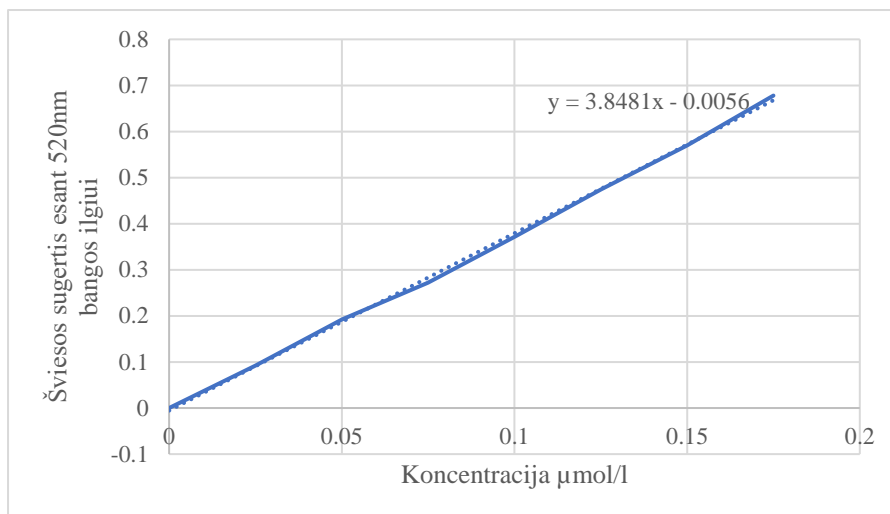
3.26 pav. Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose

Didžiausi askorbatperoksidazės aktyvumas (kiečio augalų) buvo nustatyti ekstraktuose: vaistinio kiečio *in vivo* – 0,23 mmol/mg, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš lapų – 0,20

mmol/mg ir paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 0,11 mmol/mg. Mažiausias aktyvumas kiečio stiebų *in vivo* ekstrakto – 0,001mmol/mg (3.26 pav.).

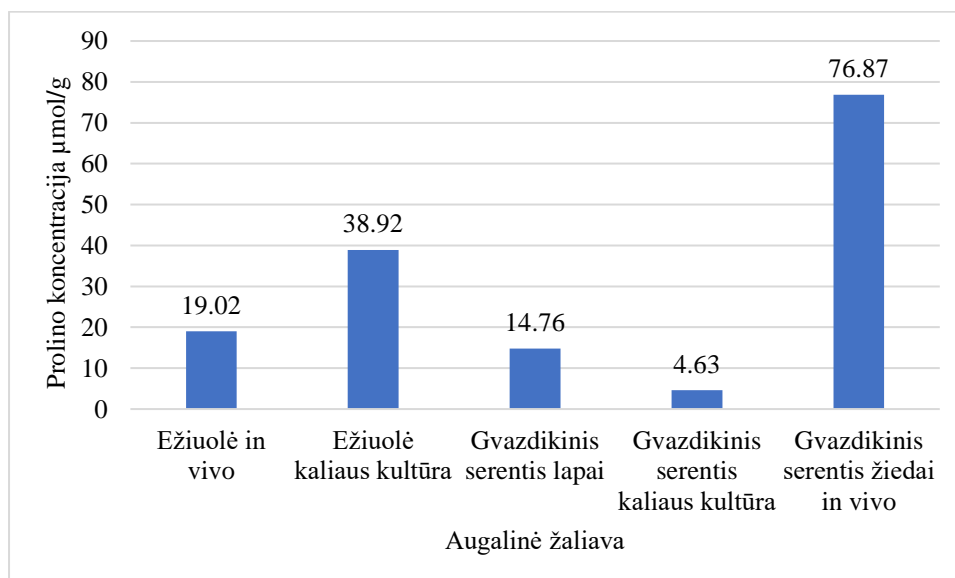
3.9. L-prolino koncentracijos įvertinimas

L-prolino koncentracijai nustatyti reikalinga kalibracinė kreivė. Iš kalibracinės kreivės gaunamas L-prolino kiekis μmol , reikalingas apskaičiuoti koncentraciją.



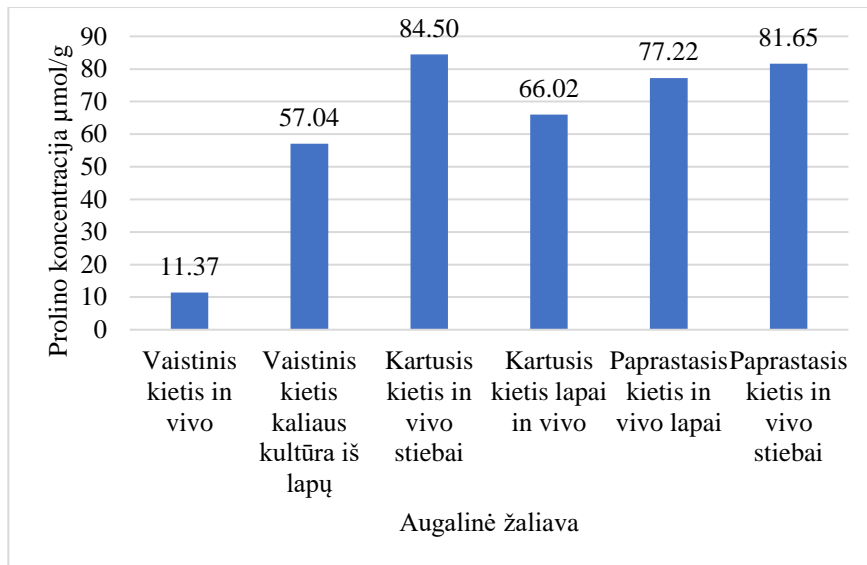
3.27 pav. L-prolino kalibracinė kreivė

Išvesta lygtis L-prolino kiekiui gauti $y=3,8481x-0,0056$ (3.27 pav.).



3.28 pav. L-prolino koncentracijos įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Didžiausios L-prolino koncentracijos nustatytos šiuose ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 76,87 $\mu\text{mol/g}$, ežiuolės kaliaus kultūrų – 38,92 $\mu\text{mol/g}$ ir ežiuolės *in vivo* – 19,02 $\mu\text{mol/g}$. Mažiausios prolino koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 4,63 $\mu\text{mol/g}$ ir gvazdikio serenčio lapų – 14,76 $\mu\text{mol/g}$ (3.28 pav.).

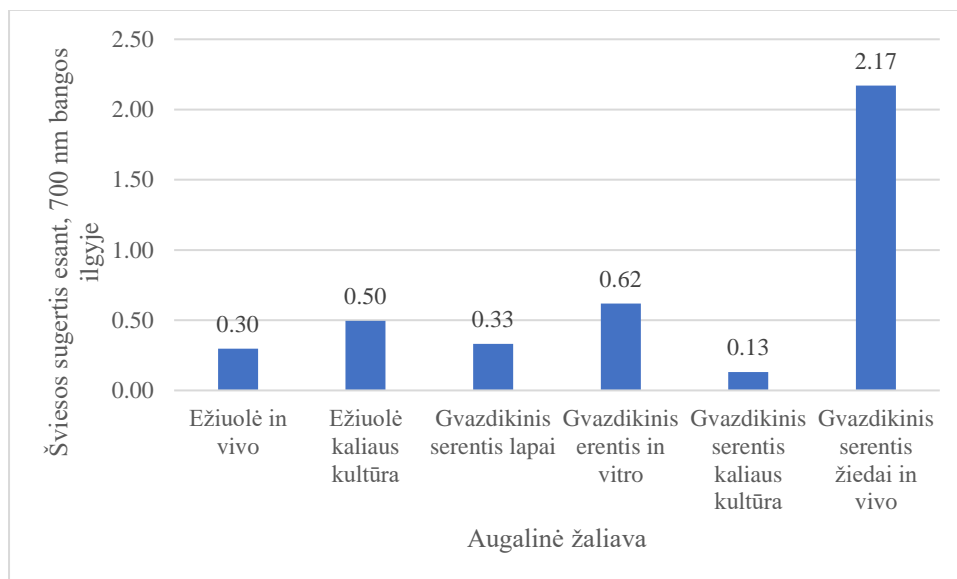


3.29 pav. L-proolino koncentracijos įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose

Didžiausios L-proolino koncentracijos (vaistinio, paprastojo, karčiojo kiečio augalų) buvo nustatytos ekstraktuose: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 84,50 µmol/g, paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 81,65 µmol/g ir paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 77,22 µmol/g. Mažiausios L-proolino koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: vaistinio kiečio *in vivo* – 11,37 µmol/g, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš lapų – 57,04 µmol/g ir karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 66,02 µmol/g (3.29 pav.).

3.10. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas augaluose

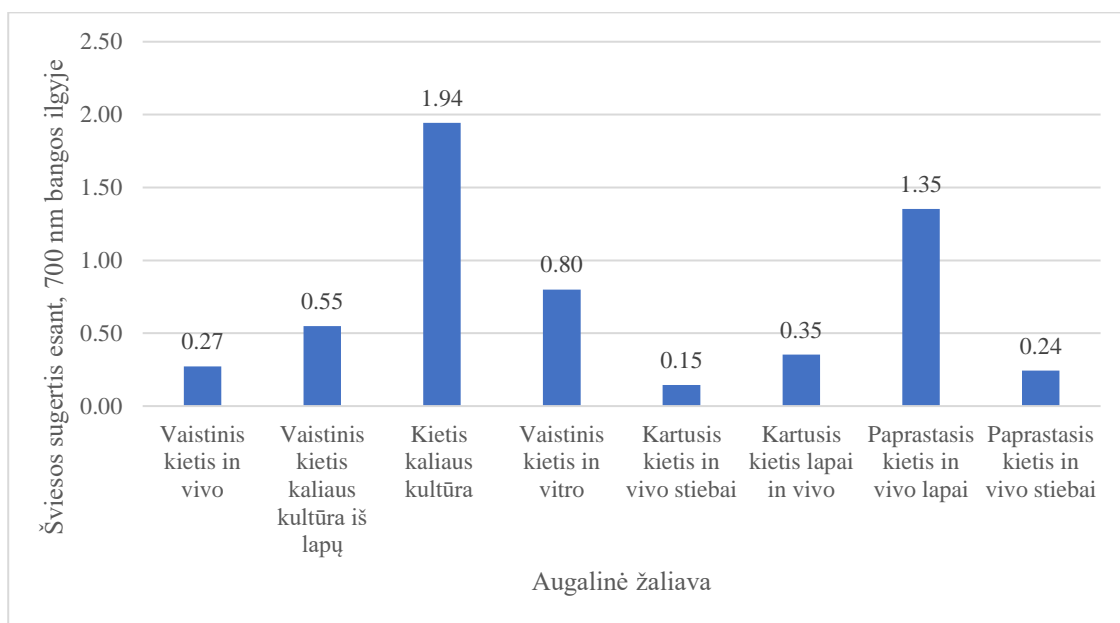
Kuo didesnė šviesos sugertis, tuo didesnės redukcinės (antioksidacinės) savybės. Šių savybių įvertinimui buvo naudojamas 0,125 ml tiriamųjų augalų ekstraktų tūris.



3.30 pav. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose (0,125 ml ekstrakto tūris)

Didžiausios redukcinės (antioksidacinės savybės) (gvazdikinio serenčio ir ežiuolės augalų) buvo nustatytos ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 2,17, gvazdikinio serenčio *in vitro* – 0,62 ir ežiuolės kaliaus kultūrų – 0,50. Mažiausios redukcinės savybės buvo

gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 0,13, ežiulės *in vivo* ekstrakto – 0,30 ir gvazdikinio serenčio lapų – 0,33 (3.30 pav.).

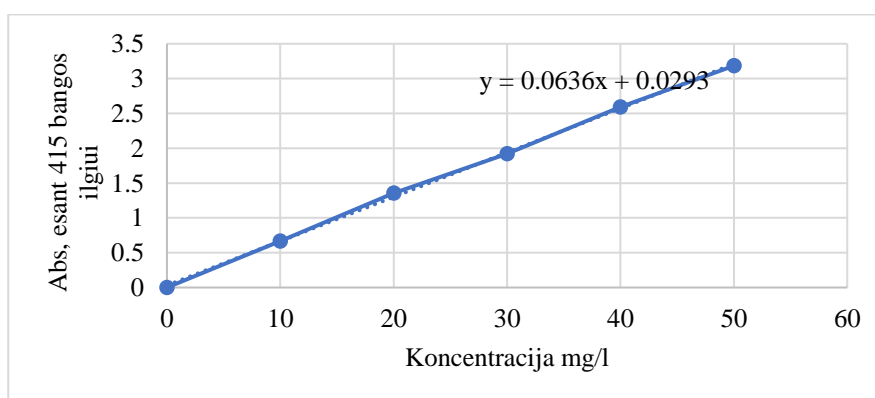


3. 31 pav. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose (0,125 ml ekstrakto tūris)

Vaistinio, paprastojo, karčiojo kiečio augalų ekstraktuose nustatytos buvo nustatytos didžiausios antioksidacinės savybės: kiečio kaliaus kultūrų – 1,94, paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 1,35 ir vaistinio kiečio *in vitro* – 0,80. Mažiausios savybės buvo nustatytos ekstraktuose: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 0,15, paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 0,24 ir vaistinio kiečio *in vivo* – 0,27 (3.31 pav.).

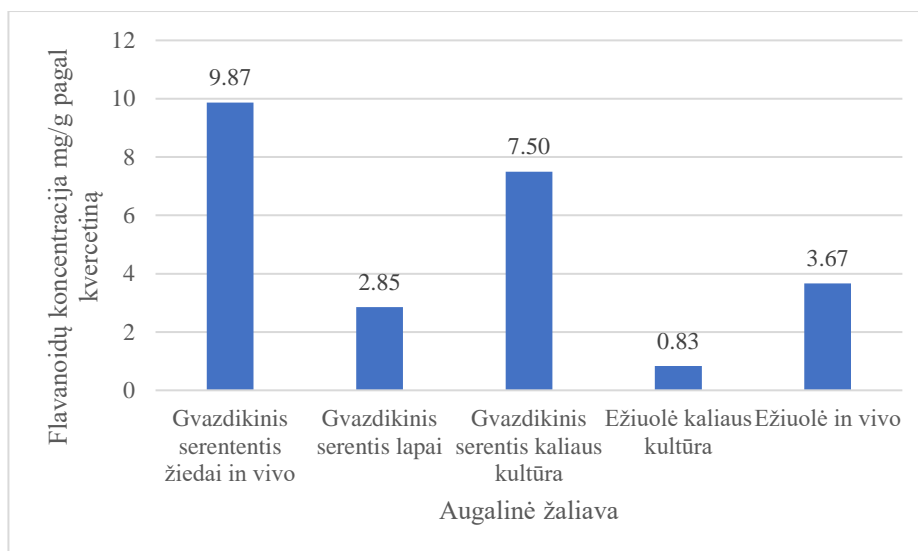
3.11. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas augaluose

Flavonoidų koncentracijai nustatyti reikalinga kvercetino kalibracinė kreivė. Iš kalibracinės kreivės gaunama kvercetino koncentracija mg/L reikalinga skaičiavimams.



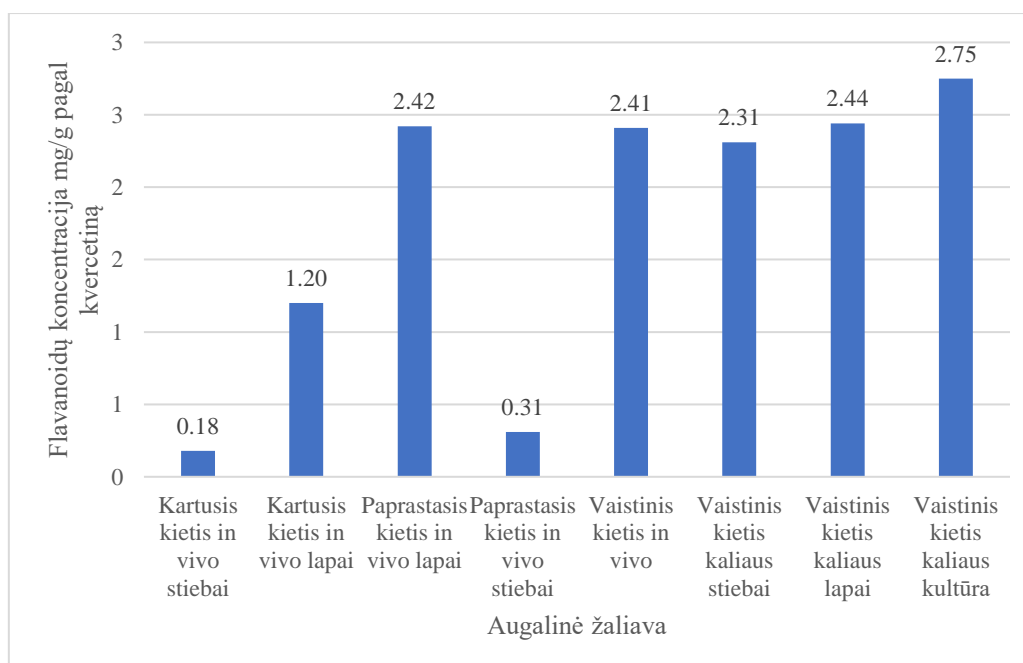
3.32 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

Gauta lygtis kvercetino koncentracijai $y=0,0636x+0,0293$ (3.32 pav.).



3.33 pav. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Didžiausios flavonoidų koncentracijos (gvazdikinio serenčio ir ežiuolės augalų) buvo nustatytos ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 49,35 mg/g, gvazdikinio serenčio kaliaus kultūrų – 37,50 mg/g ir ežiuolės *in vivo* – 18,33 mg/g. Mažiausios flavonoidų koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: ežiuolės kaliaus kultūrų – 4,13 mg/g ir gvazdikinio serenčio lapų – 14,27 mg/g (3.33 pav.).

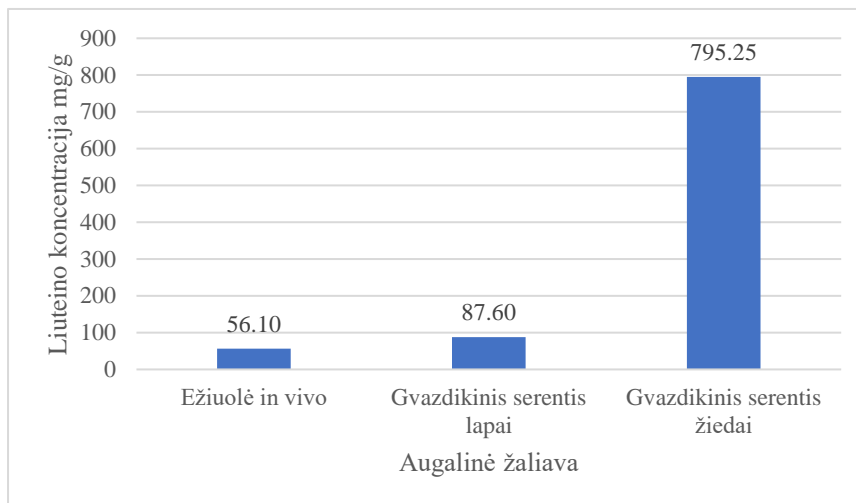


3.34 pav. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas kiečio augalų ekstraktuose

Vaistinio, paprastojo ir karčiojo kiečio augalų ekstraktuose buvo didžiausios flavonoidų koncentracijos: vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 13,77 mg/g, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 12,18 mg/g ir paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 12,10 mg/g. Mažiausios flavonoidų koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 0,89 mg/g, paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 1,54 mg/g ir karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 5,99 mg/g (3.34 pav.).

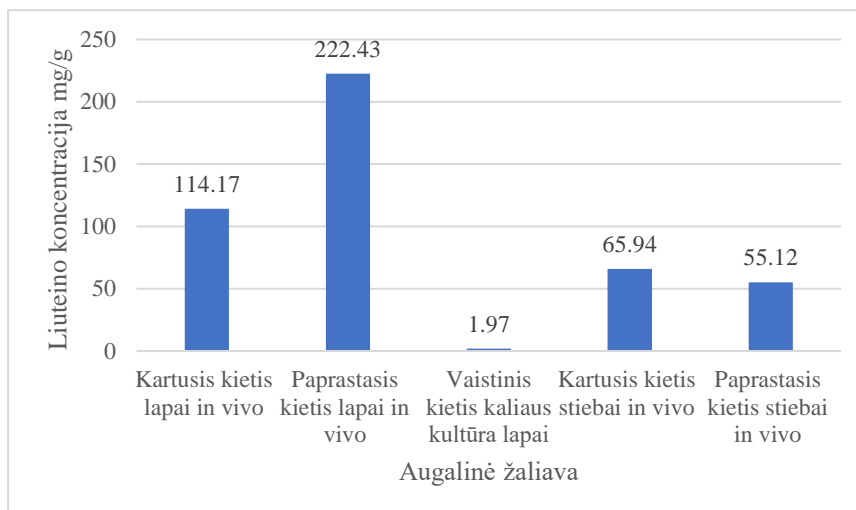
3.12. Liuteino koncentracijos įvertinimas augaluose

Liuteino koncentracijos įvertinimas buvo atliktas remiantis molinės ekstinkcijos koeficientu [59].



3.35 pav. Liuteino koncentracijos įvertinimas ežiuolės ir gvazdikinio serenčio augalų ekstraktuose

Didžiausia liuteino (ežiuolės ir gvazdikinio serenčio) koncentracija buvo nustatyta ekstraktuose: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 795,25 mg/g, o mažiausia koncentracija ežiuolės *in vivo* – 56,10 mg/g, gvazdikinio serenčio lapų – 87,60 mg/g (3.35 pav.).

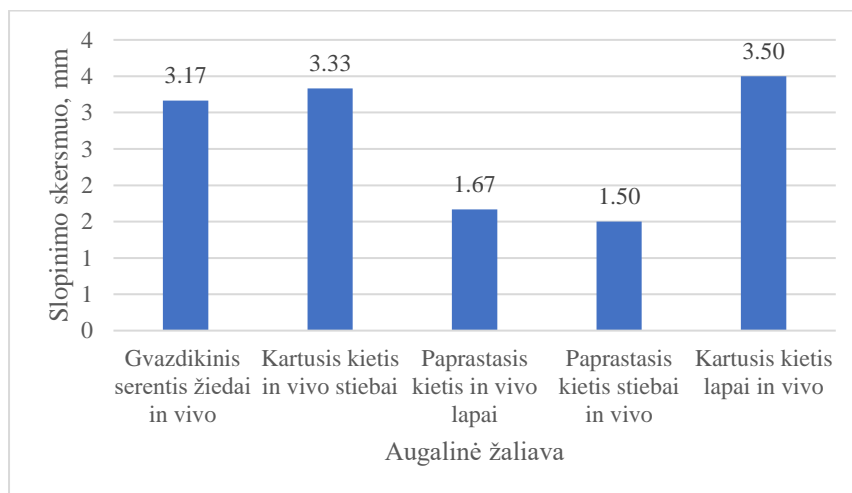


3.36 pav. Liuteino koncentracijos kiečio augalų ekstraktuose

Didžiausios liuteino (vaistinio, paprastojo, karčiojo kiečio augalų) koncentracijos buvo nustatytos ekstraktuose: paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 22,43 mg/g, karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 114,17 mg/g ir karčiojo kiečio stiebų – 65,94 mg/g. Mažiausios liuteino koncentracijos nustatytos ekstraktuose: paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 55,12 mg/g ir vaistinio kiečio kaliaus kultūrų lapų – 1,97 mg/g (3.36 pav.).

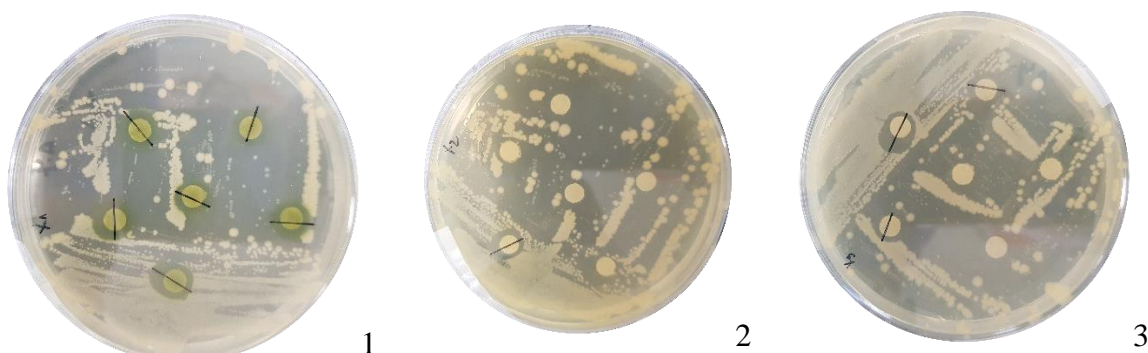
3.13. Antibakterinis augalų ekstraktų įvertinimas

Antibakteriniam augalų ekstraktų aktyvumui įvertinti buvo naudoti šių augalų ekstraktai: gvazdikinio serenčio *in vivo* žiedai, karčiojo kiečio *in vivo* stiebai, paprastojo kiečio *in vivo* lapai, paprastojo kiečio stiebai *in vivo*, karčiojo kiečio *in vivo* lapai, gvazdikinio serenčio lapai, ežiuolės kaliaus kultūros, vaistinio kiečio kaliaus kultūros iš lapų, vaistino kiečio kaliaus kultūros, vaistinis kiečio stiebai. Antibakteriniam aktyvumui įvertinti naudotos keturios bakterijų kultūrų rūšys: *Xanthomonas campestris*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Rhizobium radiobacter*. Antibakteriniam aktyvumui nustatyti yra matuojama aplink diskelius susidaręs slopinimo zonos diametras (mm).



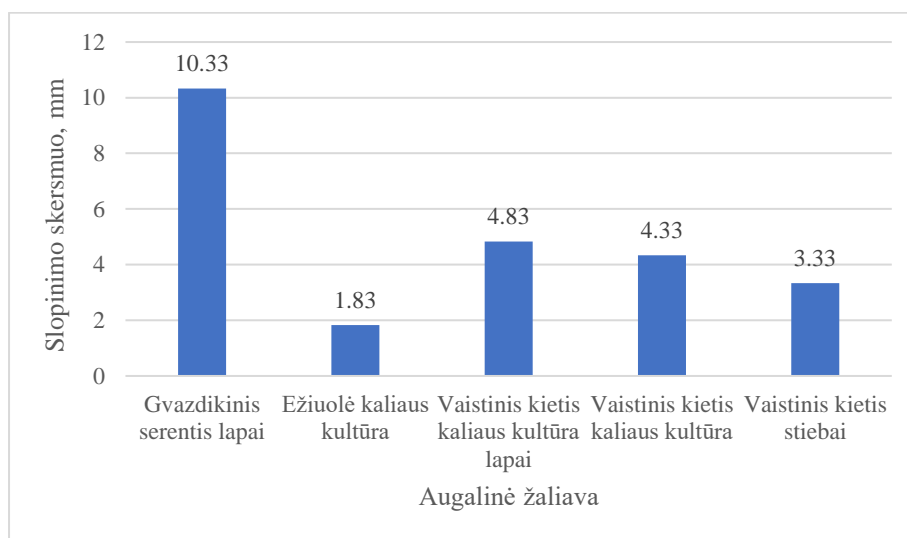
3.37 pav. Antibakterinis gvazdikinio serenčio ir kiečio augalų ekstraktų įvertinimas naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas

Šio tyrimo metu didžiausius antibakterinius aktyvumus prieš *Xanthomonas campestris* bakterijas parodė ekstraktai: karčiojo kiečio lapų *in vivo* – (slopinimo zona – 3,50 mm), karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – (slopinimo zona – 3,33 mm) ir gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – (slopinimo zona – 3,17 mm). Silpnesnis antibakterinis aktyvumas buvo ekstraktų: paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – (slopinimo zona – 1,50 mm) ir paprastojo kiečio lapų *in vivo* – (slopinimo zona – 1,67 mm) (3.37 pav.).



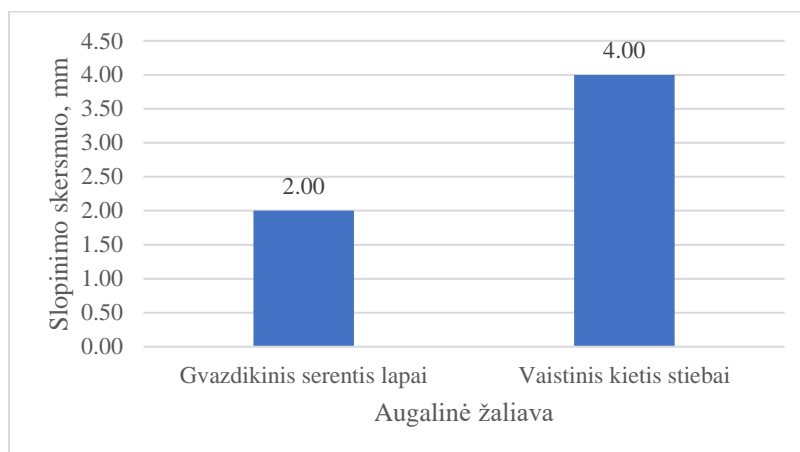
3.38 pav. Antibakterinis aktyvumas naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas (1 – gvazdikinis serentis (*in vivo*), 2 – kartusis kietis (*in vivo*), 3 – paprastasis kietis (*in vivo*) ekstraktai

Antibakteriniam aktyvumui iširti prieš *Xanthomonas campestris* tolimesniam tyrimui naudoti šie ekstraktai: gvazdikinio serenčio lapų, ežiuolės kaliaus kultūrų, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų lapų, vaistinio kiečio kaliaus kultūrų ir vaistinio kiečio stiebų žaliavų.



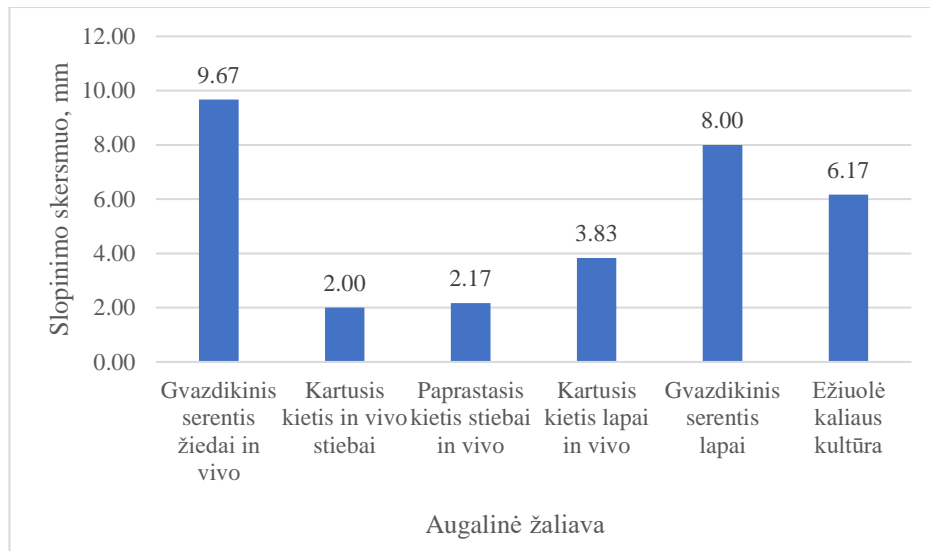
3.39 pav. Antibakterinis gvazdikinio serenčio, ežiuolės ir kiečio augalų ekstraktų įvertinimas naudojant *Xanthomonas campestris* bakterijas

Šio tyrimo metu didžiausią antibakterinį aktyvumą prieš *Xanthomonas campestris* bakterijas parodė ekstraktai: gvazdikinio serenčio lapų – (slopinimo zona 10,33 mm). Silpnesnius ir panašius antibakterinius aktyvumus parodė ekstraktai: vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš lapų – 4,83 mm ir vaistinio kiečio kaliaus kultūrų – 4,33 mm. Mažiausias aktyvumas ekstraktuose: ežiuolės kaliaus kultūrų ekstraktas 1,83 mm ir vaistinio kiečio stiebų – 3,33 mm (3.39 pav.).



3.40 pav. Antibakterinis gvazdikinio serenčio ir kiečio augalų ekstraktų įvertinimas naudojant *Bacillus subtilis* bakterijas

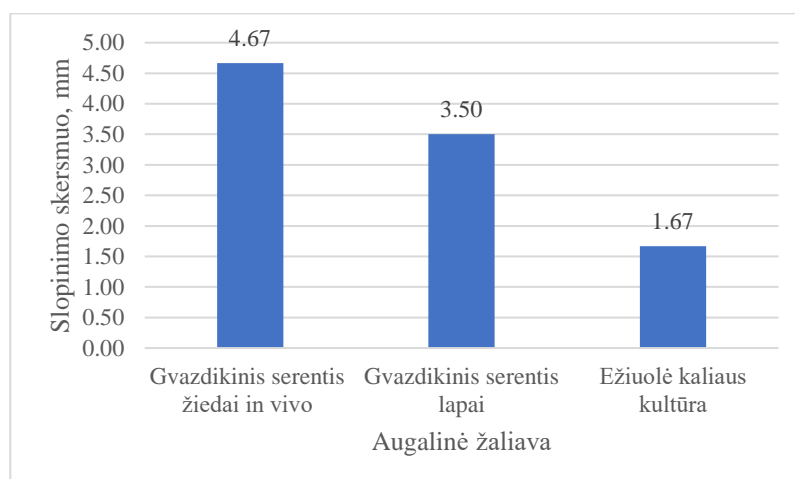
Prieš *Bacillus subtilis* bakterijų kultūrą antibakterinį aktyvumą parodė tik gvazdikinio serenčio lapų ekstraktas ir vaistinio kiečio stiebų ekstraktas. Stipresnis aktyvumas buvo vaistinio kiečio stiebų ekstrakto – 4,00 mm (3.40 pav.).



3.41 pav. Antibakterinis gvazdikinio serenčio, ežiuolės ir kiečio augalų ekstraktų įvertinimas naudojant *Escherichia coli* bakterijas

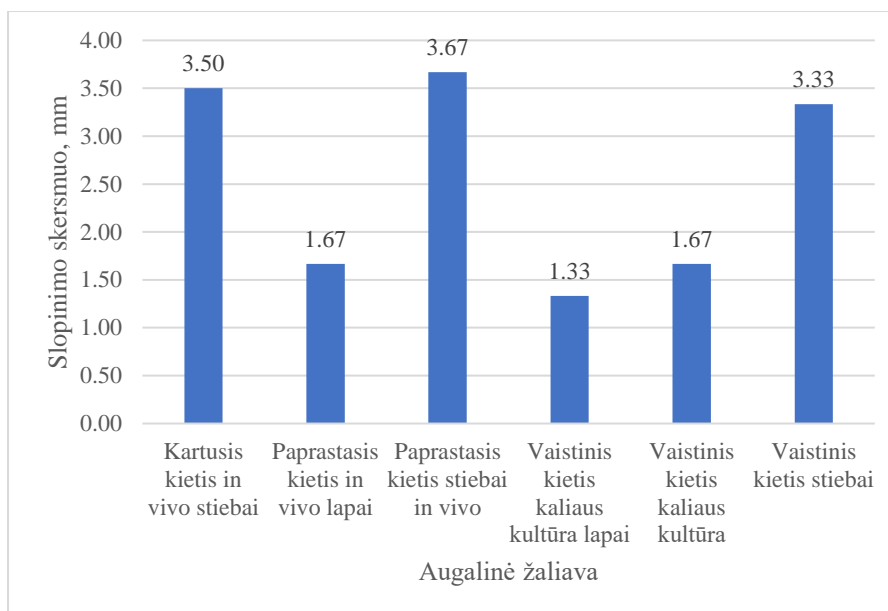
Antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* labiausiai pasižymėjo šie ekstraktai: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 9,67 mm, gvazdikinio serenčio lapų – 8,00 mm ir ežiuolės kaliaus kultūrų – 6,17 mm. Mažiausius antibakterinius aktyvumus parodė šie ekstraktai: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 2,00 mm, paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 2,17 mm ir karčiojo kiečio lapų *in vivo* – 3,83 mm (3.41 pav.).

Naudojant bakterijas *Rhizobium radiobacter* antibakterinis aktyvumas nustatytas tik su karčiojo kiečio lapų *in vivo* ekstraktu, kurio slopinimo skersmuo buvo 4,67 mm.



3.42 pav. Antibakterinis gvazdikinio serenčio ir ežiuolės augalų ekstraktų įvertinimas naudojant *Rhizobium radiobacter* bakterijas

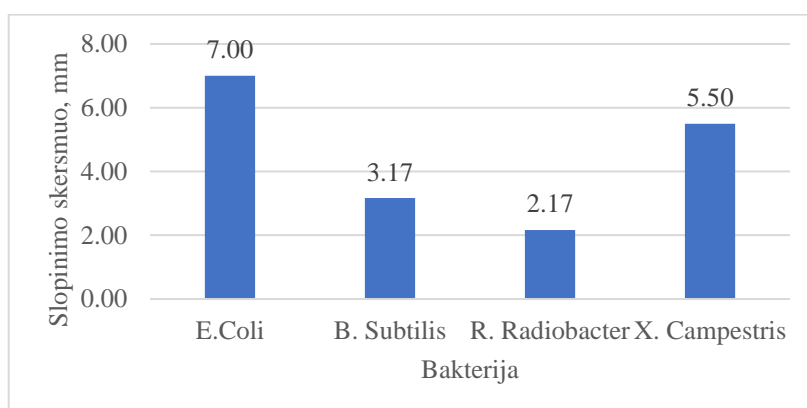
Naudojant bakterijas *Rhizobium radiobacter* antibakterinis aktyvumas buvo įvertinamas naudojant gvazdikinio serenčio ir ežiuolės augalų ekstraktus. Didžiausias antibakterinis aktyvumas buvo nustatytas ekstraktų: gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* – 4,67 mm, silpnesnis gvazdikinio serenčio lapų – 3,50 mm, silpniausiai ežiuolės kaliaus kultūrų – 1,67 mm (3.42 pav.).



3.43 pav. Antibakterinis kiečio augalų ekstraktų įvertinimas naudojant *Rhizobium radiobacter* bakterijas

Vertinant kiečio augalų ekstraktų antibakterinį aktyvumą naudojant *Rhizobium radiobacter*, didžiausias aktyvumas nustatytas ekstraktuose: paprastojo kiečio stiebų *in vivo* – 3,67 mm, karčiojo kiečio stiebų *in vivo* – 3,50 mm ir vaistinio kiečio stiebų – 3,33 mm. Silpniausias aktyvumas buvo ekstraktuose: vaistinio kiečio kaliaus kultūrų iš lapų – 1,33 mm, vienodą aktyvumą parodė vaistinio kiečio kaliaus kultūrų ir paprastojo kiečio lapų *in vivo* – 1,67 mm (3.43 pav.).

Buvo naudojamas antibiotikas Ciprofloxacina bei naudota jo koncentracija 50 µg/ml, prieš 4 bakterijų kultūras *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*.



3.44 pav. Antibakterinis bakterijų aktyvumo įvertinimas prieš antibiotiką Ciprofloxacina

Naudojant Ciprofloxacina antibiotiką antibakterinis aktyvumas stipriausias buvo naudojant *Escherichia coli* bakterijas – 7,00 mm ir *Xanthomonas campestris* bakterijas – 5,50 mm. Silpniausias antibakterinis aktyvumas buvo su *Bacillus subtilis* bakterijas – 3,17 mm, o silpniausias naudojant *Rhizobium radiobacter* bakterijas – 2,17 mm (3.44 pav.)

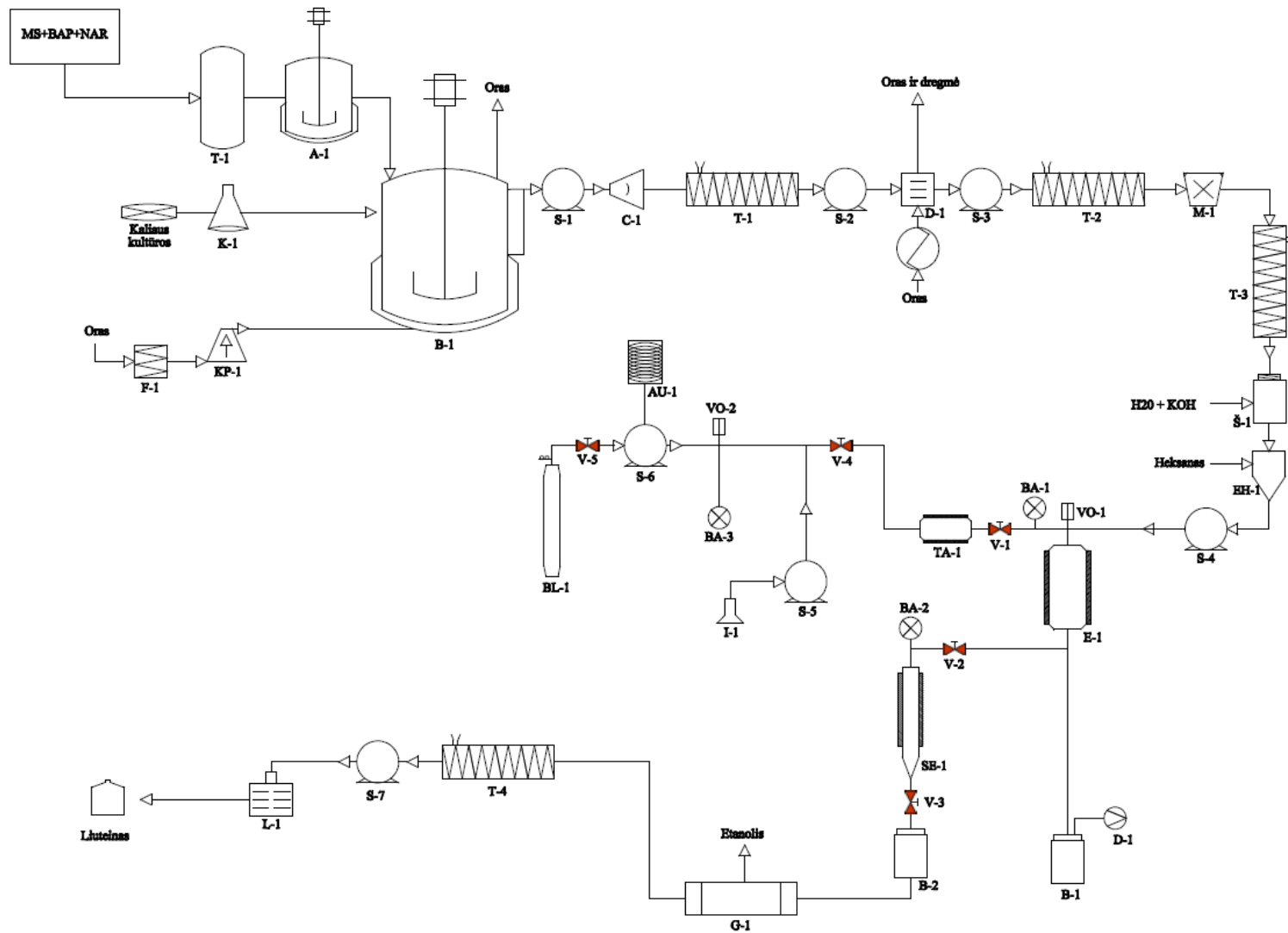
4. Rekomendacijų dalis

Liuteino išskyrimas yra vykdomas iš vaistinio kiekio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) (4.1 pav.) kaliaus kultūrų *in vitro*.

Biomasės augimas vyksta dvejomis stadijomis. Pirmuoju etapu pagaminama terpė su fitohormonais (T – 1), kuri autoklavuojama ir perkeliama į autoklavą (A – 1). Antru etapu užauginamos vaistinio kiekio *in vitro* kaliaus kultūros. Užaugintos kultūros perkeliama į kolbą (K – 1), tuomet gaunama vaistinio kiekio *in vitro* kaliaus kultūrų suspensija ir perkeliama į bioreaktorių (B – 1), į kurią taip pat patenka ir autoklavuota terpė.

Užaugintos vaistinio kiekio kaliaus kultūros išcentrinu siurbliu (S – 1) patenka į centrifugą (C – 1). Atlikus centrifugavimą, biomasė patenka sraigtinį transporterį (T – 1), o tada iš jo tiekama per išcentrinį siurblį (S – 2) į džiovyklą (D – 1). Išdžiovinta augalinė žaliava perkeliama ant juostinio transporterio (T – 2). Iš (T – 2) ir išdžiovinta biomasė tiekama į būgninį malūną, kuriame ji susmulkinama. Susmulkinta žaliava tiekama juostiniu transporteriu ir perkeliama į šarminio apdorojimo talpą (Š – 1), kuri papildoma vandeniu ir kalio šarmu ir vyksta liuteino riebalų rūgščių esterio muilinimas. Muilinimo metu gaunamas liuteinas. Vėliau liuteinas yra ekstrahuojamas ekstraktoriuje (EH – 1) heksanu. Liuteinas lieka nepolinio tirpiklio fazėje ir siurbliu (S – 5) patenka į ekstrakcijos talpą (E – 1) superkritinių skysčių ekstrakcijai atlikti.

Ekstrakcija vykdoma ekstrakcijos talpoje (E – 1). Iš CO₂ talpos baliono (BL – 1) dujos tiekiamos siurbliu (S – 7) į CO₂ indą (TA – 1), kai tirpikliu naudojamas – etanolis. Vožtuvu (VO – 1) reguliuojamas CO₂ tiekimas į ekstrakcijos talpą (E – 1). Po ekstrakcijos atskiriamas tirpiklis, kuris patenka į pirmąją bandinio talpą (B – 1), o tolimesnė medžiaga nukreipiama į separatorių (SE – 1). Separatoriaus talpoje (SE – 1) vyksta efektyvus medžiagų atskyrimas. Atskirtas liuteino tirpalas patenka į bandinio talpą (B – 2). Toliau jis tiekiamas į garintuvą (G – 1), kuriame pašalinamas etanolis. Gautas liuteinas tiekiamas juostiniu transporteriu (T – 3) į liofilizatorių (L – 1). Liofilizatoriuje gaunamas sausas produktas – liuteinas.



4.1 pav. Principinė aparatūrinė schema liuteinui gauti iš vaistinio kiekčio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) kaliaus kultūrų

4.1 lentelė. Principinėje aparatūrinėje schemoje naudojami prietaisai

Prietaiso žymėjimas	Prietaisas
T – 1	MS+ BAP+ NAR terpės talpa
K – 1	terpės talpa –kolba (250 ml)
A – 1	autoklavas
F – 1	oro filtras
KP – 1	oro kompresorius
B – 1	bioreaktorius
S – 1; S – 2; S – 3; S – 4; S – 5; S – 6; S – 7	išcentrinis siurblys
C – 1	centrifuga
T – 1; T – 2; T – 3; T – 4	transporteris
D – 1	džiovykla
M – 1	būgninis malūnas
Š – 1	šarminis valymas
SE – 1	separatorius
V – 1; V – 2; V – 3; V – 4; V – 5	ventilius
BA – 1; BA – 2; BA – 3	barometras
D – 1	dujų srauto matuoklis
E – 1	ekstrakcijos talpa
TA – 1	CO ₂ indas
I – 1	modifikatoriaus indas
VO – 1; VO – 2	vožtuvas
BL – 1	CO ₂ talpos balionas
AU – 1	CO ₂ siurblio aušintuvas
B – 1; B – 2	bandinio talpa
G – 1	garintuvas
L – 1	liofilizatorius
EH - 1	ekstraktorius

Išvados

1. Intensyviausiai susiformavo vaistinio kiečio kaliaus kultūros *in vitro* iš lapų eksplantų. Didžiausias vaistinio kaliaus kultūros prieaugis buvo MS terpėje su augimo hormonais BAP (2,5 mg/l) + NAR (0,5 mg/l).
2. Ežiuolės (lot. *Echinacea*), kiečio (lot. *Artemisia*), serenčio (lot. *Tagetes*) augaluose *in vivo* ir kaliaus kultūrose *in vitro*:
 - a) didžiausia chlorofilo *a*, *b* bei karotinoidų koncentracija buvo nustatyta gvazdikinio serenčio lapų ekstrakte, o mažiausia ežiuolės *in vivo* ekstrakte.
 - b) didžiausią antioksidacinį aktyvumą DPPH metodu parodė paprastojo kiečio lapų *in vivo* ekstraktas. FRAP bei redukcinių savybių metodais didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* ekstrakte.
 - c) didžiausiu antioksidacinių fermentų aktyvumu (katalazės, superoksido dismutazės ir askorbatperoksidazės) pasižymėjo vaistinio kiečio kaliaus kultūros *in vitro* iš lapų ekstraktas.
 - d) didžiausiomis bendrųjų fenolinių junginių bei flavonoidų koncentracijomis pasižymėjo ekstraktai: karčiojo kiečio stiebų *in vivo* bei vaistinio kiečio *in vitro* (fenolinių junginių) bei gvazdikinio serenčio žiedų *in vivo* (flavonoidų). Didžiausia *L*-prolino koncentracija buvo nustatyta karčiojo kiečio stiebų *in vivo* ekstrakte.
3. Intensyviausiomis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo gvazdikinio serenčio lapų ekstraktas prieš bakterijų kultūras *Xanthomonas campestris* ir *Escherichia coli*.
4. Pasiūlyta liuteino aparatūrinė technologinė schema, pagal kurią rekomenduojama išskirti liuteiną iš vaistinio kiečio (lot. *Artemisia dracunculus* L.) kaliaus kultūrų *in vitro*.

Literatūros sąrašas

1. KOROCH, A., H.R. JULIANI and J. KAPTEYN. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2002, vol. 69, pp. 78-83.
2. SASNAUSKAS, Valdas, Ona, RAGAŽINSKIENĖ and Silvija, RIMKIENĖ. *Vaistinių augalų enciklopedija*. 2005. ISBN: 9789955575733.
3. JUDŽENTIENĖ, Asta and Justė, BUZELYTĖ. Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from North Lithuania. *Chemija*. 2006, vol. 17, nr. 1, pp. 12-15.
4. ALI, M., et al. Thidiazuron-Induced Changes in Biomass Parameters, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity in Callus Cultures of *Artemisia absinthium* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [interaktyvus]. 2013, vol. 172, pp. 2363-2376 [žiūrėta 2020-05-17]. Prieiga per doi: 10.1007/s12010-013-0663-7
5. KETEL, D. H. Morphological differentiation and occurrence of thiophenes in leaf callus cultures from *Tagetes* species: Relation to the growth medium of the plants. *Physiologia Plantarum* [interaktyvus]. 1986, vol. 66, nr. 3 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi:10.1111/j.1399-3054.1986.tb05940.x
6. SENATORE, F., et al. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (*Asteraceae*) essential oil with different chemical composition. *Flavour and Fragrance Journal* [interaktyvus]. 2004, vol. 19, nr. 6 [žiūrėta 2020-02-04]. Prieiga per doi:10.1002/ffj.1358
7. LAZDAUSKAITĖ, Živilė. Astriniai. *Visuotinė lietuvių enciklopedija* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per: <https://www.vle.lt/Straipsnis/astriniai-66095>
8. PARSONS, J. L., et al. *Echinacea* biotechnology: advances, commercialization and future considerations. *Pharmaceutical Biology* [interaktyvus]. 2018, vol. 56, nr. 1, pp. 485-495 [žiūrėta 2020-03-13]. Prieiga per doi:10.1080/13880209.2018.1501583
9. PETRUZZELLO, Melissa. List of plants in the family *Asteraceae*. *Encyclopædia Britannica* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per: <https://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Asteraceae-2040400>
10. GRIGAS, Algirdas. *Lietuvos augalų vaisiai ir sėklos*. Vilnius: Mokslas, 1986.
11. *Rausvaziedė ežiuiolė* [interaktyvus]. [Vaistazoles.eu](http://vaistazoles.eu). 2014 [žiūrėta 2020-05-27]. Prieiga per: <https://vaistazoles.eu/rausvaziede-eziuiole/>
12. BERNOTIENĖ, J., N. SAVICKIENĖ, A. SAVICKAS et al. Askoežiufito tablečių technologija ir analizė. *Ekperimentiniai tyrimai: Medicina* [interaktyvus]. 2003, 39 tomas, 2 priedas, pp. 25 [žiūrėta 2020-01-02].
13. EIBL, R., et al. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-02-16]. Prieiga per doi:10.1007/s00253-018-9279-8
14. SHARIFI-RAD, M., et al. *Echinacea* plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytotherapy Research* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-02-19]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/325062110>

15. SNIEŠKIENĖ, Vilija and Indrė, LUKŠYTĖ. Ežiuolės (*Echinacea moench.*) fitosanitarinė būklė. *Vytauto didžiojo universiteto Kauno botanikos sode* [interaktyvus]. 2018, 9 (14) [žiūrėta 2020-01-02]. ISSN 2029-190.
16. BOLYARD, Mark. *In vitro* regeneration of *Artemisia abrotanum* L. by means of somatic organogenesis. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* [interaktyvus]. 2018, vol. 54, pp. 127-130 [žiūrėta 2020-03-14]. Prieiga per doi:10.1007/s11627-017-9878-6
17. VARNAITĖ, Aurelija. *Artemisia* genties augalai. Kietis (*Artemisia*) [interaktyvus]. 2004 [žiūrėta 2020-01-03]. Prieiga per: <https://www.botanikos-sodas.vu.lt/puslapiai/augal%C5%B3-gentys/kietis>
18. *Vaistiniai kiekiai* [interaktyvus]. Patariame.lt, 2016 [žiūrėta 2020-05-27]. Prieiga per: <http://patariame.lt/?p=2396>
19. SAYYAH, M., L. NADJAFNIA and K. MOHAMMAD. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. 2004, vol. 94, nr. 2-3, pp. 283-287 [žiūrėta 2020-02-09]. Prieiga per doi:10.1016/j.jep.2004.05.021
20. LEE, S. J., et al. Estrogenic Flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. *Journal of agricultural and food chemistry* [interaktyvus]. 1998, vol. 46, nr. 8, pp. 3325-3329 [žiūrėta 2020-01-05]. Prieiga per doi:10.1021/jf9801264
21. *Pelynas veikia kaip antibiotikas* [interaktyvus]. Vakarų ekspresas. 2002 [žiūrėta 2020-05-27]. Prieiga per: <https://www.ve.lt/naujienos/visuomene/sveikata/pelynas-veikia-kaip-antibiotikas/>
22. NIN, S., et al. Callus cultures of *Artemisia absinthium* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* [interaktyvus]. 1996, vol 45, pp 67-72 [žiūrėta 2020-01-05]. Prieiga per doi:10.1007/BF00043430
23. NIN, S., E. MOROSI and S. SCHIFF. Callus cultures of *Artemisia absinthium* L. : initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1996, vol. 45, pp. 67-72.
24. SINGH, R., V. P. KUMAR and G. SINGH. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 2012, vol. 1, nr. 2, pp. 101-104. ISSN:2146-8397
25. ABIRI, R., et al. Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential. *Food Research International* [interaktyvus]. 2018, vol. 109, pp. 403-415 [žiūrėta 2020-02-15]. Prieiga per doi:10.1016/j.foodres.2018.03.072
26. KRIPAITIS, Paulius. Kietis, paprastasis (lot. *Artemisia vulgaris* L.) [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-01-06]. Prieiga per: <https://gamtininkas.lt/augalai/kietis-paprastasis-lot-artemisia-vulgaris/>
27. *Artemisia vulgaris*, mugwort [interaktyvus]. Encyclopedia Ethnobotanica [žiūrėta 2020-05-27]. Prieiga per: <https://www.magic-plants.com/artemisia-vulgaris.html>
28. Mugwort (*Artemisia vulgaris*) Benefits, Uses, Cation and More [interaktyvus]. Bimbima, 2017 [žiūrėta 2020-05-27]. Prieiga per: <https://www.bimbima.com/health/artemisia-vulgaris/3726/>
29. GUDŽINSKAS, Zigmantas. Serentis. *Visuotinė lietuvių enciklopedija* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2020-02-07]. Prieiga per: <https://www.vle.lt/Straipsnis/serentis-85591>

30. RAVINDRA K. K., et al. Standardization of *in vitro* Culture Establishment and Proliferation of Micro-Shoots in African and French Marigold Genotypes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [interaktyvus]. 2018, vol. 7, nr. 01, ISSN: 2319-7706 [žiūrėta 2020-02-18]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/322720268>
31. SAANI, M., R. LAWRENCE and K. LAWRENCE. Evaluation of Natural Pigments as Antioxidant and Antibacterial agents from *Tagetes erecta* flowers extracts. *Oriental journal of chemistry* [interaktyvus]. 2018, vol. 34, nr. 5, pp. 2608-2613 [žiūrėta 2020-02-20]. Prieiga per doi:10.13005/ojc/340551
32. *Gėlės Serenčiai* [interaktyvus]. [žiūrėta 2020-05-27]. Prieiga per: <https://geliurojus.lt/geles-serenciai/>
33. MOGHADDAN, M., R. OMIDBIAGI and F. SEFIDKON. Chemical Composition of the Essential Oil of *Tagetes minuta* L. *Journal of Essential Oil Research* [interaktyvus]. 2007, vol. 19, nr. 1 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per doi:10.1080/10412905.2007.9699213
34. KRISHNA, A., S. et al. Composition of the Essential Oils of the Leaves and Flowers of *Tagetes erecta* L. *Journal of Essential Oil Research* [interaktyvus]. 2011, vol. 16, nr. 6, pp 520-522 [žiūrėta 2020-02-09]. Prieiga per doi:10.1080/10412905.2004.9698786
35. JONUŠKIENĖ, Ilona. *Augalų ir mikroorganizmų biotechnologija*. Metodinė priemonė. Kaunas: Technologija, 2012. ISBN: 9786094331886.
36. RAMEZANNEZHAD, R., et al. Enhanced production of cichoric acid in cell suspension culture of *Echinacea purpurea* by silver nanoparticle elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* [interaktyvus]. 2019, vol. 139, pp. 261-273 [žiūrėta 2020-03-15]. Prieiga per doi:10.1007/s11240-019-01678-4
37. *The structural formula of chlorophylls: Chl a, Chl b, Chl d, and Chl f* [interaktyvus]. DANILOVICH, V. K., 2013 [žiūrėta 2020-02-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/figure/The-structural-formula-of-chlorophylls-Chl-a-Chl-b-Chl-d-and-Chl-f-adapted-from_fig6_281469072
38. RAMANAUSKAS, A. and I. JONUŠKIENĖ. Antrinių metabolitų kitimo įvertinimas vaistiniuose augaluose ir vaistinio šalavijo (*Salvia officinalis* L.) auginimo *in vitro* optimizavimas. *Cheminė technologija* [interaktyvus]. 2013, nr. 2 (64). [žiūrėta 2020-05-13]. ISSN 1392 – 1231.
39. CSISZÁR, J., et al. Antioxidant enzyme activities in *Allium* species and their cultivars under water stress. *Plant Soil Environ* [interaktyvus]. 2007, vol. 53, nr. 12, pp. 517-523. [žiūrėta 2020-05-16]. Prieiga per: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00477.pdf>
40. WANG, Y. L., et al. Enhancing antioxidative capacity of *Lepidium meyenii calli* by addition of methyl salicylate to culture medium. *Acta Physiol Plant*. 2007, vol. 29, pp. 417-423. Prieiga per doi:10.1007/s11738-007-0050-5.
41. HUANG, D., B. OU and R. L. PRIOR. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, vol. 53, pp. 1841-1856. Prieiga per dio:10.1021/jf030723c

42. MURTHY, H. N., et al. Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of *Echinacea* species. *Appl Microbiol Biotechnol* [interaktyvus]. 2014, vol. 98, pp. 7707-7717 [žiūrėta 2020-03-05]. Prieiga per doi:10.1007/s00253-014-5962-6
43. SHARMA, O. P. And T. K. BHAT, DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry* [interaktyvus]. 2009, vol. 133, nr. 4, pp 1202-1205 [žiūrėta 2020-01-05]. Prieiga per doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008
44. MANAF, H. H., et al. The effect of UV-C on secondary metabolites production of *Echinacea purpurea* culture *in vitro*. *BCES journal* [interaktyvus]. 2016, vol. 11, nr. 2, pp. 465-483 [žiūrėta 2020-02-06]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/303542060>
45. ACIKGOZ, M. A., et al. Effect of light on biosynthesis of alkamide, caffeic acid derivatives and echinacoside in *Echinacea purpurea* L. callus cultures. *Akademik Ziraat Dergisi* [interaktyvus]. 2018, vol. 7, nr. 2, pp. 179-184 [žiūrėta 2020-02-17]. Prieiga per doi:10.29278/azd.476349
46. TARIQ, U., M. ALI and B. H. ABBASI. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [interaktyvus]. 2014, vol 130, pp 264-271 [žiūrėta 2020-02-01]. Prieiga per doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.11.026
47. BHAWYA, D. and K. R. ANILAKUMAR. Antioxidant, DNA damage protection and antibacterial effect of *Psoralea corylifolia*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011, vol. 4, nr. 2. ISSN - 0974-2441.
48. MATVIEIEVA, N., et al. Alterations in the Antioxidant Status of Transgenic Roots of *Artemisia* spp. Representatives after *A. rhizogenes*-Mediated Genetic Transformation. *Cytology and Genetics* [interaktyvus]. 2018, vol. 52, pp. 253-259 [žiūrėta 2020-02-019]. Prieiga per doi:10.3103/S0095452718040060
49. NADERIAN, M., et al. Anti-toxoplasmosis activity evaluation of *Artemisia vulgaris* L. extract and its subfractions *in vitro* and *in vivo*. *Research Journal of Pharmacognosy* [interaktyvus]. 2017, vol. 4, pp. 115 [žiūrėta 2020-05-15]. Prieiga per: http://www.rjpharmacognosy.ir/article_53363.html
50. DASGUPTA, N., et al. Blood coagulating effect of marigold (*Tagetes erecta* L.) leaf and its bioactive compounds. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* [interaktyvus]. 2016, vol. 16, pp. 67-75 [žiūrėta 2020-02-15]. Prieiga per doi:10.1007/s13596-015-0200-z
51. KAZIBWE, Z., et al. Ultrasonication assisted ultrafast extraction of *Tagetes erecta* in water: cannonading antimicrobial, antioxidant components. *Journal of Molecular Liquids* [interaktyvus]. 2017, vol. 229, pp. 453-458 [žiūrėta 2020-02-17]. Prieiga per doi:10.1016/j.molliq.2016.12.044
52. VASUDEVAN, P., S. KASHYAP and S. SHARMA. *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. 1997, vol 62 nr. 1-2, pp. 29-35 [žiūrėta 2020-02-]. Prieiga per doi:10.1016/S0960-8524(97)00101-6
53. ESPINOZA, P. E. V., et al. Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Plant Biotechnology*. 2017, vol. 34, pp. 187-192.

54. LAOSINWATTANA, C., P. WICHITTRAKARN and M. TEERARAK. Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2018, vol. 126, pp. 129-134 [žiūrėta 2020-02-16]. Prieiga per doi:10.1016/j.indcrop.2018.10.013
55. BECERRA, M. O., L. M. CONTRERASA, M.H. LOA. Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. *Journal of Functional Foods* [interaktyvus]. 2020, vol. 66. [žiūrėta 2020-03-14]. Prieiga per: ScienceDirect.
56. FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M., F. G. ACIÉN FERNÁNDEZ and E. M. GRIMA. Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010, vol. 86, pp. 27-40.
57. KUSMIATI, W. CAESARIANTO and F. AFIATI. Effect Lutein of Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.) on Decreasing Glucose and Malondialdehyde Levels in Alloxan-Induced Blood Mice. *AIP Conference Proceedings* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2020-02-17]. Prieiga per doi:10.1063/1.5115726
58. RUIZ, C., et al. Chemical composition, Antioxidant and Mosquito larvicidal activities of essential oils from *Tagetes filifolia*, *Tagetes minuta* and *Tagetes elliptica* from Perú. *Planta Med* [interaktyvus]. 2011, 77-PE30 [žiūrėta 2020-02-09]. Prieiga per: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0031-1282361>
59. JIVAN, M. J. and S. ABBASI. Nano based lutein extraction from marigold petals: optimization using different surfactants and co-surfactants. *Heliyon* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2020-02-16]. Prieiga per doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01572
60. BENITEZ-GARCIA, I., P. E. VANEGAS-ESPINOZA, A. J. MELENDEZ-MARTINEZ, et al. Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electronic Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2014 [žiūrėta 2020-02-17]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/263318792>
61. HADDEN, W. L., et al. Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement. *Journal agricultural and food chemistry* [interaktyvus]. 1999, vol. 47, nr. 10, pp. 4189-4194 [žiūrėta 2020-02-09]. Prieiga per doi:10.1021/jf990096k
62. MALINAUSKAITĖ, Regina. Šarminio jonizuoto vandens įtaka paprastojų lęšio 'SMĖLINUKAI' augalų morfofiziologiniams rodikliams II ontogenezės etape. *Žmogaus ir gamtos sauga*, 2015, 2 dalis. ISSN 1822-1823.
63. MAKKAR Harinder P.S., SIDHURAJU, P., BECKER, K. Plant Secondary Metabolites. *Humana Press*, 2007. ISBN 978-1-58829-993-2.
64. VITORIA, A. P., et al. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*. 2001, vol. 57, pp. 701-710.
65. SAVICKA, Marina and ŠKUTE, Natalija. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *EKOLOGIJA: Lietuvos mokslų akademija*. 2010, vol. 56, nr. 1-2, pp. 26-33. Prieiga per doi:10.2478/v10055-010-0004-x

66. ABRAHAM, E., et al. Methods for Determination of Proline in Plants. *Methods in molecular biology*. 2010, vol. 639, pp. 317-31. Prieiga per doi: 10.1007/978-1-60761-702-0_20.
67. MANIVANNAN, A., et al. *In Vitro* Propagation, Phytochemical Analysis, and Evaluation of Free Radical Scavenging Property of *Scrophularia kakudensis* Franch Tissue Extracts. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. 2015, vol. 2015, nr. 480564, pp. 11. Prieiga per doi:10.1155/2015/480564
68. MILDAŽIENĖ, V., JARMALAITĖ, S., DAUGELAVIČIUS, R. 2004. *Lastelės biologija*. Kaunas: VDU leidykla. 380 p.
69. AYALA, A., et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* [interaktyvus]. 2014, pp. 31 [žiūrėta 2020-05-24]. Prieiga per doi:10.1155/2014/360438