



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Augalų augimo hormonų įtaka jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) fitocheminiams junginiams susidaryti ir antioksidaciniam aktyvumui**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Aneta Macijauskaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2023**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Augalų augimo hormonų įtaka jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) fitocheminiams junginiams susidaryti ir antioksidaciniam aktyvumui**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Aneta Macijauskaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

**Lekt. dr. Kazimieras Anusevičius**

Recenzentas

---

**Kaunas, 2023**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Aneta Macijauskaitė

**Augalų augimo hormonų įtaka jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) fitocheminiams junginiams susidaryti ir antioksidaciniam aktyvumui**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęsusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Aneta Macijauskaitė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Macijauskaitė, Aneta. Augalų augimo hormonų įtaka jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) fitocheminiams junginiams susidaryti ir antioksidaciniam aktyvumui. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: paprastoji jonažolė, *Hypericum perforatum* L., fitocheminiai junginiai, hipericinas, antioksidacinis aktyvumas.

Kaunas, 2023. 59 p.

### Santrauka

Paprastoji jonažolė (lot. *Hypericum perforatum* L.) kaupia daug antrinių metabolitų, kurie suteikia naudingas antidepresines, antioksidacines, antibakterines ir kitas savybes. Šiuolaikinėje visuomenėje yra ieškoma būdų, kaip pakeisti sintetinius junginius į išgautus natūraliai, turinčius tokių naudingų savybių, kaip sintetiniai, o paprastoji jonažolė yra puikus įvairių naudingų junginių šaltinis. Vis dėlto augalą auginti *in vivo* ir išgauti tikslinius junginius yra labai ilgas procesas ir priklausantis nuo daugelio veiksnių. Kultivavimo *in vitro* didelis privalumas yra tai, kad aplinkos veiksnius galima standartizuoti, parinkti optimalias sąlygas bei pridėti augalų augimo hormonų tam, kad būtų gaunamos didelės naudingų junginių išeigos, kartu ženkliai sutrumpinant procesą nuo pasėjimo iki produkto gavimo.

Darbe tirta augalų augimo hormonų įtaka jonažolės kultivavimui *in vitro* vertinant terpėse su skirtingais augalų augimo hormonais kultivuotų kaliaus kultūrų antioksidacinį aktyvumą, fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų, antocianinų, chlorofilų bei karotinoidų, baltymų, kai kurių antioksidacinių fermentų koncentraciją bei antibakterinį aktyvumą. Tyrimams naudoti trys ekstraktai, gauti iš jonažolės kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su augalų augimo hormonais: 0,5 mg/l TDZ ir 0,1 mg/l IAR; 0,11 μM kinetino ir 0,9 μM 2,4-D; 0,1 mg/l NAR, 0,2 mg/l BAP ir 0,5 mg/l 2,4-D.

Rekomendacijų dalyje pateikta hipericino gavimo schema, kurią pramonėje būtų galima taikyti, optimizavus augalų augimo hormonų derinius.

Macijauskaitė, Aneta. The Influence of Plant Growth Hormones on St. John's Wort (*Hypericum Perforatum* L.) the Formation of Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity. 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: St. John's wort, *Hypericum perforatum* L., phytochemical compounds, hypericin, antioxidant activity.

Kaunas, 2023. 59.

### Summary

St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) accumulates numerous secondary metabolites that provide beneficial properties such as antidepressant, antioxidant, antibacterial, and others. In modern society, there is a search for means to replace synthetic compounds with naturally derived ones that possess similar beneficial qualities, and St. John's wort is an excellent source of various useful compounds. However, cultivating the plant *in vivo* and extracting targeted compounds is a long process that depends on various factors. One significant advantage of *in vitro* cultivation is the ability to standardize environmental factors, optimize conditions and plant growth hormones to obtain high yields of beneficial substances, significantly shortening the process from sowing to product extraction.

This work investigates the influence of plant growth hormones on the *in vitro* cultivation of St. John's wort, evaluating the antioxidant activity, concentrations of phenolic compounds, phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, chlorophylls, as well as carotenoids, proteins, and some antioxidative enzymes in cultures of St. John's wort induced by plant growth hormones. Three extracts obtained from St. John's wort cultures grown in MS medium with plant growth hormones were used for the research: 0.5 mg/l TDZ and 0.1 mg/l IAA; 0.11  $\mu$ M kinetin and 0.9  $\mu$ M 2,4-D; 0.1 mg/l NAA, 0.2 mg/l BAP, and 0.5 mg/l 2,4-D.

The recommendation section provides a scheme for obtaining hypericin which could be applied and optimized in the industry by manipulating the combination of plant growth hormones.

## Turinys

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Lentelių sąrašas .....</b>                                                              | <b>8</b>  |
| <b>Paveikslų sąrašas .....</b>                                                             | <b>9</b>  |
| <b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>                                                  | <b>10</b> |
| <b>Įvadas.....</b>                                                                         | <b>11</b> |
| <b>1. Literatūros apžvalga .....</b>                                                       | <b>12</b> |
| 1.1. Paprastosios jonažolės charakteristika .....                                          | 12        |
| 1.2. <i>Hypericum perforatum</i> L. kaupiami junginiai .....                               | 13        |
| 1.2.1. Naftodiantronai. Hipericinas .....                                                  | 13        |
| 1.2.2. Fenolinės rūgštys .....                                                             | 13        |
| 1.2.3. Flavonoidai .....                                                                   | 14        |
| 1.2.4. Antocianinai .....                                                                  | 16        |
| 1.3. Hipericino biosintezė.....                                                            | 16        |
| 1.4. Augalų streso veiksniai.....                                                          | 17        |
| 1.5. Augalų antioksidacinis aktyvumas .....                                                | 17        |
| 1.6. Augalų biotechnologija .....                                                          | 18        |
| 1.6.1. Kaliaus kultūros ir jų svarba.....                                                  | 18        |
| 1.6.2. Kaliaus kultūrų oksidacinis stresas.....                                            | 19        |
| 1.6.3. Jonažolės kaliaus kultūrose kaupiami antriniai metabolitai .....                    | 20        |
| 1.6.4. Fitohormonai .....                                                                  | 20        |
| 1.6.5. Kaliaus kultūrų terpėse naudojami augalų augimo hormonai .....                      | 20        |
| 1.6.6. Kaliaus kultūrų terpėse naudojami pirtakiai.....                                    | 20        |
| 1.7. Jonažolės ekstraktų panaudojimo galimybės.....                                        | 20        |
| 1.7.1. Naudojimas dermatologijos srityje.....                                              | 21        |
| 1.7.2. Aukso nanodalelių naudojimo galimybės .....                                         | 22        |
| 1.7.3. Sidabro nanodalelių naudojimo galimybės .....                                       | 22        |
| 1.7.4. Titano nanodalelių naudojimo galimybės .....                                        | 23        |
| 1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....                                            | 23        |
| <b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai .....</b>                                                | <b>24</b> |
| 2.1. Jonažolės paruošimas .....                                                            | 24        |
| 2.1.1. Mitybinių terpių su augimo reguliatoriais paruošimas.....                           | 24        |
| 2.1.2. Jonažolės kaliaus kultūrų kultivavimas.....                                         | 24        |
| 2.1.3. Jonažolės biomasės paruošimas tyrimams .....                                        | 25        |
| 2.2. Jonažolės <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> antioksidacinio aktyvumo nustatymas ..... | 25        |
| 2.2.1. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas .....                               | 25        |
| 2.2.2. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą .....                         | 25        |
| 2.2.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu .....                               | 26        |
| 2.2.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu .....                               | 27        |
| 2.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas.....                          | 27        |
| 2.3.1. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas.....            | 27        |
| 2.4. Antioksidacinių fermentų nustatymas .....                                             | 28        |
| 2.4.1. Superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas .....                                    | 28        |
| 2.4.2. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas.....                                       | 29        |
| 2.5. Malondialdehido koncentracijos nustatymas .....                                       | 29        |
| 2.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu .....  | 30        |

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas.....                                     | 31        |
| 2.8. Flavonoidų koncentracijos nustatymas.....                                                       | 31        |
| 2.9. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas .....                                          | 32        |
| 2.10. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos nustatymas .....                | 33        |
| 2.11. Baltymų koncentracijos nustatymas .....                                                        | 33        |
| 2.12. L-prolino koncentracijos nustatymas .....                                                      | 34        |
| 2.13. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo nustatymas.....                             | 35        |
| 2.14. Titano oksido nanodalelių sintezė ir analizė .....                                             | 35        |
| <b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....</b>                                                     | <b>36</b> |
| 3.1. Paprastosios jonažolės kaliaus kultūrų <i>in vitro</i> formavimasis.....                        | 36        |
| 3.2. Jonažolės <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i> ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas..... | 37        |
| 3.2.1. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas .....                                        | 37        |
| 3.2.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą .....                                  | 38        |
| 3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu .....                                        | 38        |
| 3.2.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu .....                                        | 39        |
| 3.3. Antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas .....                                             | 40        |
| 3.3.1. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas .....                                             | 40        |
| 3.3.2. Fermento askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas.....                                       | 40        |
| 3.4. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas .....                                                | 41        |
| 3.5. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu .....           | 42        |
| 3.6. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas.....                                    | 42        |
| 3.7. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas.....                                                      | 43        |
| 3.8. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas .....                                         | 44        |
| 3.9. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas .....                | 44        |
| 3.10. Bendros baltymų koncentracijos įvertinimas .....                                               | 45        |
| 3.11. L-prolino koncentracijos įvertinimas .....                                                     | 47        |
| 3.12. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas.....                            | 48        |
| 3.13. Titano oksido nanodalelių sintezės įvertinimas.....                                            | 50        |
| <b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>                                                                  | <b>52</b> |
| <b>Išvados .....</b>                                                                                 | <b>55</b> |
| <b>Literatūros sąrašas .....</b>                                                                     | <b>56</b> |
| <b>Priedai.....</b>                                                                                  | <b>60</b> |
| 1 priedas. Tyrimų metu naudoti reagentai .....                                                       | 60        |
| 2 priedas. Tyrimų metu naudota įranga .....                                                          | 62        |
| 3 priedas. MS terpės sudėtis .....                                                                   | 63        |

## **Lentelių sąrašas**

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>2.1 lentelė.</b> Augalų augimo hormonai, kurie buvo pridėti į mitybines terpes..... | 24 |
| <b>2.2 lentelė.</b> Jonažolės sėklų sterilinimo sąlygos.....                           | 24 |
| <b>2.3 lentelė.</b> <i>In vitro</i> mitybinių terpių sudėtis ir trumpinimai .....      | 25 |
| <b>4.1 lentelė.</b> Schemos dalių sąrašas .....                                        | 54 |

## Paveikslų sąrašas

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1.1 pav.</b> Paprastoji jonažolė (lot. <i>Hypericum perforatum</i> L.) [2].....                          | 12 |
| <b>1.2 pav.</b> Bendroji flavonoidų struktūra [13].....                                                     | 14 |
| <b>1.3 pav.</b> Flavonoidų poklasių sudarančių junginių bendrinės struktūros [14].....                      | 15 |
| <b>1.4 pav.</b> Hipericino biosintezės kelias [17] .....                                                    | 16 |
| <b>2.1 pav.</b> FeSO <sub>4</sub> kalibracinė kreivė antioksidaciniam aktyvumui nustatyti FRAP metodu ..... | 26 |
| <b>2.2 pav.</b> Kalibracinė kreivė baltymų koncentracijai nustatyti.....                                    | 28 |
| <b>2.3 pav.</b> Tanino rūgšties kalibracinė kreivė .....                                                    | 30 |
| <b>2.4 pav.</b> Kvercetino kalibracinė kreivė flavonoidų koncentracijai nustatyti.....                      | 32 |
| <b>2.5 pav.</b> L-prolino kalibracinė kreivė.....                                                           | 34 |
| <b>3.1 pav.</b> Sudugusios paprastosios jonažolės sėklos.....                                               | 36 |
| <b>3.2 pav.</b> Susiformavusios paprastosios jonažolės kaliaus kultūros .....                               | 36 |
| <b>3.3 pav.</b> Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinių (redukcinių) savybių įvertinimas .....           | 37 |
| <b>3.4 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą .....                                | 38 |
| <b>3.5 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą.....                                 | 39 |
| <b>3.6 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal ABTS metodą.....                                 | 39 |
| <b>3.7 pav.</b> Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas .....                                  | 40 |
| <b>3.8 pav.</b> Fermento askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas .....                                    | 41 |
| <b>3.9 pav.</b> Malondialdehido koncentracijos įvertinimas .....                                            | 41 |
| <b>3.10 pav.</b> Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu .....      | 42 |
| <b>3.11 pav.</b> Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas .....                              | 43 |
| <b>3.12 pav.</b> Flavonoidų koncentracijos įvertinimas .....                                                | 43 |
| <b>3.13 pav.</b> Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas .....                                    | 44 |
| <b>3.14 pav.</b> Chlorofilų ir karotinoidų koncentracijos įvertinimas .....                                 | 45 |
| <b>3.15 pav.</b> Baltymų koncentracijos įvertinimas, kai ekstrakcijos tirpalo pH 2,6.....                   | 46 |
| <b>3.16 pav.</b> Baltymų koncentracijos įvertinimas, kai ekstrakcijos tirpalo pH 4.....                     | 46 |
| <b>3.17 pav.</b> Baltymų koncentracijos įvertinimas, kai ekstrakcijos tirpalo pH 8.....                     | 47 |
| <b>3.18 pav.</b> L-prolino koncentracijos įvertinimas .....                                                 | 48 |
| <b>3.19 pav.</b> <i>E. coli</i> bakterijų augimas (kontrolinis variantas).....                              | 48 |
| <b>3.20 pav.</b> Skirtingų jonažolės ekstraktų poveikis <i>E. coli</i> bakterijoms .....                    | 49 |
| <b>3.21 pav.</b> Antibiotiko ciprofloksacino (25 µg/ml) poveikis <i>E. coli</i> bakterijoms.....            | 50 |
| <b>3.22 pav.</b> Jonažolės ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas .....                              | 50 |
| <b>3.23 pav.</b> Titano oksido nanodalelių UV spektras .....                                                | 51 |
| <b>4.1 pav.</b> Hipericino aparatūrinė gavimo schema.....                                                   | 53 |

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfonrūgštis;

BAP – 6-benzilaminopurinas;

DTT – ditioneitolis;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

IAR – 3-indolilacto rūgštis;

MDA – malondialdehidas;

MS – Murashige ir Skoog

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

NBT – nitromėlynasis tetrazolis;

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;

SOD – superoksido dismutazė;

TDZ – 1-fenil-1,2,3-(tiazol-5-il)karbamidas;

2,4-D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis.

## Ivadas

Paprastoji jonažolė (lot. *Hypericum perforatum* L.) pasižymi daugeliu naudingų savybių: antidepresinėmis, antioksidacinėmis, antibakterinėmis ir kt. Ji kaupia daug antrinių metabolitų, kurie ir suteikia šias naudingas savybes [1]. Kadangi šiuolaikinė visuomenė stengiasi gyventi tvariau ir ekologiškai, yra ieškoma būdų, kaip pakeisti sintetinius junginius į išgautus natūraliai, turinčius tokių naudingų savybių, kaip sintetiniai, o paprastoji jonažolė yra puikus įvairių naudingų junginių šaltinis. Tačiau augalo, augančio *in vivo*, antrinių metabolitų sintezė priklauso nuo daugelio aplinkos veiksnių ir yra sunku gauti atsikartojančius antrinių metabolitų gryninimo rezultatus. Jonažolę auginant *in vitro*, aplinkos veiksnius galima standartizuoti, parinkti optimalias sąlygas bei pridėti augalų augimo hormonų tam, kad būtų gaunamos didelės naudingų junginių išeigos, kartu ženkliai sutrumpinant procesą nuo pasėjimo iki produkto gavimo.

Darbe tiriama augalų augimo hormonų įtaka jonažolės kultivavimui *in vitro* vertinant terpėse su skirtingais augalų augimo hormonais kultivuotų kaliaus kultūrų antioksidacinį aktyvumą, fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų, antocianinų, chlorofilų bei karotinoidų, baltymų, kai kurių antioksidacinių fermentų koncentraciją bei antibakterinį aktyvumą. Rekomendacijų dalyje yra pateikiama hipericino gavimo schema, kurią pramonėje būtų galima taikyti, optimizavus augalų augimo hormonų derinius.

Projekto tikslas – įvertinti augalų augimo hormonų įtaką jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) fitocheminiams junginiams susidaryti ir antioksidaciniam aktyvumui.

Uždaviniai:

1. ištirti *in vivo* ir *in vitro* jonažolės ekstraktų antioksidacinį aktyvumą naudojant redukcinį, FRAP, ABTS ir DPPH metodus;
2. nustatyti *in vivo* ir *in vitro* jonažolės ekstraktų fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų, antocianinų ir chlorofilų *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijas;
3. nustatyti *in vivo* ir *in vitro* jonažolės ekstraktų bendrąją baltymų ir L-prolino koncentracijas;
4. ištirti *in vivo* ir *in vitro* jonažolės ekstraktų malondialdehido koncentraciją, fermentų superoksido dismutazės ir askorbatperoksidazės aktyvumą;
5. nustatyti *in vivo* ir *in vitro* jonažolės ekstraktų antibakterinį aktyvumą;
6. įvertinti jonažolės ekstraktų panaudojimo galimybes.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Paprastosios jonažolės charakteristika

Paprastoji jonažolė (lot. *Hypericum perforatum* L.) yra daugiametis augalas, priskiriamas *Hypericaceae* (jonažolinių) šeimai, *Hypericum* (jonažolių) genčiai. Jonažolės pavadinimas kilęs nuo to, kad šio augalo žydėjimo laikotarpis prasideda birželio 25 dieną – Joninių dieną. Jonažolė auga Europoje, Azijoje ir Šiaurės Amerikoje, augalas originaliai kilęs iš Europos, o vėliau paplito kitose vidutinio klimato vietose [2].

*Hypericum* gentį sudaro apie 400 rūšių žolinių augalų ir krūmų, kurie turi geltonus arba varinės spalvos žiedus su keturiais arba penkiais žiedlapiais, labai daug kuokelių bei vieną piestelę. Paprastoji jonažolė (žr. 1.1 pav.) yra besišakojantis krūminis augalas, jos aukštis paprastai būna nuo 40 iki 80 cm. Jonažolės stiebai ir šakelės yra tankiai apaugusios pailgais, lygiais kraštais lapais, kurių ilgis paprastai būna nuo 1 iki 3 cm, o plotis – nuo 0,3 iki 1 cm.



1.1 pav. Paprastoji jonažolė (lot. *Hypericum perforatum* L.) [2]

Kairėje paveikslėlio pusėje (žr. 1.1 pav.) pavaizduota apatinė stiebo dalis ir lapų išsidėstymas. Dešinėje matoma viršutinė stiebo dalis – stiebas su žiedais. Kairėje apačioje pavaizduotas žiedas, o dešinėje apačioje – kapsulė, kurioje būna dešimtys mažų tamsiai rudų sėklų [2].

Paprastoji jonažolė yra viena iš labiausiai ištirtų žolelių ir galima sakyti geriausiai žinoma vaistažolė šių dienų rinkoje. Ji yra žinoma dėl savo antidepresinių savybių, tačiau taip pat yra gana naudinga kaip neuroprotektinis, antineuralginis ir antivirusinis augalas. *In vitro* tyrimai parodė, kad paprastoji jonažolė slopina serotoninino, norepinefrino ir dopamino reabsorbciją neuronuose. Ji gali būti naudinga esant priešmenstruaciniam sindromui, policistinių kiaušidžių sindromui, perimenopauzei ir menopauzei, depresijai, egzamai ir psoriazei [1].

Europos medicinos agentūros sudarytoje *Hypericum perforatum* L. vertinimo ataskaitoje [3] pateikiama informacija apie Europos sąjungoje ir Europos ekonominėje erdvėje parduodamus medicininius preparatus. Nurodyta, jog paprastosios jonažolės preparatai įvairiomis formomis ir koncentracijomis yra skiriami šioms esant šioms indikacijoms: laikinas psichinis išsekimas; lengvos ir vidutinio sunkumo depresinės būsenos, psichovegetaciniai sutrikimai (įtampa, nerimas, įvairios kilmės nuotaikos svyravimai, virškinimo sutrikimai, menopauzės sutrikimai); miego sutrikimai; nervinė įtampa; nedideli odos pažeidimai; lengvas nerimas; stresas; nuovargis; odos uždegimai, nedidelės žaizdos; virškinimo sutrikimai. Dėl kaupiamų bioaktyviųjų junginių paprastoji jonažolė

pasižymi antioksidaciniu aktyvumu [4], tuo tarpu produktų, kurie turi antioksidantų, vartojimas padeda kraujagyslių ir širdies ligų, vėžio, neurodegeneracinių ligų prevencijai [5].

Dėl plataus farmakologinio aktyvumo spektro, antidepresinio, antivirusinio ir antibakterinio poveikio, *Hypericum perforatum* L. yra vienas iš labiausiai vartojamų vaistinių augalų pasaulyje, o šio augalo ekstraktai plačiai naudojami kaip fitofarmaciniai ir maistiniai preparatai [6].

## **1.2. *Hypericum perforatum* L. kaupiami junginiai**

Jonažolė, kaip ir kiti augalai, sintetina baltymus. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad bendras baltymų kiekis jonažolės ekstraktuose buvo 3,9–8,4 % [7]. Taip pat kaupiami karotinoidai ir chlorofilai [8], dalyvaujantys augalų fotosintezėje [9].

Mokslinėje literatūroje jonažolės kaupiami bioaktyvieji junginiai yra skirstomi įvairiai. *Hypericum perforatum* kaupiamus įvairius bioaktyviuosius junginius galima suskirstyti į šias grupes: naftodiantronai, fenoliniai junginiai, fenolinės rūgštys, flavonoidai.

### **1.2.1. Naftodiantronai. Hipericinas**

Naftodiantronams priskiriami hipericinas ir jo biosintetiniai pirmtakai: pseudohipericinas, protohipericinas ir protopseudohipericinas. Būtent hipericinas yra vienas iš svarbiausių *Hypericum* genties junginių. Pirmą kartą jis buvo išskirtas iš *H. perforatum*, o vėliau rastas ir kelse kitose *Hypericum* rūšyse. Hipericinas turi farmakologinių savybių, įskaitant antimikrobines, priešvėžines ir priešušdegimines. Hipericinas yra labai jautrus šviesai, dėl to naudingas fotodinaminėje terapijoje, kuri yra neinvazinis terapinis metodas, naudojamas gydyti įvairius vėžinius ir nevėžinius pažeidimus bei sutrikimus [4]. Taip pat buvo nustatyta, jog kiti *Hypericum* bioaktyvieji junginiai, pavyzdžiui, kvercetas, žymiai susilpnina hiperforino naudingas savybes fotodinaminėje terapijoje [10].

Nors hipericinas buvo plačiai tiriamas daugiausia dėl savo fotodinaminių ir fotocitotoksinių savybių, jis taip pat pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu ir be junginio aktyvacijos panaudojant šviesą. Buvo įrodyta, kad hipericinas turi priešnavikinį potencialą ir kai nėra šviesos – dėl jo antiproliferacinio, antimetastazinio ir antiangiogeninio poveikio [10].

### **1.2.2. Fenolinės rūgštys**

Mokslinėje literatūroje aptinkami kiekybiniai rezultatai yra įvairūs, tačiau bendrai sutariama vertinant, jog tarp *Hypericum* rūšių *H. perforatum* rūšies augaluose yra nustatyta didžiausia fenolinių rūgščių koncentracija. Fenolinės rūgštys pasižymi dideliu antioksidaciniu ir antibakteriniu aktyvumu [6].

Daugybė mokslinių tyrimų yra telkiami į įvairių fenolinių rūgščių aktyvumą prieš vėžį ir pagrindinius jų veikimo mechanizmus, kurie gali daryti teigiamą poveikį sveikatai, pavyzdžiui: DNR pažeidimams atstatyti, laisviesiems radikalams pašalinti, fermentų indukcijai, ląstelių proliferacijai ir apoptozei [11].

*In vitro* yra nustatyta, kad fenolinės rūgštys gali slopinti gaubtinės žarnos vėžio ląstelių proliferaciją ir sukelti vėžio ląstelių apoptozę. Tačiau reikia atlikti papildomus tyrimus siekiant iširti, kurie mechanizmai yra atsakingi už apoptozę po gydymo fenolinėmis rūgštimis [12]. Taip pat yra tyrimų, kurie rodo, jog fenolinės rūgštys gali pagerinti su gliukoze ir lipidais siejamas patologijas, pavyzdžiui:

diabetą bei širdies ir kraujagyslių ligas. Mityba, kurioje gausu fenolinių rūgščių, apsaugo nuo tam tikrų alergijų bei lėtina Alzheimerio ligos vystymąsi [11].

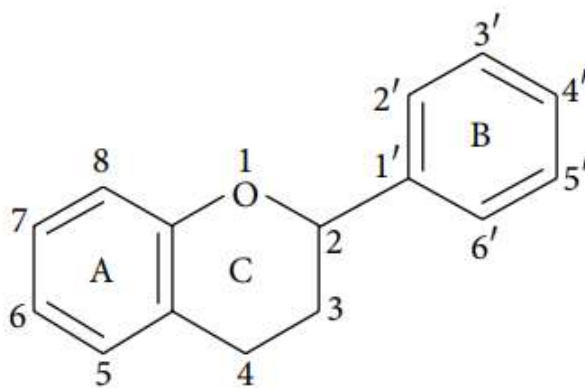
Vis dėlto, nors kai kurios fenolinės rūgštys yra gerai žinomos kaip veiksmingi bioaktyvūs mitybos ingredientai, jų farmakokinetika ir metabolinės savybės dar nėra iki galo ištirtos. Žinoma, tai riboja dabartinį jų vartojimą ir terapinį potencialą, todėl reikia atlikti tolesnius klinikinius tyrimus, siekiant pagrįsti ir optimizuoti jų naudojimą mitybos ir farmacijos srityse ateityje [11].

Dar viena sritis, kurioje fenolinės rūgštys naudojamos dėl savo vertingų savybių, yra maisto pramonė. Pastaraisiais dešimtmečiais čia vis labiau taikomas natūralių fenolinių antioksidantų naudojimas kaip veiksmingas būdas, kuris yra skirtas sulėtinti maisto gaminių gedimą dėl oksidacijos, taip padedant ilgiau išlaikyti patrauklias jų tekstūros savybes. Būtent fenolinės rūgštys yra natūralūs junginiai, kurie dėl savo didelio tirpumo ir lipiduose, ir vandenyje gali slopinti oksidaciją, pridėdami jų į emulsinius maisto produktus. Įprastai tokiuose produktuose, kai nenaudojami antioksidantai, lipidų oksidacija vyksta labai greitai. Dėl to fenolinės rūgštys – naudingas ir natūralus ingredientas [11], kurį galima pritaikyti pramonėje.

### 1.2.3. Flavonoidai

1930 metais iki tol nežinoma medžiaga buvo išskirta iš apelsinų. Tuo metu buvo manoma, kad tai – naujos vitaminų klasės junginys ir jis buvo įvardintas kaip vitaminas P. Vėliau paaiškėjo, kad tai buvo flavonoidas rutinas ir iki šiol jau yra identifikuota daugiau nei 4000 flavonoidų rūšių [13].

Bendrinė flavonoidų struktūra pavaizduota žemiau (žr. 1.2 pav.). Struktūriškai flavonoidai yra sudaryti iš penkiolikos anglies junginių skeleto, kuris yra sudarytas iš dviejų benzeno žiedų (žr. 1.2 pav., A ir B), sujungtų per heterociklinį pirano žiedą (žr. 1.2 pav., C). Juos galima suskirstyti į klases: flavonai (pvz., flavonas, apigeninas ir liuteolinas), flavonoliai (pvz., kvercetas, kempferolis, miricetas ir fisetas), flavanonai (pvz., flavanonas, hesperetas ir naringeninas) ir kiti [13].

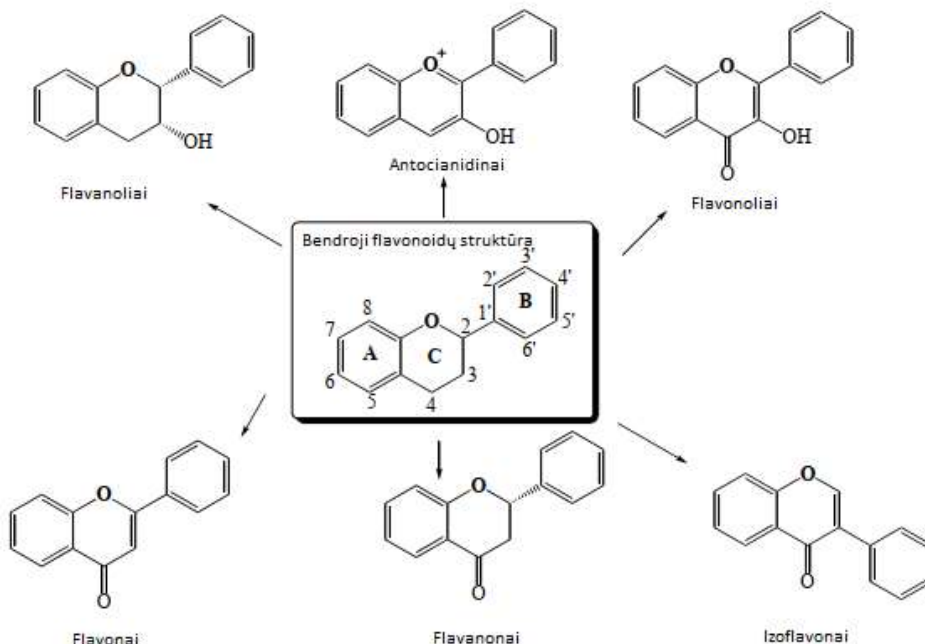


1.2 pav. Bendroji flavonoidų struktūra [13]

Pateiktos flavonoidų poklasių sudarančių junginių struktūros (žr. 1.3 pav.). Flavonoidai suskirstyti į poklasių: flavanoliai, antocianidiniai, flavonoliai, izoflavonai, flavanonai, flavonai [14].

Flavonoidų grupę sudaro polifenoliniai junginiai, kurių yra visuose augaluose, jie turi benzo- $\gamma$ -pirono struktūrą. Flavonoidai sintetunami fenilpropanoido biosintezės keliu (angl. *pathway*). Turimi duomenys iš mokslinių tyrimų rodo, kad antriniai fenolio metabolitai, įskaitant ir flavonoidus, yra

atsakingi už įvairias farmakologines funkcijas. Flavonoidai yra hidroksilinti fenolio junginiai, kuriuos sintetina augalai, reaguodami į mikrobinę infekciją. Funkcinės flavonoidų hidroksilo grupės užtikrina jų antioksidacinį poveikį, pašalindamos laisvuosius radikalus ir (arba) sudarydamos chelatinčius metalų jonus. Metalų chelatinčių jonų susidarymas gali būti labai svarbus siekiant riboti radikalų, kurie pažeidžia tiksles biomolekules, susidarymą. Manoma, kad flavonoidai, kaip maisto komponentai, turi sveiką stiprinančių savybių dėl didelio antioksidacinio pajėgumo ir *in vivo*, ir *in vitro* sistemose. Flavonoidai turi savybę „sužadinti“ žmogaus apsaugines fermentų sistemas. Tyrimai rodo, kad flavonoidai apsaugo nuo daugelio infekcinių (bakterinių ir virusinių) bei degeneracinių ligų, pavyzdžiui, širdies ir kraujagyslių, vėžio ar kitų su amžiumi susijusių ligų [13].



**1.3 pav.** Flavonoidų poklasių sudarančių junginių bendrinės struktūros [14]

Nustatyta, kad flavonoidams priskiriami miricetinas ir kvercetinas, išskirti būtent iš paprastosios jonažolės, turi priešnavikinį aktyvumą *in vitro*, kuris naudojamas gerinti prostatos vėžio gydymo galimybes [15]. Įrodyta, kad daugelis flavonoidų turi antioksidacinį aktyvumą, gali šalinti laisvuosius radikalus, veikia prevenciškai tam tikroms širdies ligoms, pasižymi hepatoprotekcinio, priešūždegiminio ir priešvėžinio poveikiu, kai kurie iš jų gali turėti antivirsinį poveikį. Augalų sistemose flavonoidai padeda kovoti su oksidaciniu stresu ir veikia kaip augimo reguliatoriai. Kadangi flavonoidai yra fitocheminiai junginiai, jų žmogus ir gyvūnai susintetinti negali. Taigi flavonoidai, randami gyvūnuose, yra augalinės kilmės, o ne biosintetiniai *in situ*. Maiste esantys flavonoidai paprastai yra atsakingi už spalvą, skonį bei riebalų oksidacijos prevenciją [13].

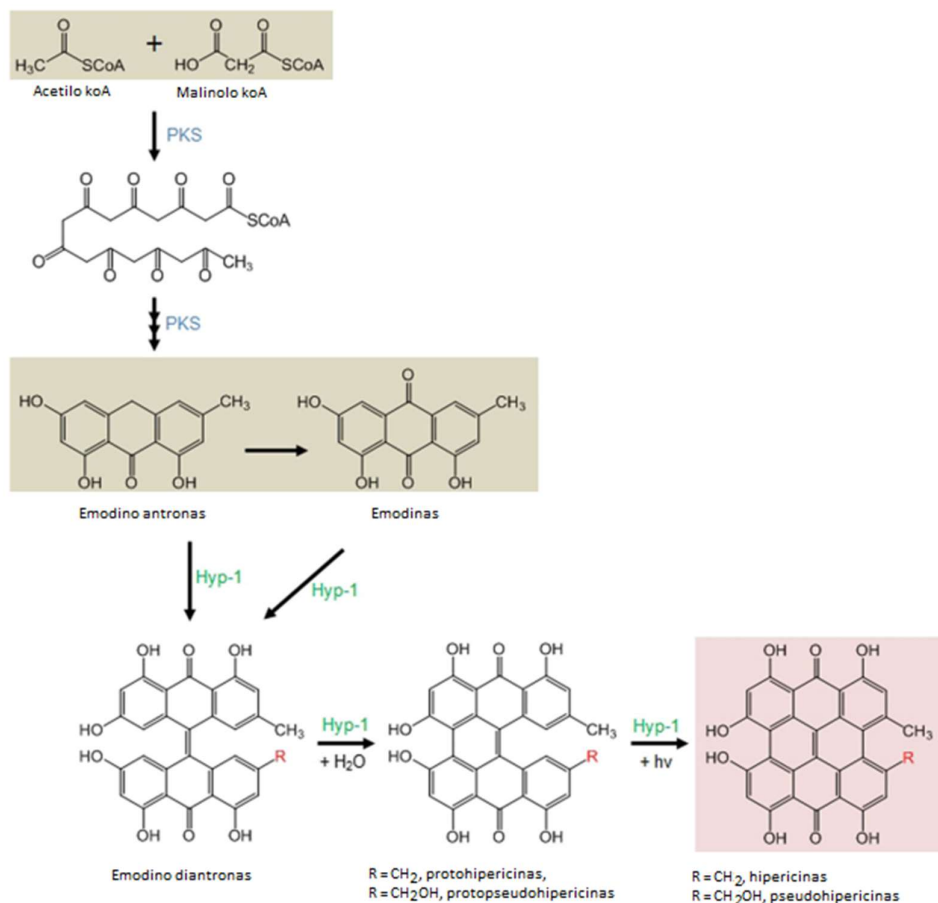
Flavonoidai veikia kaip antrinė antioksidacinė gynybos sistema augalų, kurie yra veikiami skirtingų abiotinių ir biotinių stresų, audiniuose. Jie augaluose reguliuoja augimo faktorius [13]. Flavonoidai atlieka svarbų vaidmenį gerinant hipericinų biofarmacines savybes [6]. Flavonoidai yra paplitę augaluose, įrodyta, kad suteikia apsauginį poveikį nuo UV spindulių [14].

### 1.2.4. Antocianinai

Antocianinai yra natūralūs biologiškai aktyvūs vandenyje tirpūs fenolio junginiai, tai yra viena iš pagrindinių natūralių pigmentų (oranžinės, raudonos, violetinės ir mėlynos spalvos) grupių. Gamtoje buvo identifikuota daugiau nei 700 antocianinų, kuriuos gamina augalai, norėdami pritraukti vabzdžius prie gėlių apdulkinimui, o žolėdžius gyvūnus prie vaisių, kad skleistų sėklas, taip pat, kad apsaugotų ląsteles nuo UV spindulių daromos žalos. Antocianinai yra flavonoidų poklasis [16].

### 1.3. Hipericino biosintezė

Hipericino biosintezės kelias pateiktas žemiau (žr. 1.4 pav.).



1.4 pav. Hipericino biosintezės kelias [17]

Pirmame biosintezės kelio etape viena acetilo kofermento A (koA) molekulė kondensuojasi su septyniomis malonilo koA molekulėmis, kad susidarytų oktaketidinė grandinė, vėliau vyksta jos cilizacija ir dekarboksilinimas, todėl susidaro emodino atronas. Pagrindiniai fermentai yra III tipo poliketidų sintazės (PKS), kurios katalizuoja reakcijas. Emodino antronas laikomas hipericino pirmtaku ir teigiama, kad greičiausiai dėl emodino antrono oksigenazės aktyvumo oksiduojamas į emodiną. Emodino diantronas susidaro po emodino antrono ir emodino kondensacijos, bei po šių procesų vykstančios dehidratacijos. Vėliau vyksta emodino diantrono fenolinė oksidacija, po kurios susidaro protohipericinas arba protopseudohypericinas. Visas šias reakcijas katalizuoja fenolinius junginius jungiantis baltymas (angl. *phenolic coupling protein*) Hyp-1. Manoma, kad protohipericino metilo grupės oksidacijos rezultatas yra hipericinas, o protopseudohypericino – pseudohypericinas.

Protoformų pavertimas į hipericiną ir pseudohipericiną gali vykti esant šviesai ir veikiant fermentui Hyp-1. Šis biosintezės kelias yra visuotinai priimtas, o cheminė hipericino sintezė buvo išvystyta vadovaujantis šiuo keliu ir naudojant emodino antroną kaip pirmtaką [17].

#### **1.4. Augalų streso veiksniai**

Augalai gali būti veikiami biotinio ir abiotinio streso savo natūralioje aplinkoje. Dažnai pasitaikantys abiotiniai streso veiksniai yra ekstremalios temperatūros, didelis augimo terpės druskingumas, per daug intensyvi šviesa bei ultravioletinė spinduliuotė, vandens trūkumas, įvairūs teršalai (pavyzdžiui, herbicidai), didelė sunkiųjų metalų koncentracija. Esant abiotinio streso veiksnių, augaluose yra skatinamas laisvųjų radikalų susidarymas ir tai gali pakenkti biomolekulėms: lipidų, baltymų ir nukleino rūgščių gamybai [18].

Laisvieji radikalai yra molekulių grupių, kurios vadinamos reaktyviosiomis deguonies, azoto ir sieros rūšimis, dalys – tai yra atomai, molekulės arba jonai, turintys nesuporuotų elektronų, jie yra labai aktyvūs cheminėse reakcijose su kitomis molekulėmis. Biologinėse sistemose laisvieji radikalai yra gaunami iš deguonies, azoto ir sieros molekulių [19].

Dažniausiai pasitaikanti žala, kurią sukelia reaktyviosios deguonies rūšys, yra membranų lipidų peroksidacija. Įprastai membranų lipidų peroksidacija augaluose yra nustatoma matuojant malondialdehido (MDA) koncentraciją, kuris yra plačiai naudojamas oksidacinio lipidų pažeidimo žymuo. Yra atlikta daug tyrimų, kuriuose tirtos MDA koncentracijos augaluose skirtingomis streso sąlygomis. Duomenys parodė, kad didelis druskingumo lygis gali sukelti šoką ir fotooksidacinį stresą, dėl kurio lapuose kaupiasi MDA. Tyrimai rapsus veikiant herbicidu parodė, kad MDA kiekis tiesiškai didėjo priklausomai nuo herbicido kiekio didėjimo. Taigi, MDA gali būti naudojamas kaip fiziologinės būklės rodiklis augalų augimo metu [18].

#### **1.5. Augalų antioksidacinis aktyvumas**

Augalai turi efektyvias fermentines ir nefermentines antioksidacines apsaugos sistemas, kad išvengtų toksiško laisvųjų radikalų poveikio. Fermentinėms sistemoms yra priskiriami fermentai: superoksido dismutazė (SOD), katalazė, glutathiono peroksidazė, glutathiono reduktazė. Nefermentinėms sistemoms yra priskiriami mažos molekulinės masės antioksidantai: prolinas, karotenoidai, fenolio rūgštys, flavonoidai, askorbo rūgštis, glutathionas ir kiti [20].

Antioksidantai – molekulės, kurios gali neutralizuoti laisvuosius radikalus, priimdamos arba atiduodamos elektronus. Antioksidantų molekulės gali tiesiogiai reaguoti su reaktyviais radikalais ir juos sunaikinti, o patys antioksidantai gali tapti naujais laisvaisiais radikalais, kurie yra mažiau aktyvūs ir mažiau pavojingi nei tie, kuriuos neutralizavo. Taip pat jie vėliau gali būti neutralizuoti kitų antioksidantų pagalba arba kitais mechanizmais [19].

Augalams patiriant stresą, pastebėta ir padidėjusi superoksido dismutazės (SOD) fermento koncentracija [18]. Superoksido dismutazės yra metalofermentų grupė, randama visose karalystėse. SOD apsaugo nuo reaktyviųjų deguonies rūšių. Tai yra fermentai, kurie katalizuoja superoksido anijonų laisvojo radikalo ( $O_2^-$ ) dismutaciją į molekulinį deguonį ir vandenilio peroksidą ( $H_2O_2$ ) ir sumažina  $O_2^-$ , kuris, esant per didelėms jo koncentracijoms, pažeidžia ląsteles [21].

Askorbato peroksidazė yra plačiai paplitęs antioksidantas. Jis skiriasi nuo katalazės ir kitų peroksidazių tuo, kad redukuoja reaktyviasias deguonies rūšis, pavyzdžiui, vandenilio peroksidą į

vandenį, naudodamas redukuotą askorbatą kaip elektronų donorą. Jo aktyvumo nustatymas padeda analizuoti oksidacinio streso lygį gyvose sistemose stresinėmis sąlygomis [22].

## **1.6. Augalų biotechnologija**

Augalų biotechnologija – tai metodų rinkinys, naudojamas augalus pritaikyti konkrečioms poreikiams ar galimybėms. Dirbtinių sėklų, biofarmacinių preparatų, augalinės kilmės vaistų, rekombinantinių ar kitų gydomųjų baltymų, transgeninių augalų ir augalinės kilmės vakcinų ar antikūnų gamyba yra pastaruoju metu vykdomų augalų audinių kultūrų tiriamųjų darbų dalis. Dabartinėje augalų biotechnologijoje pirmenybė teikiama antrinių metabolitų gamybai ir ligoms atsparių bei naujų veislių gamybai bei vertingiems augalų genetikos patobulinimams [23].

### **1.6.1. Kaliaus kultūros ir jų svarba**

Kaliaus kultūros gali būti plačiai naudojamos farmakologijoje ir farmacijoje, taip pat žemės ūkyje ir sodininkystėje. Vaistinių augalų kaliaus kultūros, kaip ir *in vivo* augantys augalai, sintetina bioaktyvias fitochemines medžiagas, kurios gali būti plačiai naudojamos. Iš jonažolės kaliaus kultūros sintetinamų junginių dažniausiai literatūroje minimi yra hipericinas ir hiperforinas.

Augalai prisitaiko prie abiotinių ir biotinių stresų ir gali sintetinti antrinius metabolitus, kuriuos aktyvuoja elicitoriai ir tuomet šie išsiskiria kaip gynybinis atsakas. Antrinių metabolitų susidarymą gali sukelti išoriniai streso signalai (pvz., patogenai, oksidacinis stresas, žaizdos ir kt.). Elicitorių poveikis skatina augalų apsaugą arba streso sukeltus atsakus. Abiotiniai elicitoriai veikia kaip fiziniai veiksniai (pvz., šaltis, karštis, UV šviesa ar osmosinis slėgis) ir cheminiai veiksniai (pvz., fungicidai, antibiotikai, druskos ar sunkieji metalai). Elicitoriai reguliuoja genų ekspresiją reaguojant į cheminius ir fizinius dirgiklius, indukuoja fermentų sintezę ir taip skatina daugelio antrinių metabolitų, pavyzdžiui, flavonoidų, alkaloidų, terpenoidų, tianinų, polipeptidų, susidarymą. Iširta, jog daugelis antrinių metabolitų ne tik suteikia augalui apsaugines funkcijas, bet ir pasižymi vertingomis žmogui farmacinėmis savybėmis [24].

Kaliaus ląstelės gali būti auginamos *in vitro* biotechnologiniais tikslais. Beveik bet kuri augalo dalis gali būti naudojama kaliaus kultūroms formuoti. Daugumoje sausumos augalų šeimų pažeistos audinių vietos yra atnaujinamos nediferencijuotomis kaliaus ląstelėmis. Taigi eksplantai, paimti iš augalų audinių, lėtai išauga *in vitro* į ląstelių masę, kuri gali būti amorfinė ir bespalvė, taip pat ir šviesiai ruda, jei kaliaus kultūros išaugintos steriliomis sąlygomis, į terpę nepatenka jokios mikrobinės infekcijos, bei kultūros auginamos ant standžios terpės, papildytos augalų augimo hormonais [24].

Reguliariai perkeltant ląsteles į naują terpę (sukuriant naują persėjimą), kaliaus kultūros gali augti neribotą laiką *in vitro*. Vis dėlto, diferencijuotos augalų ląstelės ir kultivuotos kaliaus ląstelės labai skiriasi – kaliaus kultūrų ląstelės yra panašios į nediferencijuotas meristematinės ląsteles: jos turi tik mažas vakuoles ir, be keleto kitų savybių, joms trūksta chloroplastų fotosintezėi. Kaliaus kultūros gali rediferencijuoti į augalus, jei jos laikomos atitinkamoje auginimo terpėje. Nors kai kurioms kaliaus kultūroms reikia augimo sąlygų tamsoje, kitos auga dienos ir nakties sąlygomis (pavyzdžiui, sąlygos parai: 16 valandų šviesos, 8 valandų tamsos), kaliaus kultūros dažniausiai auga  $25 \pm 2$  °C temperatūroje. Kultūras galima išskirti į dvi grupes: vienos auga gana kompaktiška forma, o kitos yra purių formų [24].

Mokslinėje literatūroje nurodomi pagrindiniai ląstelių kultūrų privalumai, lyginant su tradiciniu viso augalo auginimu [24]:

1. pasirinktas augalų dalis galima sėkmingai auginti nepriklausomai nuo išorinių veiksnių (pvz., dirvožemio sudėties ar klimato);
2. auginamos ląstelės apsaugomos nuo mikroorganizmų ar vabzdžių;
3. bet kokio augalo ląsteles, net retų ar nykstančių augalų, galima lengvai išsaugoti ir iš jų gauti antrinių metabolitų;
4. sumažinamos išlaidos ir padidinamas produktyvumas.

Dažniausiai kaliaus kultūros auginamos kietoje agarų terpėje, papildytoje specifinėmis maistinėmis medžiagomis, druskomis, vitaminais bei elementais (azotu, fosforu, kaliumu ir kt.). Paprastai didelės amonio jonų koncentracijos slopina antrinių metabolitų susidarymą, o sumažinus amonio kiekį antrinių metabolitų susidarymas padidėja. Neorganinis fosfatas yra būtinas fotosintezei ir glikolizei. Didelis fosfatų kiekis dažnai skatina ląstelių augimą ir pirminį metabolizmą, o mažas fosfatų koncentracija skatina antrinių metabolitų susidarymą. Daugelį antrinių metabolitų sudaro fosforilinti tarpiniai produktai, kurie vėliau išskiria fosfatą, pavyzdžiui, fenilpropanoidai ir terpenoidai. Tam, kad būtų naudinga komerciškai, antrinių metabolitų biosintezė augalų kultūrose turi būti pagerinta – pirmtakų pridėjimas į mitybinę terpę pagerina antrinių metabolitų arba tikslinio produkto susidarymą. Tipinės auginimo terpės yra gerai žinomos ir plačiai naudojamos, pavyzdžiui, Murashige ir Skoog (MS) terpė bei White terpė. Daugumos antrinių metabolitų biosintezės kelias yra sudarytas iš kelių fermentų katalizuojamų grandininės reakcijos ir bet kuris iš šių etapų gali būti stimuliuojamas, taip siekiant padidinti produktų susidarymo išeigą – į terpę reikia pridėti specifinių fitohormonų, kad būtų skatinama biosintezė [24].

Kaliaus kultūros gali būti naudojamos tvariai didelės skalės antrinių metabolitų gamybai farmacijos, kosmetikos, maisto bei kitose srityse. Didelis *in vitro* auginimo privalumas yra tai, kad fitocheminės medžiagos gali būti tiesiogiai išgaunamos iš kaliaus, šiuo būdu nėra kenkiama visam augalui, taip galima padėti išsaugoti retas bei sparčiai nykstančias augalų rūšis, o *in vitro* galima pagaminti pakankamai didelius kiekius antrinių metabolitų. Didesnėje skalėje naudojamos vienląsčių suspensijų kultūros, kurios auginamos kolbose ant purtyklių arba biofermentatoriuose, kad susidarytų pageidaujami antriniai metabolitai. *In vitro* auginimas leidžia kontroliuoti sąlygas ir panaikinti įvairių aplinkos veiksnių, sezoninių ligų, kenkėjų ir geografinių apribojimų įtaką. Taigi gali būti nuolat gaminami aukštos kokybės antriniai metabolitai [24].

Auginimas *in vitro* naudingas ne tik gauti antrinių metabolitų, tačiau taip pat augalų audinių kultūros leidžia atrankos būdu *in vitro* užauginti mutantus, kurie turi naudingų agronominių savybių (pavyzdžiui, atsparūs sausrai), jie gali būti atrenkami *in vitro* ir išskiriami tolesniam naudojimui. Be to, kaliaus kultūros svarbios transgeniniams augalams gauti, kurie pasižymi patobulintomis savybėmis, pavyzdžiui, atsparūs skersvėjui, aukštai temperatūrai, mikroorganizmų sukeliamoms ligoms ir kt. [24].

#### **1.6.2. Kaliaus kultūrų oksidacinis stresas**

Kultivacija *in vitro* sąlygomis sukelia oksidacinį stresą kaliaus indukcijos ir vystymosi metu. Kad būtų išvengta oksidacinių pažeidimų, antioksidaciniai fermentai: katalazė, peroksidazė ir askorbato peroksidazė nuolat vykdo biocheminius virsmus kaliaus ląstelėse, taigi jų aptinkama augalų kaliaus kultūrose [25].

### 1.6.3. Jonažolės kaliaus kultūrose kaupiami antriniai metabolitai

Mokslinėje literatūroje nurodyta, kad jonažolės kaliaus kultūros sintetina hipericiną ir pseudohipericiną naudojant tam tikras bakterijas kaip elicitorius [26]. Taip pat nurodoma, kad sintetinami fenoliniai junginiai bei flavonoidai [27]. *H. perforatum* L. kaliaus kultūrose taip aptikta antocianinų [16].

### 1.6.4. Fitohormonai

Fitohormonai yra organiniai junginiai, kurie patenka į konkrečias augalo vietas, kur reguliuoja augalų augimą ir vystymąsi, antrinių metabolitų sintezę. Auksinai, giberelinai, etilenas, abscizo rūgštis ir citokininai yra pagrindiniai fitohormonai, kurie atsakingi už įvairias augalų funkcijas. Tarp jų auksinai ir citokininai yra pagrindiniai mitybinės terpės ingredientai, kurie naudojami augalams auginti *in vitro* [28]. Labiausiai auksinai ir citokininai sąveikauja tarpusavyje reguliuodami daug augimo ir vystymosi procesų augaluose bei skatindami šiuos procesus [29].

### 1.6.5. Kaliaus kultūrų terpėse naudojami augalų augimo hormonai

IAR (3-indolilacto rūgštis) yra natūraliai randamas auksinas, plačiai naudojamas augalų audinių kultūroms kultivuoti [28]. Ir IAR, ir sintetiniai auksinai, pavyzdžiui, NAR (1-naftilacto rūgštis) ir 2,4-D (2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis) yra svarbūs augalų morfogenezei *in vitro*. IAR ir NAR yra dažniausiai naudojami įsišaknijimo hormonai, padedantys šaknims formuotis. Kinetinas bei BAP (6-benzilaminopurinas) yra vieni iš pagrindinių citokininų [28]. Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad skirtingos kinetino koncentracijos teigiamai veikia kaliaus formavimąsi, ir didėjant kinetino koncentracijai pagerėjo kaliaus formavimasis. Panašiai kaip kinetino atveju, naudojant BAP padidėjo kaliaus susidarymas. Padidinus BAP koncentraciją, kaliaus padidėjo 3,97 karto, lyginant su kontroliniu variantu [30].

Tidiazuronas (TDZ arba 1-fenil-1,2,3-(tidiazol-5-il)karbamidas) taip pat yra naudojamas kaliaus kultūroms kultivuoti, jis yra į citokininą panašus junginys, įprastai naudojamas *in vitro* kultūrų tyrimams ir įvairių augalų regeneracijai. Pastaraisiais metais šis junginys vis dažniau naudojamas dauginti *in vitro* įvairius augalus, įskaitant vaistinius augalus. Nustatyta, kad TDZ yra veiksmingesnis kaliaus formavimuisi ir ūglių organogenezei, palyginus su kitais citokininais. Kai kuriose sistemose sinerginis TDZ poveikis su kitais citokininais ar auksiniais, pavyzdžiui, NAR, buvo veiksmingesnis nei naudojant šį vieną junginį [28].

### 1.6.6. Kaliaus kultūrų terpėse naudojami pirmtakai

Pirmtakai taip pat yra naudojami eksperimentuose siekiant padidinti tikslinių antrinių metabolitų biosintezę [31]. Fenilalaninas yra fenilpropanoidų biosintezės kelio tikslinių antrinių metabolitų pirmtakas. *P. corylifolia* kaliaus kultūrų kultivavime fenilalanino pridėjimas į mitybinę terpę padidino izoflavonų biosintezės lygį [32]. Taip pat literatūroje nurodoma, kad mitybinės terpės papildymas fenilalaninu padidino antrinių metabolitų sintezę braškių kaliaus kultūrose [33].

## 1.7. Jonažolės ekstraktų panaudojimo galimybės

Kaip jau buvo minėta, jonažolė gerai žinoma ir taikoma medicinoje dėl savo antibakterinių, lengvinančių depresiją ir kitų naudingų savybių. Tačiau yra duomenų ir apie galimą jonažolės ekstraktų naudojimą taip pat ir dermatologiniams tikslams bei žaliajai nanodalelių sintezei.

Nanodalelės gali būti sintetinės naudojant cheminius, fizinius, biologinius ar hibridinius metodus. Tačiau fiziniais ir cheminiais metodais sintetinant nanodaleles reikia aukštos temperatūros ir slėgio bei toksiškų cheminių medžiagų. Dėl to vis dažniau yra atliekami tyrimai naudojant biologinius arba „žaliuosius“ metodus. Šie biologiniai metodai paprastai pagrįsti mikrodumblių, grybų, bakterijų ir augalų naudojimu [34]. *H. perforatum* ekstraktas redukuoja metalų jonus į nanodaleles ir jas stabilizuoja. Aukso (III) chlorido hidratas ( $\text{HAuCl}_4$ ) redukuojamas iki aukso nanodalelių. Sidabro nitratas ( $\text{AgNO}_3$ ) redukuojamas iki sidabro nanodalelių [35]. Yra duomenų, kad augalų kaliaus kultūrose nanodalelės gali būti maistinių medžiagų šaltinis ir elicitorius, ir dėl jų padidėja įvairių antrinių metabolitų sintezė augalų kaliaus kultūrose [36].

#### **1.7.1. Naudojimas dermatologijos srityje**

Jonažolės preparatai, pavyzdžiui, aliejai ar tinktūros, yra naudojami nedidelėms žaizdoms ir nudegimams, nudegimams saulėje, įbrėžimams, mėlynėms, sumušimams, opoms gydyti. Junginiai, kuriuos jonažolė sintetina, tarp jų hipericinas ir hiperforinas, turi naudingų farmakologinių savybių: antioksidacinių, priešuždegiminių, priešvėžinių ir antimikrobinių. Vis dėlto, klinikinių tyrimų dėl jonažolės preparatų naudojimo dermatologijos srityje vis dar yra nepakankamai. Buvo atlikti pavieniai žaizdų gijimo, atopinio dermatito, psoriazės ir pūslelinės infekcijų tyrimai, naudojant išgrynintus jonažolės junginius ir šiuolaikines dermatologines formules [37].

Dėl antimikrobinių ir priešuždegiminių savybių, taip pat dėl to, kad stimuliuoja fibroblastų judrumą, kolageno gamybą ir keratinocitų diferenciaciją, jonažolės ekstraktai padeda gyti žaizdoms. Aliejus ir kiti preparatai, kurių sudėtyje yra hiperforino ir hipericino arba jų darinių, yra tinkami naudoti ant įbrėžimų, įbrėžimų, nudegimų ir opų. Tepalas, pagamintas iš 5 gramų šviežių jonažolės žiedų ir 100 gramų alyvuogių aliejaus, tyrimo metu buvo naudotas nudegimams gydyti. Pirmo lygio nudegimai užgijo per 48 valandas. Taip pat buvo atlikti klinikiniai tyrimai aliejinio jonažolės tepalo įtakai cezario pjūvio žaizdos gijimui iširti. Tepalas buvo pagamintas iš išdžiovintų ir susmulkintų jonažolės žiedų, vynuogių sėklų aliejaus ir vazelino. Tyrimai patvirtino, kad jonažolės naudojimas turėjo teigiamos įtakos tokio pobūdžio žaizdoms gyti [37].

Dermatito atveju naudingos jonažolės farmakologinės savybės yra priešuždegiminis ir antibakterinis aktyvumas, keratinocitų (odos ląstelių, kurios apsaugo nuo mikroorganizmų, ultravioletinių spindulių poveikio ir palaiko drėgmę odoje) diferenciacijos stimuliavimas, ir niežėjimo lengvinimas, nes atopinei odai būdingas uždegimas, padidėjęs jautrumas įvairiems dirgikliams, niežulys ir dėl to atsirandantys įbrėžimai bei nedideli epidermio pažeidimai; dėl vandens praradimo pažeistas odos barjeras; bakterinės infekcijos. Jonažolės ekstraktai, remiantis mokslinė literatūra, atrodo tinkami, kad palengvintų dermatito simptomus, tačiau vaistažolių ekstraktų su daugybe sudedamųjų dalių naudojimas ant atopinės odos taip pat gali dirginti odą. Tyrimai su hiperforinu parodė, kad jis gali lengvinti dermatito simptomus nesukeliant odos dirginimo. Buvo atliktas tyrimas su atopiniu dermatitu sergančiais žmonėmis tiriant kremą, kuriame buvo 1,5 % hiperforino veikliosios medžiagos, ir lyginta su placebo. Pastebėta, kad kremas su hiperforinu turėjo pranašumą gydant lengvą ar vidutinio sunkumo atopinį dermatitą. Tačiau tam, kad būtų pilnai įvertintas kremo terapinis veiksmingumas, reikia atlikti daugiau tyrimų su daugiau pacientų [37].

Taip pat buvo tirtas ir jonažolės veiksmingumas psoriazei gydyti. Nustatyta, kad jonažolės kremas gali padėti palengvinti psoriazės simptomus, tačiau tam, kad būtų galima pagrįsti veiksmingumą, taip pat reikia atlikti daugiau tyrimų [37].

Pūslelinei (*Herpes simplex* viruso sukeliama liga) gydyti taip pat yra tiriami ir jonažolės ekstraktai bei geriami preparatai, sudėtyje turintys 900–1800 mg jonažolės ekstrakto. Veiksmingumas grindžiamas hipericino gebėjimu slopinti proteinkinazę C taip slopinant viruso replikaciją, ypač kartu taikant UV arba regimos šviesos terapiją. Tačiau šių tyrimų rezultatai pateikti tik abstrakčiai ir išvadoms pateikti reikia platesnių tyrimų [37].

Jonažolės ekstraktai taip pat gali būti naudojami ir odos vėžiui gydyti. Tyrimo metu į vėžio paveiktus audinius buvo suleista hipericino injekcijų, o vėliau apšvitinta regimąja šviesa. Atlikti tyrimai parodė, kad hipericinas gali būti selektyviai nukreipiamas į naviką nenužudant nevėžinių ląstelių, netgi buvo pastebėtas naujo epitelio susidarymas naviko paviršiuje. Tačiau šio tyrimo metu pastebėtos remisijos po 6–8 savaičių. Taip pat yra atliktų tyrimų naudojant jonažolių ekstraktą odos paviršiuje ir apšvitinant raudona šviesa – šiuo gydymo metodu buvo atvejų, kai pasiektas visiškas vėžinių ląstelių išnykimas [37].

Jonažolių ekstraktai gali būti naudojami odos priežiūroje ir dėl to, kad gali padėti odai neprarasti drėgmės, sudarant „barjerą“. Hiperforinas gali padėti sumažinti vandens praradimą [37].

Kaip ir visi preparatai, skirti gydyti ligas ar palengvinti simptomus, jonažolės ekstraktai, naudojami dermatologijoje, gali turėti šalutinių poveikių. Pasitaikantys nepageidaujami poveikiai naudojant ekstraktą ant odos gali būti dirginimas, padidėjęs odos jautrumas šviesai, tačiau nurodoma, kad rizika yra palyginti maža [37].

### **1.7.2. Aukso nanodalelių naudojimo galimybės**

Aukso nanodalelės gali būti naudojamos aplinkosaugos ir energetikos sektoriuose, maisto pramonėje, biomedicinoje. Vis daugiau tyrimų biomedicinos srityje yra atliekama ne tik dėl jų priešnavikinio, poveikio, bet ir dėl potencialo nustatyti diagnozes ir taikyti terapijas [38].

Aukso nanodalelės gali būti naudojamos gerinti vaistų „pristatymą“ į tam tikras konkrečias audinių vietas taip padidinant šių vaistų terapinį veiksmingumą, kartu ir vėžio gydymo veiksmingumą. Yra naujausių tyrimų apie aukso nanodalelių naudojimą plaučių vėžiui diagnozuoti bei gydyti. Buvo įrodyta, kad aukso nanodalelių naudojimas gali aptikti ankstyvos stadijos nesmulkią ląstelinę plaučių karcinomą. Aukso nanodaleles galima naudoti diagnozuojant įvairių tipų vėžį: plaučių, krūties, gimdos kaklelio, kepenų, storosios žarnos. Tačiau šioje srityje taip pat reikia nuodugnių tyrimų, kurie atsakytų į kylančius klausimus dėl aukso nanodalelių naudojimo medicinoje saugumo, galimo toksiško poveikio, imunologinio organizmo atsako; taip pat įvertinti farmakokinetiką [34].

### **1.7.3. Sidabro nanodalelių naudojimo galimybės**

Sidabro nanodalelės pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš Gram teigiamas ir prieš Gram neigiamas bakterijas. Palyginti su aukso, platinos, geležies ir cinko nanodalelėmis, sidabro nanodalelės pasižymi labai dideliu biologiniu aktyvumu ir mažu citotoksiškumu, gali būti naudojamos atskirai arba kartu su įvairiais antibiotikais, siekiant sumažinti bakterijų atsparumą vaistams. Tai yra tiklinga, nes pastaruoju metu padaugėjo antibiotikams atsparių bakterijų padermių, daugėja vaistams atsparių navikų ląstelių ir su oksidaciniu stresu susijusių sutrikimų. Sidabro nanodalelės keičia bakterijų ląstelių membranų ir sienelių struktūrą, skatina reaktyviųjų deguonies rūšių gamybą, DNR pažeidimus ir sukelia bakterijų ląstelių apoptozę. Sidabro nanodalelės taikomos patogenų aptikimui ir diagnostikai, vietiniam žaizdų gydymui, vaistų „pristatymo“ į tikslinę vietą

gerinimui. Dėl antibakterinio aktyvumo sidabro nanodalelės naudojamos širdies ir kraujagyslių bei dantų implantų sudėtyje [35].

#### **1.7.4. Titano nanodalelių naudojimo galimybės**

Naudojant  $\text{TiO}_2$ /perlito nanokompozitą kaip elicitorių, buvo padidinta antrinių metabolitų (hipericino ir pseudohypericino) sintezė ir kaupimasis, nedarant neigiamo poveikio *H. perforatum* kaliaus kultūrų augimui.  $\text{TiO}_2$ /perlito nanokompozitas pagamintas iš *H. perforatum* vandens pagrindo ekstrakto, titano izopropoksido tirpalo ir perlito miltelių.

Kaliaus kultūros, gautos iš *in vitro* auginamų augalų, kurių mitybinė terpė buvo papildyta perlito nanodalelėmis ir  $\text{TiO}_2$ /perlito nanokompozitu, susintetino daugiau metabolitų nei natūralioje aplinkoje augusi jonažolė. Ir perlito dalelės, ir  $\text{TiO}_2$ /perlito nanokompozitas galėjo skatinti didesnę hipericino ir pseudohypericino sintezę *H. perforatum* kaliaus kultūrose. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad perlito nanodalelės ir  $\text{TiO}_2$ /perlito nanokompozitas gali būti vadinami nauja eliciatorių klase. Vis dėlto duomenų apie antrinių metabolitų sintezės indukciją reaguojant į nanomedžiagas kol kas nėra pakankamai, todėl reikia daugiau eksperimentų, kurie suteiktų papildomos vertingos informacijos dėl šių medžiagų kaip elicitorių naudojimo [36].

#### **1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

Dėl plataus farmakologinio aktyvumo spektro, antidepresinio, antivirusinio ir antibakterinio poveikio, paprastoji jonažolė yra vienas iš labiausiai vartojamų vaistinių augalų pasaulyje, o šio augalo ekstraktai plačiai naudojami kaip fitofarmaciniai ir maistiniai preparatai. Šis augalas kaupia daug antrinių metabolitų, dėl kurių ir yra ypač naudingas farmaciniams tikslams. Jonažolės ekstraktai yra naudojami medicinoje ir farmacijoje. Mokslinėje literatūroje yra informacijos apie ekstraktų naudojimą nanodalelėmis gauti žaliosios sintezės būdu. Ekstraktai taip pat gali būti naudojami dermatologijoje susirgimams, žaizdoms bei randams gydyti.

Dėl to, kad ši jonažolės rūšis – vienas iš labiausiai vartojamų vaistinių augalų pasaulyje, yra svarbu ieškoti būdų, kaip efektyviau išgauti veikliuosius šio augalo junginius.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Tyrimų metu naudoti reagentai pateikti 1 priede, įranga pateikta 2 priede. Visi mėginiai ruošti trimis pakartojimais, skaičiuotas rezultatų vidurkis ir standartinis nuokrypis.

### 2.1. Jonažolės paruošimas

#### 2.1.1. Mitybinių terpių su augimo reguliatoriais paruošimas

Darbe vykdytas jonažolių kaliaus kultūrų auginimas Murashige ir Skoog (MS) mitybinėse terpėse (MS terpės sudėtis pateikta 3 priede) su įvairiais priedais – augalų augimo hormonais. Lentelėje pateiktas mitybinių terpių priedų sąrašas (žr. 2.1. lentelę).

**2.1 lentelė.** Augalų augimo hormonai, kurie buvo pridėti į mitybines terpes

| Eil. Nr. | Sutrumpinimas | Cheminis pavadinimas                  |
|----------|---------------|---------------------------------------|
| 1.       | TDZ           | 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urėja |
| 2.       | IAR           | 3-indolilacto rūgštis                 |
| 3.       | Kinetinas     | 6-furfurilaminopurinas                |
| 4.       | 2,4-D         | 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis        |
| 5.       | NAR           | 1-naftilacto rūgštis                  |
| 6.       | BAP           | 6-benzilaminopurinas                  |

Kaliaus kultūros įprastai yra auginamos kietoje agarų terpėje, papildytoje specifinėmis maistinėmis medžiagomis, druskomis, vitaminais, mikroelementais bei makroelementais [24], fitohormonais bei vitaminais [13]. MS terpės yra labai plačiai naudojamos dėl įvairių maistinių medžiagų didelio kiekio, jos tinka įvairioms augalų kultūroms auginti. Ši terpė ypatinga tuo, kad joje yra didelės amonio nitrato ir kalio nitrato koncentracijos. Taip pat sudėtyje yra sulfatų, sacharozės, B grupės vitaminų B6 ir B1 [39].

Buvo paruoštos mitybinės MS terpės su priedais, į kurias pasodintos jonažolių sėklos. Mitybines terpes papildančių augimo hormonų koncentracijos ir terpių trumpiniai, naudojami visame darbe, pateikti 2.1.3 skyrelyje (žr. 2.3 lentelę). Terpių pH buvo intervale nuo 5,7 iki 5,8. Mitybinės terpės sterilintos 15 minučių autoklave 120 °C temperatūroje, esant 0,75–1 atm slėgiui.

#### 2.1.2. Jonažolės kaliaus kultūrų kultivavimas

Prieš sodinant jonažolės sėklas į mitybinę terpę, jos buvo sterilintos jas palaikius 1 kartą 70 % etanolyje 5 sekundes; 1 kartą 1,5 % natrio hipochlorite 20 sekundžių ir 3 kartus nuplovus steriliu distiliuotu vandeniu. Sterilinimo sąlygos pateiktos lentelėje (žr. 2.2 lentelę):

**2.2 lentelė.** Jonažolės sėklų sterilinimo sąlygos

| Eil. Nr. | Tirpalas                              | Trukmė       | Kartai |
|----------|---------------------------------------|--------------|--------|
| 1.       | 70 % C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH | 5 sekundės   | 1      |
| 2.       | 1,5 % NaClO                           | 20 sekundžių | 1      |
| 3.       | Sterilus distiliuotas vanduo          | –            | 3      |

Sėklų sodinimas į Petri lėkštes vykdytas steriliomis sąlygomis laminare. Laminaras prieš procesą sterilintas ultravioletiniais spinduliais bei 70 % etanoliu. Kaliaus kultūrų kultivavimo metu buvo palaikoma optimali 20–22 °C temperatūra, fotoperiodas – 24 valandos. Eksplantai reguliariai kas 3 savaites perkelti į naują mitybinę terpę.

### 2.1.3. Jonažolės biomasės paruošimas tyrimams

Darbe tirti ekstraktai, gauti iš jonažolių, augintų ne tik mitybinėse terpėse *in vitro*, tačiau taip pat ir *in vivo* (žr. 2.3 lentelę) – lentelėje pateiktas sąrašas, kuriame yra nurodytos augimo sąlygos arba mitybinės terpės ir jų trumpinimai, kurie naudojami toliau darbe.

#### 2.3 lentelė. *In vitro* mitybinių terpių sudėtis ir trumpinimai

| Eil. Nr. | Augimo sąlygos/mitybinės terpės sudėtis                           | Trumpinimas, naudojamas toliau darbe ir grafikuose |
|----------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1.       | <i>in vivo</i> augusios jonažolės                                 | <i>in vivo</i>                                     |
| 2.       | <i>in vitro</i> : MS + 0,5 mg/l TDZ, 0,1 mg/l IAR                 | <i>in vitro</i> : TDZ + IAR                        |
| 3.       | <i>in vitro</i> : MS 0,11 µM kinetinas + 0,9 µM 2,4-D             | <i>in vitro</i> : kinetinas + 2,4-D                |
| 4.       | <i>in vitro</i> : MS + 0,1 mg/l NAR, 0,2 mg/l BAP, 0,5 mg/l 2,4-D | <i>in vitro</i> : NAR + BAP + 2,4-D                |

Lentelėje (žr. 2.3 lentelę) 1 numeriu nurodytos *in vivo* augusios jonažolės augalas buvo sudžiovintas, susmulkintas ir paruoštas tyrimams; 2–4 terpėse *in vitro* augintos kaliaus kultūros po kultivavimo buvo surinktos, sudžiovintos, susmulkintos ir paruoštos tyrimams.

### 2.2. Jonažolės *in vivo* ir *in vitro* antioksidacinio aktyvumo nustatymas

#### 2.2.1. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas

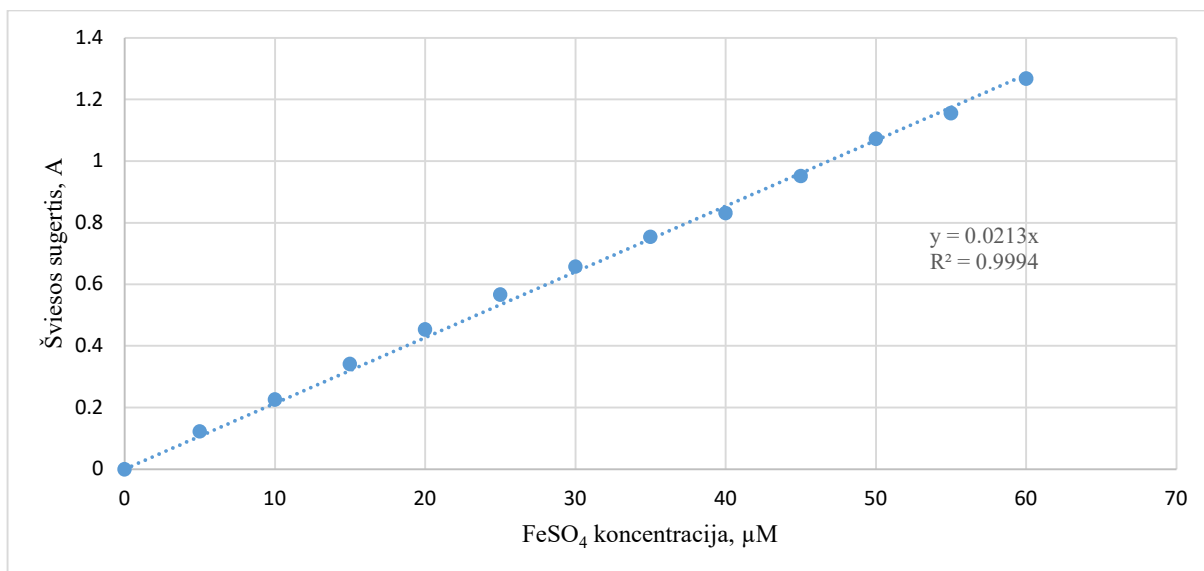
*Eiga.* Po 0,1 g kiekvienos išdžiovintos susmulkintos tiriamos medžiagos ekstrahuota 5 ml metanolio 45 °C temperatūroje 30 minučių. Ekstraktai centrifuguoti 10 min ir naudoti tyrimams.

Į 0,5 ml tūrio paruoštus tiriamus ekstraktus supilta po 1,25 ml 0,2 M natrio fosfatinio buferio ir 1,25 ml 1 %  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Sumaišyta ir inkubuota 50 °C temperatūroje 20 minučių. Po inkubacijos pridėta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišyta. Centrifuguota 5 minutes 9000 aps./min greičiu. 1,25 ml nucentrifuguotų tirpalų sumaišyta su 1,25 ml distiliuoto vandens ir 0,25 ml 0,1 %  $FeCl_3$  tirpalu. Mėginių sugertis išmatuota 700 nm bangos ilgyje.

Šis redukcinių savybių nustatymo metodas paremtas tuo, kad junginiai, turintys redukcinį potencialą, reaguoja su kalio ferincianidu (turinčiu  $Fe^{3+}$  joną) ir susidaro kalio ferocianidas (turintis  $Fe^{2+}$  joną), kuris vėliau reaguoja su  $FeCl_3$  ir sudaro geležies-geležies kompleksą, pasižymintį absorbcija 700 nm bangos ilgyje. Taigi, didesnė šviesos sugertis reiškia geresnes redukcinės savybes [40, 41].

#### 2.2.2. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą

Kalibracinė kreivė (žr. 2.1 pav.) antioksidaciniam aktyvumui nustatyti buvo parengta naudojant skirtingų koncentracijų  $FeSO_4 \times 7 H_2O$  tirpalus: 5, 10, 15, 20 ir 25 µmol/l. Reikšmės apskaičiuotos pagal kalibracinę kreivę. Tuščias kalibracinės kreivės mėginys buvo paruoštas iš 3 ml FRAP reagento ir 7 ml distiliuoto vandens.



**2.1 pav.** FeSO<sub>4</sub> kalibracinė kreivė antioksidaciniam aktyvumui nustatyti FRAP metodu

*Eiga.* Po 0,1 g kiekvienos išdžiovintos medžiagos ekstrahuota 5 ml metanolio 45 °C temperatūroje 30 minučių. Ekstraktai centrifuguoti 10 min 9000 aps./min greičiu ir naudoti tyrimams.

FRAP reagentas paruoštas iš 25 ml 300 mM natrio acetato buferinio tirpalo, 2,5 ml 10 mM TPTZ ir 2,5 ml 20 mM FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O. Mėginiai iš 20 μl kiekvieno ekstrakto ir 80 μl metanolio sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu. Tuščias mėginys buvo paruoštas iš 100 μl metanolio ir 3 ml FRAP reagento. Reakcijos mišinys spektrofotometru matuotas 593 nm bangos ilgyje.

Tyrimas yra pagrįstas antioksidantų redukcine galia. Antioksidantai redukuoja geležies Fe<sup>3+</sup> joną į geležies Fe<sup>2+</sup> joną, kuris sudaro mėlyną kompleksą Fe<sup>2+</sup>/TPTZ. Dėl šio komplekso susidarymo sugertis 593 nm bangos ilgyje padidėja [42]. Šis absorbcijos pokytis yra tiesiogiai susijęs su elektronų atiduodančių antioksidantų, kurių yra reakcijos mišinyje, bendra redukcine galia [43].

### 2.2.3. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

DPPH etaloninis tirpalas paruoštas 0,0024 g DPPH radikalo ištirpinus metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje [44].

*Eiga.* Po 0,2 g kiekvienos išdžiovintos susmulkintos augalinės žaliavos užpilta 2 ml metanolio ir homogenizuota kratytuve 10 minučių. Homogenatas centrifuguotas 9000 aps./min greičiu 10 minučių ir supernatantas surinktas.

Tiriamieji tirpalai paruošti į mėgintuvėlį įpylus po 0,077 ml paruoštų ekstraktų ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlių turiniai sumaišyti, 15 minučių laikyti tamsoje ir tada matuotas tirpalų šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

Palyginamasis tirpalas paruoštas į mėgintuvėlį įpylus 0,077 ml metanolio ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

Formulė (2.1) naudota apskaičiuoti DPPH radikalo slopinimui:

$$\text{Slopinimas, \%} = \frac{A(\text{palyginamojo}) - A(\text{tiriamojo})}{A(\text{palyginamojo})} \times 100 \% \quad (2.1).$$

Čia:

A(palyginamojo) – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis, absorbcijos vienetai;

A(tiriamajo) – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis, absorbcijos vienetai.

Radikalo formoje DPPH pasižymi sugertimi 515 nm bangos ilgyje. Metodas pagrįstas būtent tuo, kad sugertis šiame bangos ilgyje išnyksta DPPH redukuojant antiradikaliniais junginiais [45].

#### **2.2.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu**

Paruoštas 2 mM ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgštis), sumaišius 2 mM ABTS su 0,17 mM kalio persulfatu, kuris ištirpintas 20 mM fosfatiname buferiniame tirpale (pH 7,4) ir laikytas per naktį.

*Eiga.* Po 0,1 g išdžiovintų susmulkintų tiriamųjų medžiagų ekstrahuota 5 ml metanolio 45 °C temperatūroje 30 minučių. Ekstraktai centrifuguoti 9000 aps./min greičiu 10 minučių ir naudoti tyrimams.

Į 0,5 ml ekstrakto įpilta po 1,7 ml 20 mM fosfato buferinio tirpalo ir 0,3 ml ABTS tirpalo. Tuščias bandinys buvo 20 mM fosfato buferinis tirpalas.

Formulė (2.2) naudota apskaičiuoti ABTS slopinimą:

$$\text{Slopinimas, \%} = \frac{A(\text{praskiesto}) - A(\text{tiriamajo})}{A(\text{praskiesto})} \times 100 \% \quad (2.2).$$

Čia:

A(praskiesto) – praskiesto ABTS tirpalo šviesos sugertis, absorbcijos vienetai;

A(tiriamajo) – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis, absorbcijos vienetai.

ABTS paremta analizė yra vienas iš labiausiai paplitusių antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodų. Šis metodas yra pagrįstas metastabiliojo radikalo ABTS redukavimu dėl antioksidacinių junginių buvimo reakcijos mišinyje. ABTS metodu matuojamas santykinis antioksidantų gebėjimas slopinti vandeninėje fazėje susidariusią ABTS. ABTS susidaro stipriam oksidatoriui (pvz., tyrime naudotam kalio persulfatui) reaguojant su ABTS druska. Vandenilį atiduodančių antioksidantų vykdoma mėlynai žalio ABTS radikalo redukcija matuojama pagal sugerties spektro slopinimą 734 nm bangos ilgyje [46].

### **2.3. Sintetinių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas**

#### **2.3.1. Sintetinių junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas**

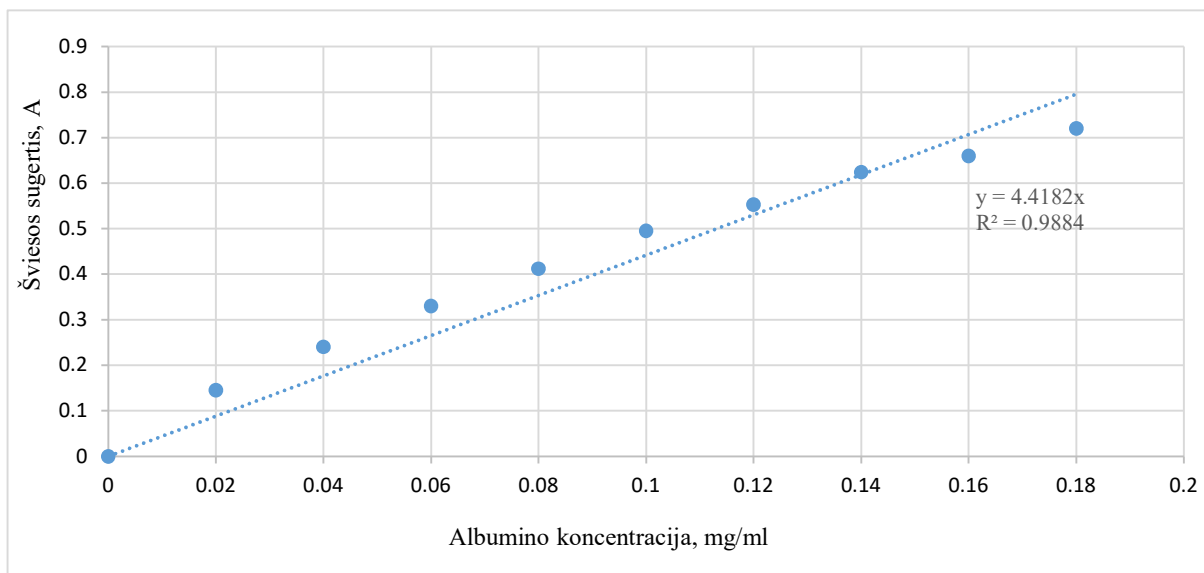
Atlikta analizė, siekiant nustatyti butilato hidroksitolueno, askorbo rūgšties bei 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties redukcines (antioksidacines) savybes. Kiekvienas junginys tirpintas vandenyje iki 0,02 g/ml koncentracijos. Darbo eiga analogiška nurodytai 2.2.2. skyrelyje.

Tiriamos medžiagos yra gerai žinomi antioksidantai. Butilato hidroksitoluenas (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenolis) yra dažnai maiste naudojamas antioksidantas. Askorbo rūgštis taip pat antioksidantas, naudojamas apdorotos mėsos produktuose [47]. 3,4-dihidroksibenzoinė rūgštis taip pat yra stiprus antioksidantas [48].

## 2.4. Antioksidacinių fermentų nustatymas

### 2.4.1. Superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas

Parengta baltymų koncentracijai nustatyti skirta kalibracinė kreivė pagal albuminą (žr. 2.2 pav.). Paruoštas pradinis tirpalas: 25 mg albumino ištirpinta 25 ml distiliuoto vandens. Iš šio tirpalo imti šių tūrių mėginiai: 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, 1,2 ml, 1,4 ml, 1,6 ml ir 1,8 ml ir kiekvienas skiestas distiliuotu vandeniu iki 10 ml tūrio. Gautos skiestų mėginių koncentracijos, atitinkamai: 0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,12 mg/ml, 0,14 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,18 mg/ml. Į kontrolinį mėgintuvėlį įpilta 0,2 ml distiliuoto vandens ir 2 ml Bradfordo reagento, į kitus mėgintuvėlius po 0,2 ml kiekvienos koncentracijos albumino tirpalo ir 2 ml Bradfordo reagento. Mėginius sumaišius jų sugertis matuota 595 nm bangos ilgyje.



2.2 pav. Kalibracinė kreivė baltymų koncentracijai nustatyti

*Eiga.* Pasverta po 0,1 g kiekvienos tiriamos žaliavos. Tirpių baltymų ekstrakcija vykdyta 4 ml tūryje 66 mM natrio fosfato buferinio tirpalo, kurio pH 7,4, kuriame yra 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, (kuris ištirpintas DMSO), 2 mg polivinilpirolidono. Mėginys maišytas kratytuve 10 minučių 25 °C temperatūroje. Tada mėginys 10 minučių centrifuguotas 9000 aps/min greičiu. Po to supernatantas surinktas ir dar kartą centrifuguotas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose.

Paruošti 2 ml tūrio reakcijos mišiniai su ekstraktais: 40 µl paruošto supernatanto, 400 µl 200 mM Tris-HCl buferinio tirpalo, kurio pH 7,8, 200 µl 100 mM L-metionino, 200 µl 540 µM nitromėlynojo tetrazolio (NBT), 500 µl 0,1 % Tritono X-100, 20 µl 300 µM riboflavino bei 640 µl distiliuoto vandens. Kontrolinis mėginys paruoštas be ekstrakto. Mėginiai 30 minučių palikti apšviesti liuminescentinėmis lempomis. Šviesos sugertis matuota 560 nm bangos ilgyje.

Fermento aktyvumas apskaičiuotas pagal formulę (2.3):

$$A = \frac{\log\left(\frac{S_K}{S_T}\right)}{\log 2 \times m} \quad (2.3).$$

Čia:

A – fermento superoksido dismutazės aktyvumas, vnt/mg;  
 $S_K$  – kontrolinio bandinio šviesos sugertis;  
 $S_T$  – tiriamojo bandinio šviesos sugertis;  
 m – baltymo koncentracija preparate, mg/ml (apskaičiuota naudojantis kalibracine kreive, pateikta 2.2 pav.).

SOD tyrimo NBT metodas pagrįstas tuo, kad NBT yra redukuojama iki mėlynos spalvos diformazano veikiant superoksido radikalui [49].

#### 2.4.2. Askorbatperoksidazės aktyvumo nustatymas

Po 0,1 g kiekvienos tiriamos žaliavos sumaišyta su 4 ml atšaldyto kalio fosfato buferinio tirpalo (pH 7), kuriame yra 1 mM DTT ir DMSO ištirpinto 0,5 mM PMSF. Mėginiai 10 minučių maišyti termostatuojamame 25 °C temperatūros kratytuve. Po to mėginiai 10 minučių centrifuguoti 9000 aps./min greičiu. Supernatantai nusiurbti ir dar kartą centrifuguoti 5 minutes *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose.

Baltymams nustatyti naudotas Bradfordo reagentas: po 200 µl mėginio sumaišyta su 2 ml reagento ir išmatuota šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Baltymų koncentracijai apskaičiuoti naudota kalibracinė kreivė pagal albuminą (žr. 2.2 pav.).

Į mėgintuvėlius įpilta po 3 ml 0,1 M kalio fosfato buferinio tirpalo, 0,6 ml 0,5 mM askorbo rūgšties, 0,06 ml 0,1 mM EDTA, 0,2 paruošto mėginio ir 2,08 ml distiliuoto vandens. Prieš matuojant šviesos sugertį, įpilta 0,06 ml 0,1 mM vandenilio peroksido. Šviesos sugertis matuota 290 nm bangos ilgyje [22]. Askorbatperoksidazės aktyvumui nustatyti naudotas šviesos sugerties, matuotos iškart prasidėjus reakcijai ( pridėjus vandenilio peroksido) ir po reakcijos pradžios praėjus 40 minučių, skirtumas. Mėgintuvėliai šias 40 minučių buvo laikomi 30 °C temperatūroje.

Askorbatperoksidazės aktyvumas apskaičiuotas pagal formulę (2.4):

$$A = \frac{\Delta S_{290nm} \times (V_{m\acute{e}g.} + V_{buf.} + V_{peroks.})}{k \times m} \quad (2.4).$$

Čia:

A – askorbatperoksidazės aktyvumas, mmol/mg;

$\Delta S_{290nm}$  – šviesos sugerties 290 nm bangos ilgyje skirtumas;

$V_{m\acute{e}g.}$  – mėginio tūris, ml;

$V_{buf.}$  – buferinio tirpalo tūris, ml;

$V_{peroks.}$  – vandenilio peroksido tūris, ml;

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

m – baltymo masė mėginio tūryje, mg (apskaičiuota naudojantis kalibracine kreive pagal albuminą (žr. 2.2 pav.).

#### 2.5. Malondialdehido koncentracijos nustatymas

Po 100 mg kiekvienos tiriamos žaliavos homogenizuota su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi. Homogenizatas maišytas 10 minučių kratytuve 25 °C temperatūroje ir tuomet 10 minučių centrifuguotas 9000 aps./min greičiu 4 °C temperatūroje. Surinktas supernatantas. Po 0,3 ml supernatanto sumaišyta su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi ir inkubuota 95 °C temperatūroje 30

minučių. Mėginiai atšaldyti ir 15 minučių centrifuguoti 9000 aps./min greičiu. Absorbcija išmatuota 532 nm bei 600 nm bangos ilgiuose [50].

MDA koncentracija ( $C_{MDA}$ ,  $\mu\text{mol/g}$ ), apskaičiuota naudojantis formule (2.5):

$$C_{MDA} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times V \times 2}{k \times m \times V_t} \quad (2.5).$$

Čia:

A – tirpalo šviesos sugertis (532, 600 – atitinkamame bangos ilgyje, nm);

V – ekstrakto tūris, ml;

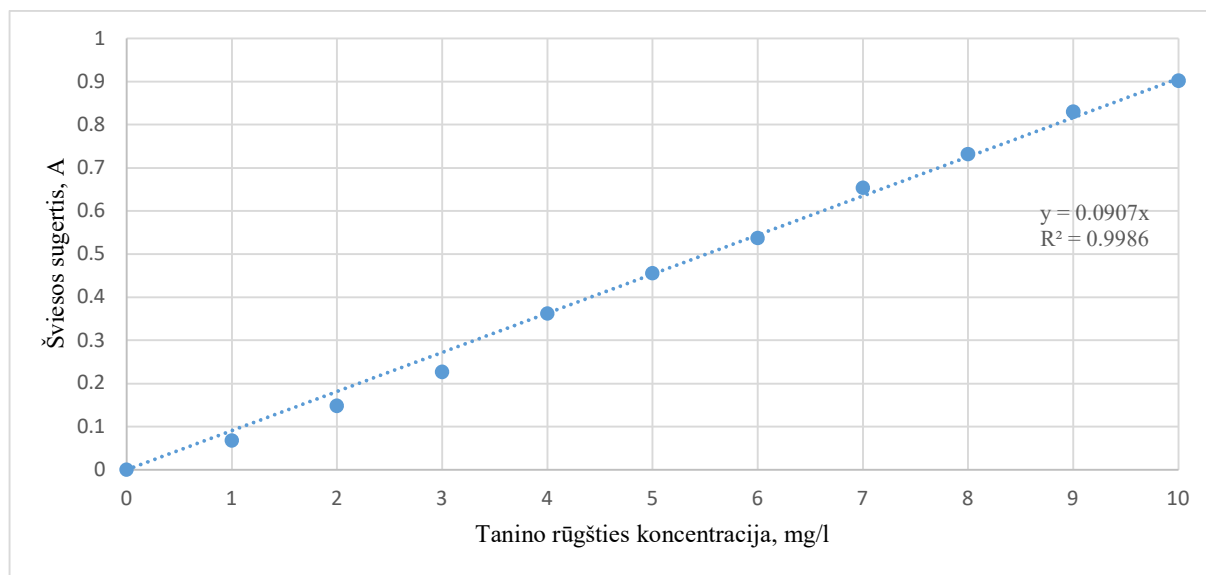
$V_t$  – ekstrakto tūris tyrimui, ml;

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

m – žaliavos masė, g

## 2.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Paruošta tanino rūgšties kalibracinė kreivė (žr. 2.3 pav.). 25 ml distiliuoto vandens ištirpinta 25 mg tanino rūgšties. Gautas 0,1 mg/ml tanino rūgšties standartinis tirpalas. Paimta 20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 60  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  ir 120  $\mu\text{l}$  standartinio tanino rūgšties tirpalo į atskirus mėgintuvėlius. Į juos pripilta distiliuoto vandens, kad mėgintuvėliuose būtų po 500  $\mu\text{l}$  tirpalo. Į šiuos tirpalus pridėta po 250  $\mu\text{l}$  Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo; tai atitinka šias koncentracijas: 1 mg/l; 2 mg/l; 3 mg/l; 4 mg/l; 5 mg/l; 6 mg/l. Sumaišyta ir inkubuota tamsoje kambario temperatūroje 40 minučių. Praėjus inkubacijos laikui, matuota šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje.



2.3 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

*Eiga.* Po 0,05 g tiriamųjų žaliavų įberta į 10 ml 70 % acetono tirpalą ir maišyta kratytuve 20 minučių kambario temperatūroje. Tada šie mėginiai centrifuguoti 10 minučių 9000 aps./min greičiu 4 °C temperatūroje. Supernatantai surinkti į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius ir centrifuguoti 2 minutes. Supernatantai surinkti ir naudoti tyrimams.

Paimta po 30 µl paruoštų ekstraktų ir praskiesta vandeniu iki 500 µl. Į šiuos praskiestus tirpalus įpilta po 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo, sumaišyta. Tirpalai 40 minučių laikyti tamsoje. Matuota šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje. Apskaičiuota bendroji fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (mg/100 g) pagal formulę (2.6):

$$C_f = t \times V \times \frac{100}{m} \quad (2.6).$$

Čia:

$c_f$  – bendroji fenolinių junginių koncentracija, mg/100 g;

$t$  – tanino rūgšties koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/l;

$V$  – pradinis ekstrakto tūris, l;

$m$  – tiriamos žaliavos masė, g.

Folino-Kiokalto reagentas yra dviejų rūgščių mišinys, kuris reaguoja su fenoliais, sudarydamas chromogenus. Šiuos susidariusius chromogenus galima nustatyti spektrofotometriškai, nes susidarę šarminėmis sąlygomis redokso reakcijų metu, jie įgauna mėlyną spalvą, kurios intensyvumas yra proporcingas polifenolių koncentracijai [51].

## 2.7. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas

*Eiga.* Arnovo reagentas pagamintas 10 g natrio molibdato ir 10 g natrio nitrito sumaišius su 100 ml metanolio.

Po 0,1 g kiekvienos išdžiovintos smulkintos tiriamos žaliavos homogenizuota sumaišius su 2,5 ml distiliuoto vandens 25 °C temperatūros termostatuojame kratytuve 30 minučių. Centrifuguota 9000 aps./min greičiu 10 minučių. Po centrifugavimo 1 ml ekstrakto praskiesta distiliuotu vandeniu iki 5 ml tūrio. 1 ml ekstrakto sumaišyta su 5 ml distiliuoto vandens, 1 ml HCl, 1 ml Arnovo reagento, 1 ml NaOH ir praskiesta iki 10 ml distiliuotu vandeniu. Tuščio bandinio paruošimas: 6 ml distiliuoto vandens sumaišyta su 1 ml HCl, 1 ml Arnovo reagento, 1 ml NaOH ir praskiesta iki 10 ml distiliuotu vandeniu. Šviesos sugertis matuota 490 nm bangos ilgyje [52].

Fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį (%) apskaičiuota naudojantis formule (2.7):

$$C, \% = \frac{A \times 1,7544}{m} \quad (2.7).$$

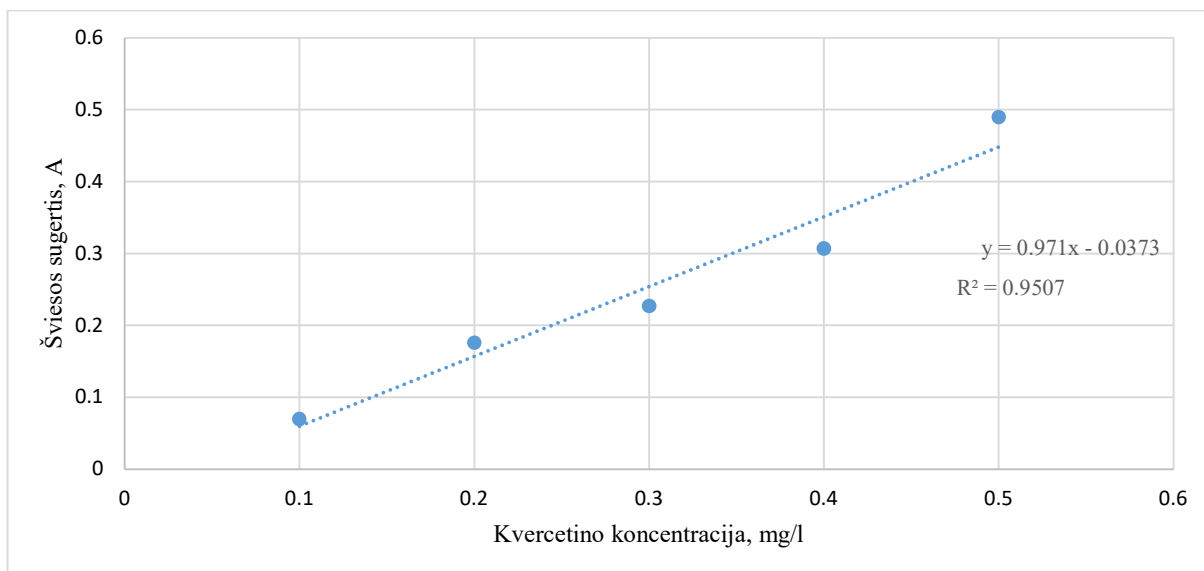
Čia:

$A$  – šviesos sugertis,;

$m$  – tiriamos žaliavos masė, g [53].

## 2.8. Flavonoidų koncentracijos nustatymas

Paruošta kvercetino kalibracinė kreivė (žr. 2.4 pav.). 6 mg kvercetino ištirpinti 6 ml vandens, gautas 1 mg/ml koncentracijos pradinis tirpalas. Paruošti 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l ir 5 mg/l koncentracijos kvercetino tirpalai: į mėgintuvėlius įpilta po 0,01 ml, 0,02 ml, 0,03 ml, 0,04 ml ir 0,05 ml pradinio tirpalo, tada po 0,15 ml aliuminio chlorido tirpalo ir skiesta iki 10 ml tūrio su metanolio.



**2.4 pav.** Kvercetino kalibracinė kreivė flavonoidų koncentracijai nustatyti

*Eiga.* Po 0,5 g kiekvienos išdžiovintos susmulkintos tiriamos žaliavos sumaišyta su 5 ml 80 % metanolio, laikyta kratytuve vieną parą. Praėjus parai mišiniai 10 minučių centrifuguoti 9000 aps./min greičiu. Supernatantas surinktas ir naudotas tyrimams.

Į kiekvieną 0,1 ml tūrio tiriamąjį mėginį įpilta iki 0,9 ml 80 % metanolio ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliktas stovėti 30 min ir sugertis išmatuota 415 nm bangos ilgyje.

Flavonoidų koncentracija apskaičiuota pagal kvercetiną mg/g sausos masės, naudojant formulę (2.8):

$$C = \frac{C_1 \times V}{g} \quad (2.8).$$

Čia:

$C_1$  – kvercetino koncentracija pagal kalibracinę kreivę, mg/ml;

$V$  – pradinis ekstrakto tūris, ml;

$g$  – žaliavos masė, g

Bendra flavonoidų koncentracija augaluose gali būti nustatoma spektrofotometriškai. Vienas iš plačiausiai naudojamų nustatymo augalų ekstraktuose metodų yra naudojant aliuminio chloridą, kuriame aliuminis yra trivalentis (Al(III)). Metodus yra pagrįstas Al(III)-flavonoidų chelatų susidarymu, nes dėl okso ir hidroksilo grupių flavonoidai suriša metalų jonus [54].

## 2.9. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas

*Eiga.* Pasverta po 0,2 g kiekvienos tiriamos žaliavos ir įpilta po 5 ml 50 %  $C_2H_5OH$ . Mišinys homogenizuotas 15 minučių 25 °C temperatūroje. Tada šis mišinys centrifuguotas 10 minučių 9000 aps./min greičiu. Supernatantas naudotas tyrimams. Po 1 ml kiekvieno ekstrakto įpilta į 980 µl KCl buferinio tirpalo, kurio pH 1 ir į 980 µl NaOAc buferinio tirpalo, kurio pH 4,5. Visų tirpalų šviesos sugertis matuota 510 nm ir 700 nm bangos ilgiuose. Tuščias mėginys – 50 %  $C_2H_5OH$ .

Bendroji antocianinų koncentracija (BAK, miligramai cianidin-3-gliukozido ekvivalento 100 g) apskaičiuota naudojantis formule (2.9) [5]:

$$BAK=(A \times M \times 25) \times \frac{1000}{26900} \quad (2.9).$$

Čia:

A – absorbcija = (A<sub>510 nm</sub>-A<sub>700 nm</sub>) pH 1-(A<sub>510 nm</sub>-A<sub>700 nm</sub>) pH 4,5;

M – molekulinė masė (449,2 g/mol);

25 – praskiedimo faktorius;

26900 – cianidin-3-gliukozido molinis adsorbcijos koeficientas, l/mol × cm.

## 2.10. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos nustatymas

Pasverta po 0,5 g kiekvienos susmulkintos išdžiovintos augalinės žaliavos. Į ją pridėta po 20 ml 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, tada sumaišyta ir centrifuguota 9000 aps./min greičiu 10 minučių. Supernatantų šviesos sugerties matavimai atlikti 662 nm (chlorofilui *a* nustatyti), 644 nm (chlorofilui *b* nustatyti) ir 441 nm (karotinoidams nustatyti) bangos ilgiuose. Šiuose bangos ilgiuose atitinkamai stebimas sugerties maksimumas.

Pigmentų koncentracija apskaičiuota pagal formules:

Chlorofilo *a* koncentracija, mg/l (2.10):

$$Ca=9,784 \times A_{662} - 0,99 \times A_{644} \quad (2.10);$$

Chlorofilo *b* koncentracija, mg/l (2.11):

$$Cb=21,426 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662} \quad (2.11);$$

Karotinoidų koncentracija, mg/l (2.12):

$$Ckarotinoidai=4,695 \times A_{441} - 0,268 \times (5,134 \times A_{662} + 20,436 \times A_{644}) \quad (2.12);$$

Čia:

A<sub>662</sub>, A<sub>644</sub> – sugerties 662 arba 644 nm bangos ilgyje reikšmės, gautos tyrimų metu.

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuota pagal formulę (2.13):

$$X = \frac{C \times V \times V_2 \times 100}{m \times V_1 \times 1000} \quad (2.13).$$

Čia:

C – pigmentų koncentracija mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris;

V<sub>1</sub> – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V<sub>2</sub> – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

m – augalinės žaliavos masė, g [55].

## 2.11. Baltymų koncentracijos nustatymas

Pasverta po 0,05 g kiekvienos tiriamos medžiagos. Kad ekstrahuotūsi tirpūs baltymai, kiekviena žaliava užpilta po 1 ml 0,1 M glicino-HCl tirpalo (pH 2,6), 0,1 M natrio acetato tirpalo (pH 4), Tris-HCl (pH 8), ir maišyta vieną valandą, tada 20 minučių centrifuguota 9000 aps./min greičiu 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo į 200 μl kiekvieno gauto supernatanto pridėta po 2 ml Bradfordo reagento. Praėjus 2 minutėms matuota šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje.

Bendroji baltymų koncentracija, mg/100 g apskaičiuota naudojantis formule (2.14):

$$C = \frac{a \times V \times 100}{m} \quad (2.14).$$

Čia:

a – baltymo koncentracija (nustatyta naudojantis kalibracine kreive (žr. 2.2 pav.)), mg/ml;

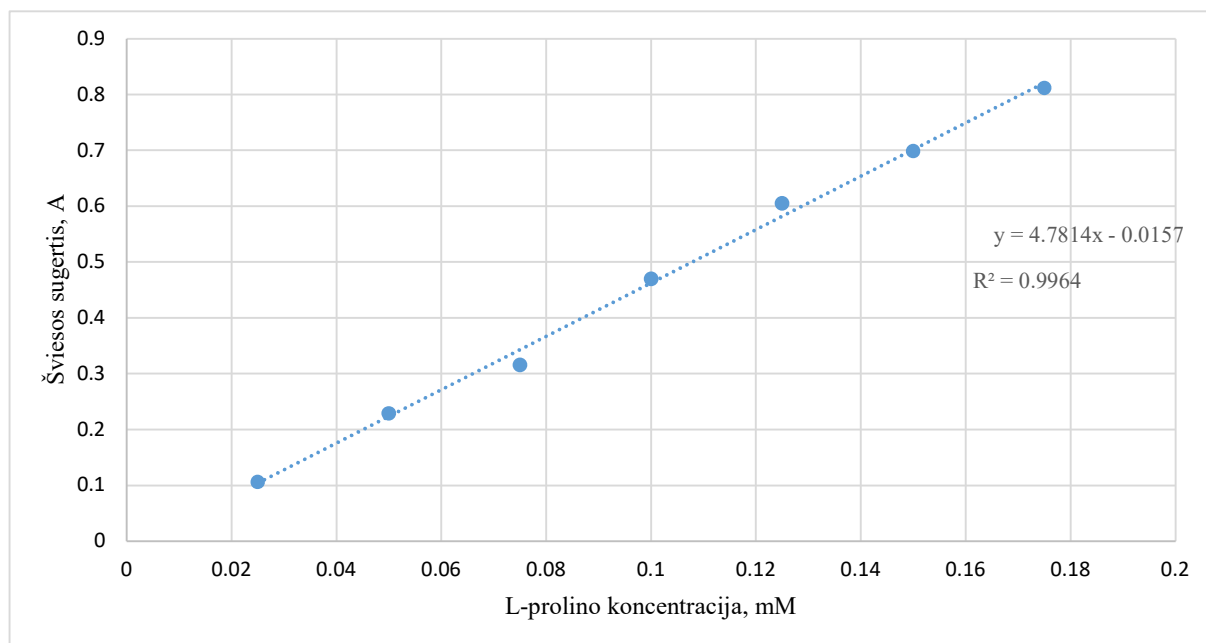
V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

m – tiriamos žaliavos masė, mg.

Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu yra pagrįstas reagentu esančių dažų spalvos pasikeitimu, priklausomai nuo baltymų koncentracijos, kuo didesnė baltymų koncentracija, tuo intensyvesnė mėlyna spalva yra stebima.

## 2.12. L-prolino koncentracijos nustatymas

Parengta L-prolino kalibracinė kreivė (žr. 2.5 pav). Pasverta 0,0011 g L-prolino ir jis ištirpintas 10 ml tūryje distiliuoto vandens, gautas 1 mM koncentracijos pradinis tirpalas. Ruošti 0,025 mM, 0,05 mM, 0,075 mM, 0,1 mM, 0,125 mM, 0,15 mM ir 0,175 mM koncentracijos tirpalai. Paimta po 0,025 ml, 0,05 ml, 0,075 ml, 0,1 ml, 0,125 ml, 0,15 ml ir 0,175 ml pradinio tirpalo atitinkamai ruošiamai koncentracijai ir skiesta iki 1 ml su distiliuotu vandeniu, įpilta po 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento. Mėgintuvėliai kaitinti 1 valandą 95 °C vandens vonelėje ir atšaldžius matuota tirpalų sugertis 520 nm bangos ilgyje.



2.5 pav. L-prolino kalibracinė kreivė

*Eiga.* Po 100 mg kiekvienos tiriamos augalinės žaliavos užpilta 4 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėliai su tiriamomis žaliavomis 3 minutes kaitinti 95 °C temperatūroje ir atvėsinti. Procedūra pakartota dar du kartus. Mėgintuvėliai centrifuguoti 9000 aps./min greičiu 10 minučių. Supernatantai nupilti į naujus mėgintuvėlius ir praskiesti iki 6 ml su distiliuotu vandeniu. Vėl į naujus mėgintuvėlius įpilta po 1 ml skiesto supernatanto (ekstrakto), 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir kaitinta 1 valandą vandens vonelėje. Į „tuščią“ mėginį vietoje ekstrakto įpilta 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis matuota 520 nm bangos ilgyje.

Prolino koncentracija apskaičiuota pagal formulę (2.15):

$$C_{\text{prolino}} = \frac{A \times k \times V_{\text{bendras}}}{V \times m} \quad (2.15).$$

Čia:

$C_{\text{prolino}}$  – prolino koncentracija,  $\mu\text{mol/g}$ ;

$A$  – tirpalo šviesos sugertis, sugerties vienetai;

$k$  – L-prolino kiekis, gautas pagal kalibracinę kreivę,  $\mu\text{mol}$ ;

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

$V$  – paimto ekstrakto tūris, ml;

$m$  – tiriamos žaliavos kiekis, g.

Šis metodas pagrįstas tuo, kad esant labai žemam pH ir aukštai temperatūrai iš prolino ir ninhidrino susidaro raudonas reakcijos produktas, kai tuo tarpu reakcijų su kitomis aminorūgštimis metu nesidaro spalvotas reakcijos produktas arba jis būna blankios (neryškios) spalvos [56].

### 2.13. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo nustatymas

Kietos mitybinės terpės sudėtis:

natrio chloridas 10 g/L;

triptonas 10,0 g/L;

mielių ekstraktas 5,0 g/L;

mikro agaras 10 g/L.

*Eiga.* Paruošta terpė LB bakterijoms. Terpės pH=7. Terpė supilstyta į Petri lėkšteles ir palaukta, kol sustings. Ant kiekvienos terpės Petri lėkštelėse užpilta po 50  $\mu\text{l}$  *E. coli* bakterijų suspensijos. Ant kiekvienos terpės su užpilta bakterijų suspensija padėta po 6 popierinius diskelius. Ant kiekvienos Petri lėkštelės tirtas skirtingo jonažolės ekstrakto antibakterinis poveikis, taip pat tirtas antibiotiko ciprofloksacino 25  $\mu\text{g/ml}$  koncentracijos ekstrakto antibakterinis poveikis. Ant kiekvieno popierinio diskelio lašinta po 25  $\mu\text{l}$  tiriamojo ekstrakto. Petri lėkštelės sudėtos į 37 °C temperatūros inkubatorių 24 valandoms ir atlikta rezultatų analizė.

### 2.14. Titano oksido nanodalelių sintezė ir analizė

Darbo metu atlika žalioji titano nanodalelių sintezė: 5 gramų išdžiovintos ir susmulkintos *in vivo* augintos jonažolės žaliavos buvo sumaišyta su 50 ml distiliuoto vandens ir inkubuota 48 valandas kratytuve, palaikant 25 °C temperatūrą. Tuomet mišinys buvo nufiltruotas ir centrifuguotas 10 minučių 9000 aps./min greičiu. Supernatantas sumaišytas su 3,84 ml titano izopropoksido tirpalo [36]. Nuosėdoms nusėdus, buvo nupilta ir analizuota viršutinė tirpalo frakcija.

Buvo užrašytas tirpalo UV spektras. Mokslinėje literatūroje aprašyti tyrimai rodo, kad didžiausia absorbcija 300–350 nm bangos ilgiuose atsiranda dėl žaliosios sintezuotės būdu gautų titano oksido nanodalelių [36].

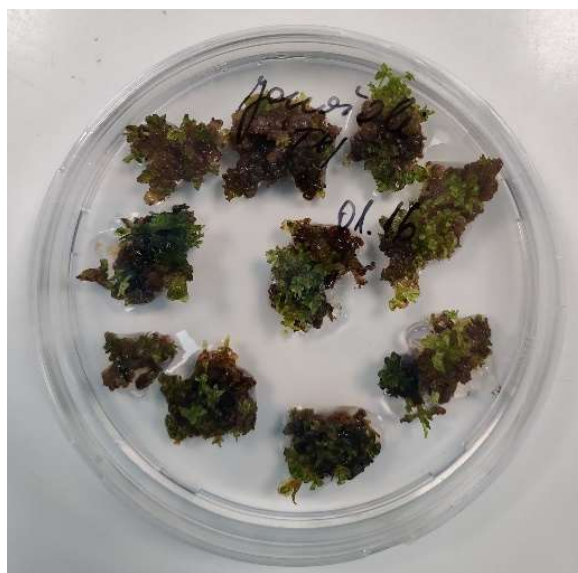
### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Paprastosios jonažolės kaliaus kultūrų *in vitro* formavimasis

Paprastosios jonažolės kaliaus kultūros kultivuotos Petri lėkštelėse. Sudygosios jonažolės sėklos (žr. 3.1 pav.) turi išsivysčiusias šaknis, stiebelius ir lapelius. Eksplantai buvo perkelti į naują terpę, kur susiformavo kaliaus kultūros *in vitro* (žr. 3.2 pav.).



3.1 pav. Sudygosios paprastosios jonažolės sėklos



3.2 pav. Susiformavusios paprastosios jonažolės kaliaus kultūros

### 3.2. Jonažolės *in vivo* ir *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

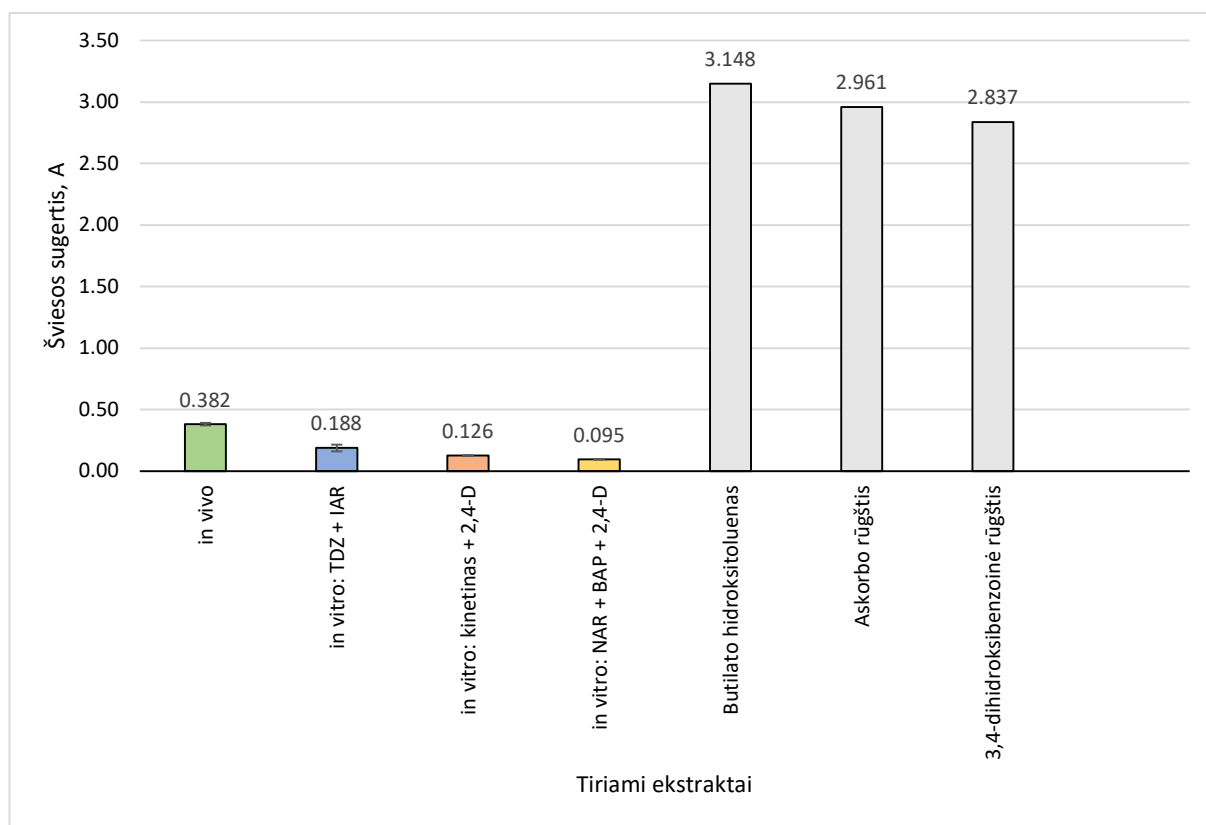
#### 3.2.1. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas

Šiame tyrime didesnė šviesos sugertis reiškia didesnes redukcines savybes (žr. 3.3 pav.). *In vivo* augusios jonažolės ekstrakto išmatuota šviesos sugertis buvo 0,382 A. *In vitro* MS su 0,5 mg/l TDZ ir 0,1 mg/l IAR terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 0,188 A, *in vitro* MS terpėje su kinetinu (0,11 µM) ir 0,9 µM 2,4-D augusių kaliaus kultūrų – 0,126 A, o *in vitro* MS terpėje su 0,1 mg/l NAR ir 0,2 mg/l BAP bei 0,5 mg/l 2,4-D augusių kaliaus kultūrų – 0,095 A.

Lyginant MS terpėse su skirtingais augalų augimo hormonais kultivuotų kultūrų rezultatus, matoma, kad MS su TDZ ir IAR augalų augimo hormonais terpė buvo optimali.

Taip pat buvo atliktas šių junginių: butilato hidroksitolueno, askorbo rūgšties, 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties antioksidacinio aktyvumo matavimas (žr. 3.4 pav.). Butilato hidroksitolueno šviesos sugertis buvo 3,148 A, askorbo rūgšties – 2,961 A, 3,4-dihidroksibenzoinės rūgšties – 2,837 A.

Lyginant su tuo pačiu metodu atliktu skirtingose terpėse augintų jonažolių kaliaus kultūrų ekstraktų antioksidaciniu aktyvumu matoma, kad šie cheminiai junginiai yra kur kas stipresni antioksidantai. Taigi, siekiant vietoje cheminių antioksidantų naudoti natūralius, išgaunamus iš jonažolės kaliaus kultūrų, svarbu atrasti tinkamas augalų augimo hormonų kombinacijas ir koncentracijas.

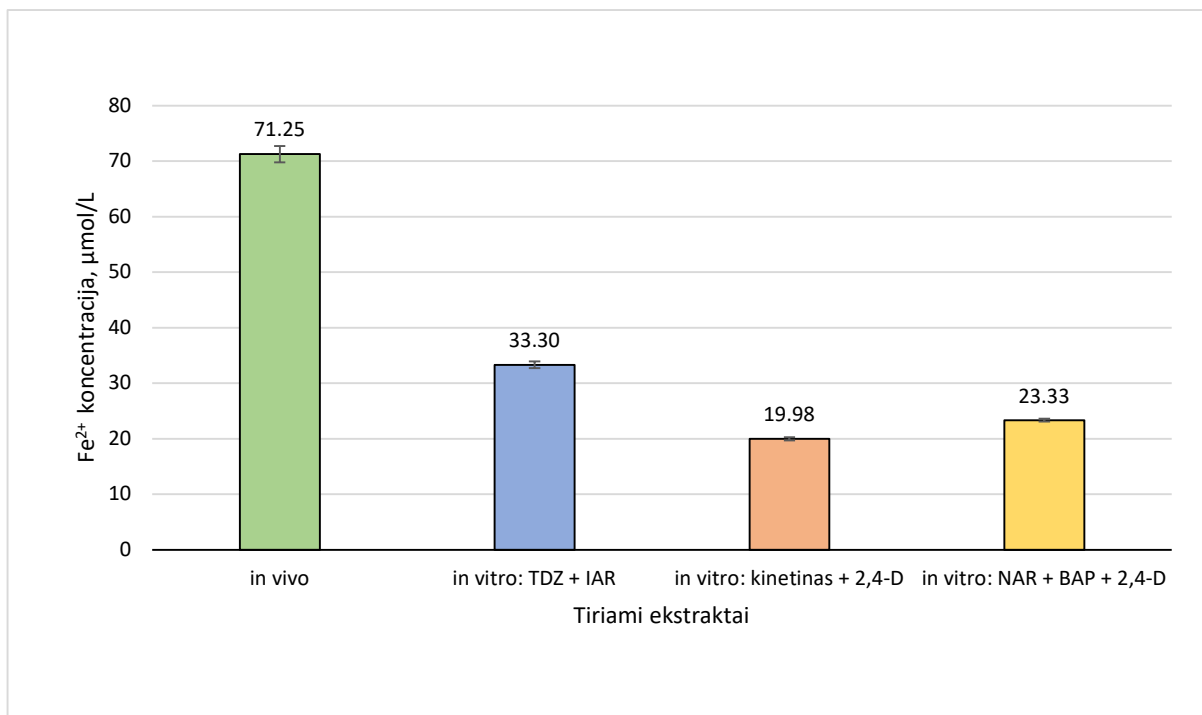


**3.3 pav.** Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinių (redukcinių) savybių įvertinimas

### 3.2.2. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą

Vertinant antioksidacinį aktyvumą, matuotą FRAP metodu (žr. 3.4 pav.), matoma, kad didžiausiu antioksidaciniu pasižymėjo *in vivo* augusios jonažolės ekstraktas. Joje nustatyta geležies jonų koncentracija buvo 71,25  $\mu\text{mol/l}$ . MS su TDZ ir IAR terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakte – 33,30  $\mu\text{mol/l}$ , MS terpėje su NAR ir BAP bei 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakte – 23,33  $\mu\text{mol/l}$  ir MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D – 19,98  $\mu\text{mol/l}$ .

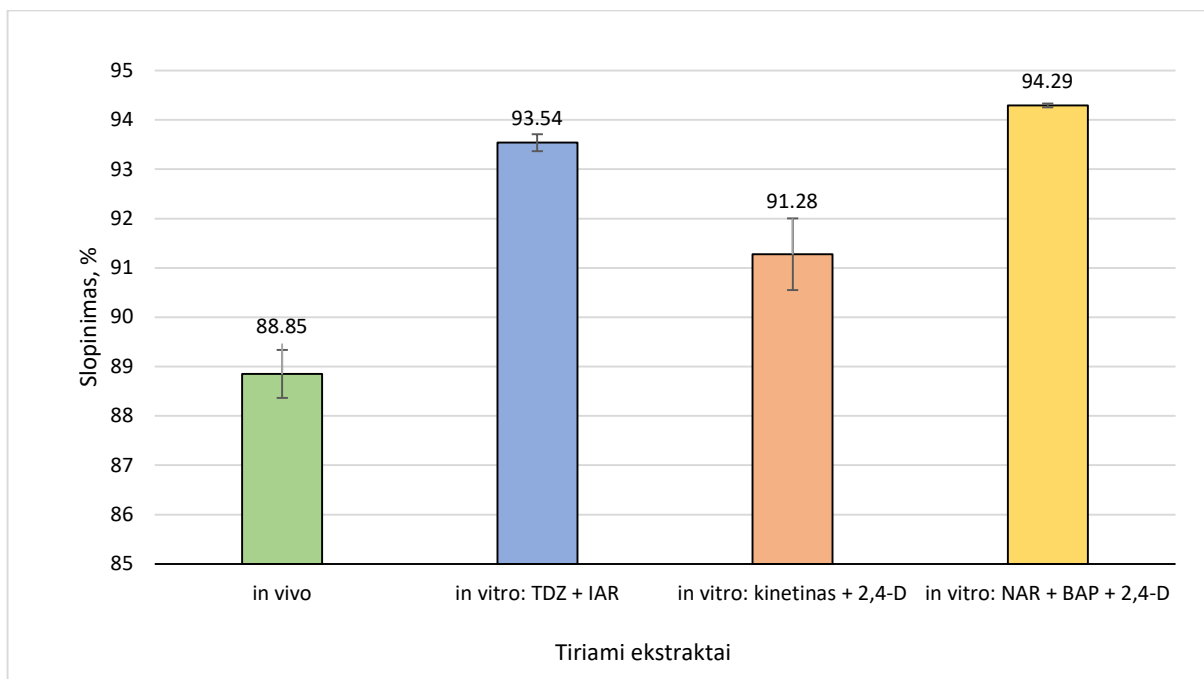
Pagal antioksidacinio aktyvumo FRAP metodu rezultatus matoma, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo *in vivo* augusios jonažolės ekstraktas. Iš visų tirtų *in vitro* terpių su augalų augimo hormonais, MS terpėje su TDZ ir IAR augusios kaliaus kultūros pasižymėjo didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu, galima teigti, jog TDZ ir IAR yra naudingiausi augalų augimo hormonai antioksidaciniam aktyvumui pasireikšti.



3.4 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą

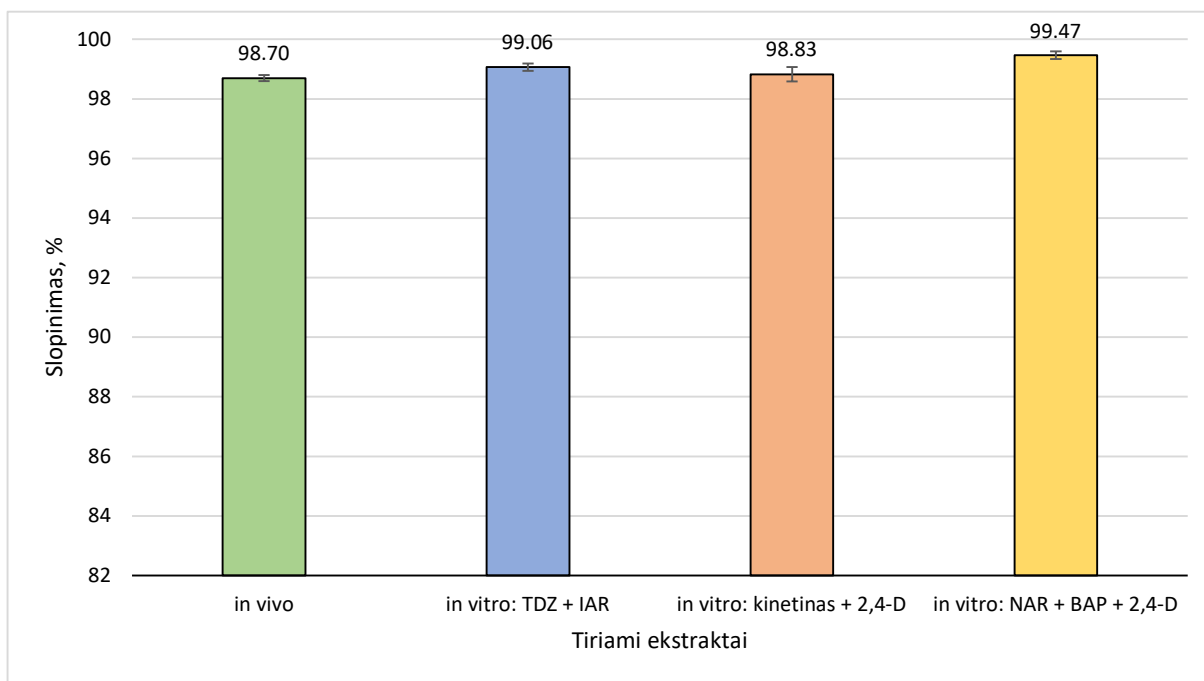
### 3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

DPPH metodu atlikto antioksidacinio aktyvumo matavimo rezultatai (žr. 3.5 pav.) rodo, kad didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo jonažolės kaliaus kultūrų, augusių MS su NAR ir BAP bei 2,4-D terpėje ekstraktas ir MS terpėje su TDZ ir IAR augusių jonažolės kaliaus kultūrų ekstraktas – nustatytas DPPH slopinimas šiuose ekstraktuose skyrėsi labai nežymiai ir atitinkamai buvo 94,29 % ir 93,54 %. Mažesnis antioksidacinis aktyvumas nustatytas MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakte – išmatuotas DPPH slopinimas buvo 91,28 %, o mažiausias – *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – 88,85 %.



**3.5 pav.** Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal DPPH metodą

### 3.2.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

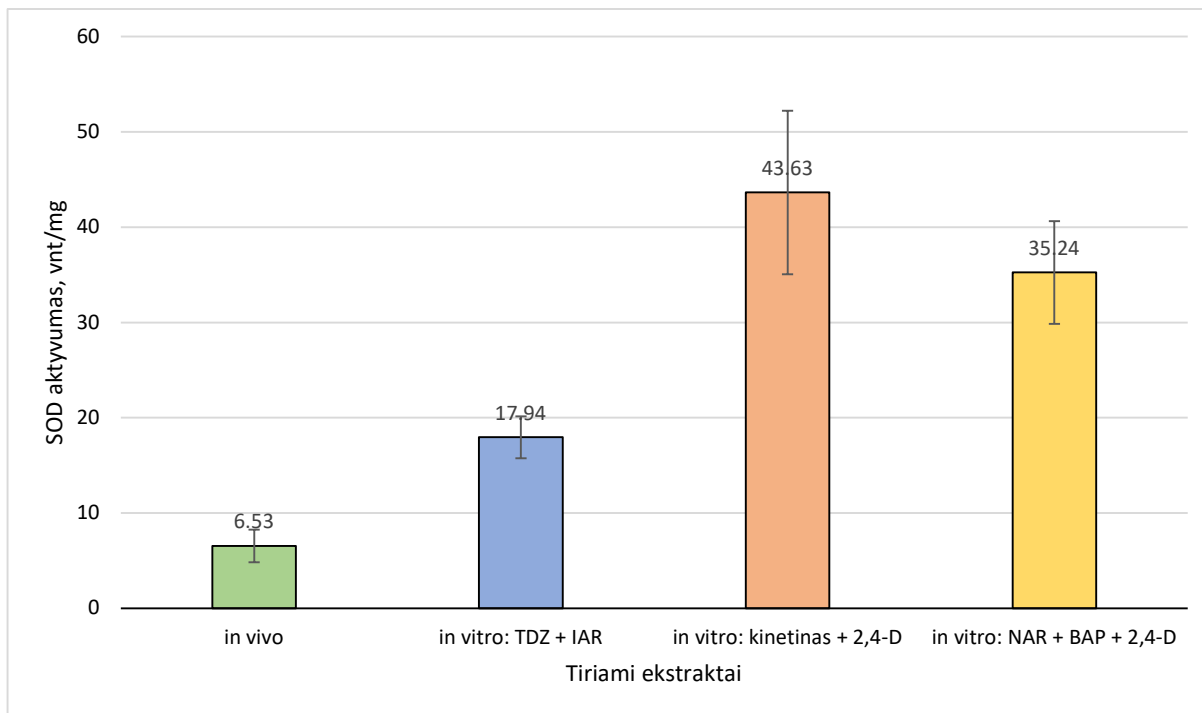


**3.6 pav.** Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal ABTS metodą

ABTS metodu atliktos analizės parodė labai tolygius ir neišsiskiriančius antioksidacinio aktyvumo rezultatus visuose tiriuose ekstraktuose (žr. 3.6 pav.): MS su NAR ir BAP bei 2,4-D terpėje augintos jonažolės ekstrakto nustatytas slopinimas buvo 99,47 %, MS su TDZ ir IAR terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 99,06 %, MS terpėje su kinetinu ir 2.4-D augusių kaliaus kultūrų – 98,93 %, o *in vivo* augusios jonažolės – 98,70 %.

### 3.3. Antioksidacinių fermentų aktyvumo įvertinimas

#### 3.3.1. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

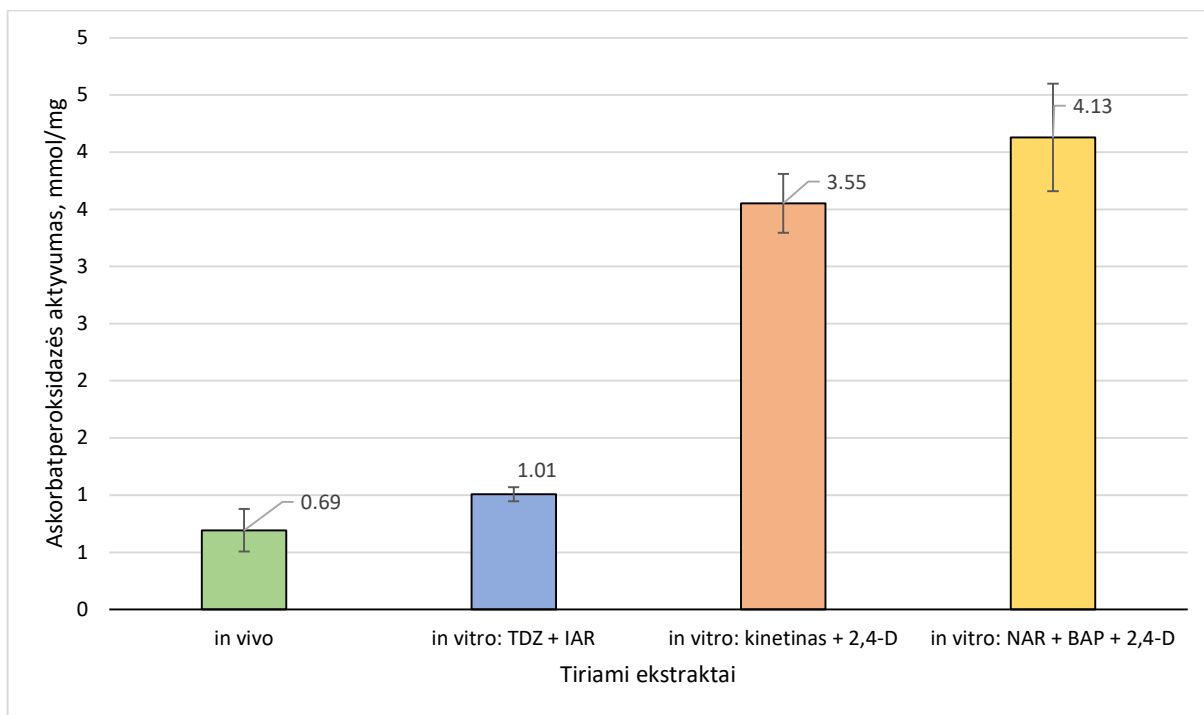


3.7 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Superoksido dismutazės fermento aktyvumas buvo didesnis *in vitro* augusių kaliaus kultūrų nei *in vivo* augusios jonažolės (žr. 3.7 pav.). Didžiausias SOD aktyvumas nustatytas jonažolės kaliaus kultūrų *in vitro*, augusių MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D, ekstrakto. Aktyvumas buvo 43,63 vnt./mg. MS terpėje su NAR, BAP ir 2,4-D – 35,24 vnt./mg, MS terpėje su TDZ ir IAR – 17,94 vnt./mg, o *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – 6,53 vnt./mg.

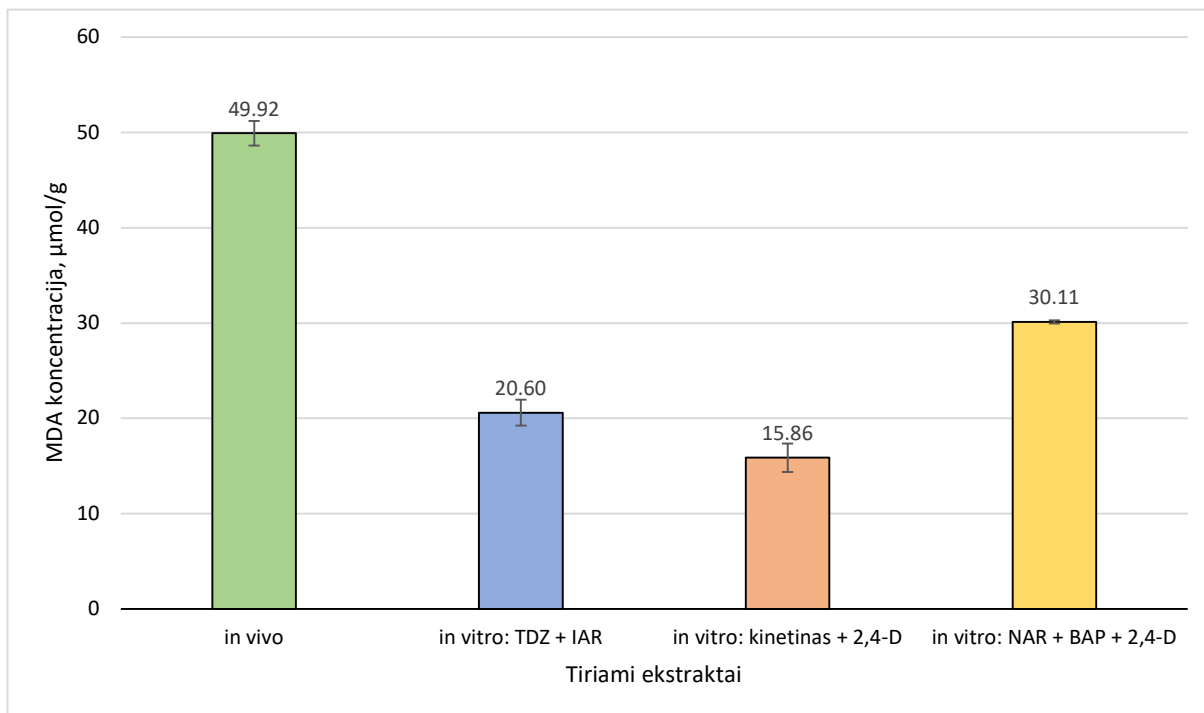
#### 3.3.2. Fermento askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

Didžiausias fermento askorbatperoksidazės aktyvumas nustatytas (žr. 3.8 pav.) jonažolės kaliaus kultūrų *in vitro*, augusių MS terpėje su NAR, BAP ir 2,4-D, ekstrakto. Aktyvumas buvo 4,13 mmol/mg. MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto aktyvumas buvo 3,55 mmol/mg. MS terpėje su TDZ ir IAR augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 1,01 mmol/mg. Mažiausias šio fermento aktyvumas, kaip ir SOD atveju, nustatytas *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – jis buvo tik 0,69 mmol/mg.



**3.8 pav.** Fermento askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

#### 3.4. Malondialdehido koncentracijos įvertinimas



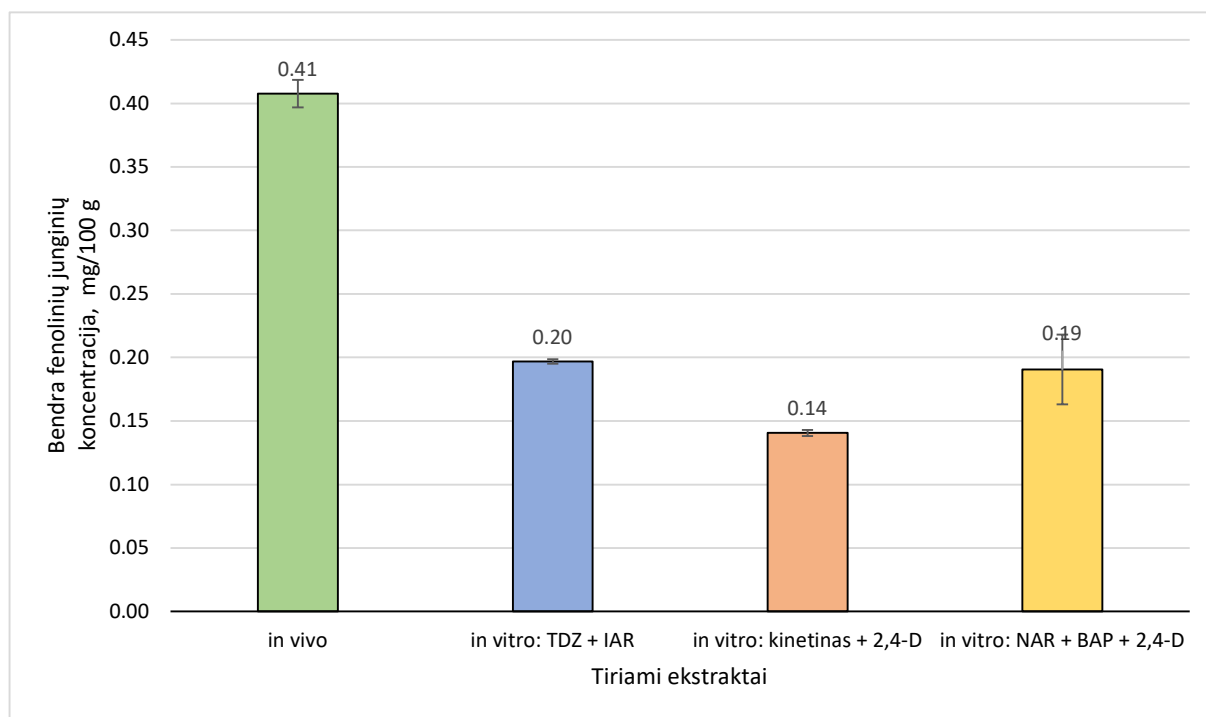
**3.9 pav.** Malondialdehido koncentracijos įvertinimas

Didžiausia malondialdehido koncentracija (žr. 3.9 pav.) buvo nustatyta *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – 49,92 μmol/g. Tai gali reikšti, kad augalas patyrė oksidacinio streso vystymosi ar augimo laikotarpį. MS terpėje su NAR, BAP ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto MDA koncentracija

buvo 30,11  $\mu\text{mol/g}$ , MS su TDZ ir IAR terpėje – 20,60  $\mu\text{mol/g}$ , o MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D – 15,86  $\mu\text{mol/g}$ .

### 3.5. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Pateikti bendrosios fenolinių junginių koncentracijos matavimo Folino-Kiokalto metodu rezultatai (žr. 3.10 pav.). Didžiausia fenolinių junginių koncentracija nustatyta *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – 0,41 mg/100 g. MS terpėje su TDZ ir IAR augusių kaliaus kultūrų ekstrakto koncentracija buvo 0,20 mg/100 g. Nežymiai skyrėsi MS su NAR ir BAP bei 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto rezultatai – čia nustatyta bendra fenolinių junginių koncentracija siekė 0,19 mg/100 g. Mažiausia bendroji fenolinių junginių koncentracija nustatyta MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 0,14 mg/100 g.



3.10 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

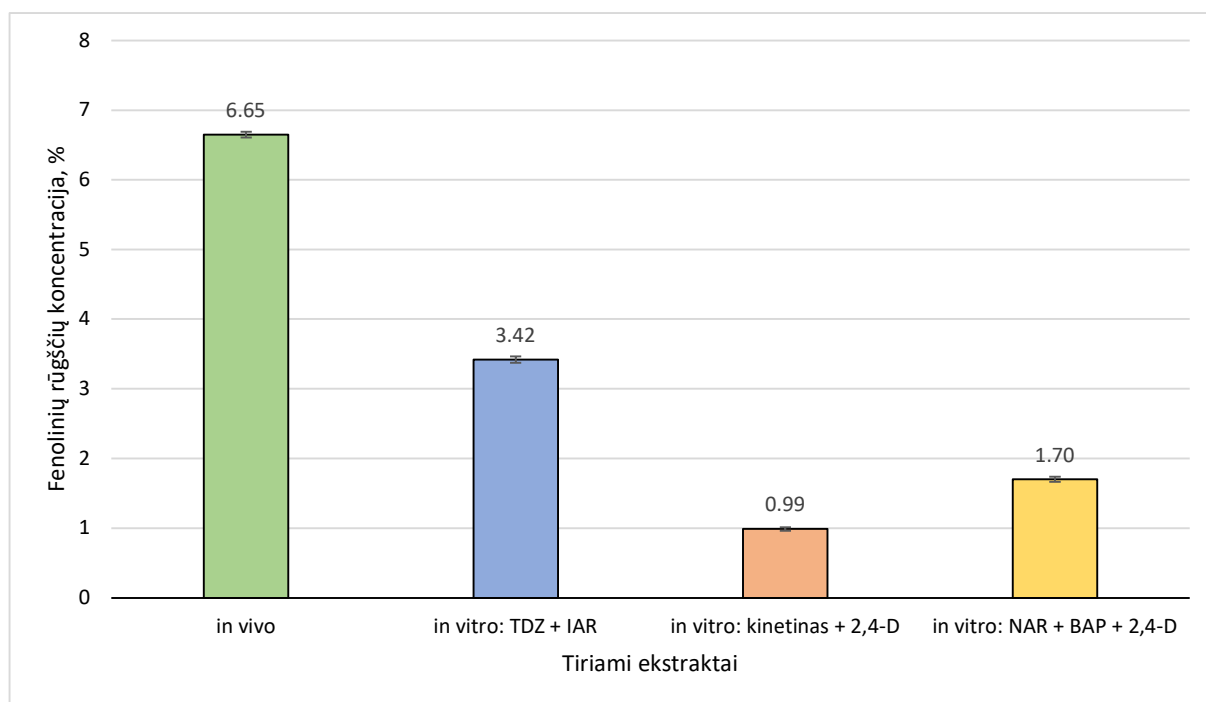
Rezultatai rodo, kad daugiausiai fenolinių junginių sukaupė *in vivo* augusi jonažolė. Tačiau lyginant *in vitro* terpes, fenolinių junginių sintezės aktyvavimui ir šių junginių kaupimuisi palankiausios buvo dvi tirtos MS terpės: su TDZ bei IAR ir su NAR, BAP bei 2,4-D.

### 3.6. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas

Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymo rezultatai (žr. 3.11 pav.) parodė, kad didžiausia koncentracija buvo *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – 6,65 %. MS su TDZ ir IAR terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto šių rūgščių koncentracija siekė 3,42 %, MS su NAR, BAP ir 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 1,70 %, MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 0,99 %.

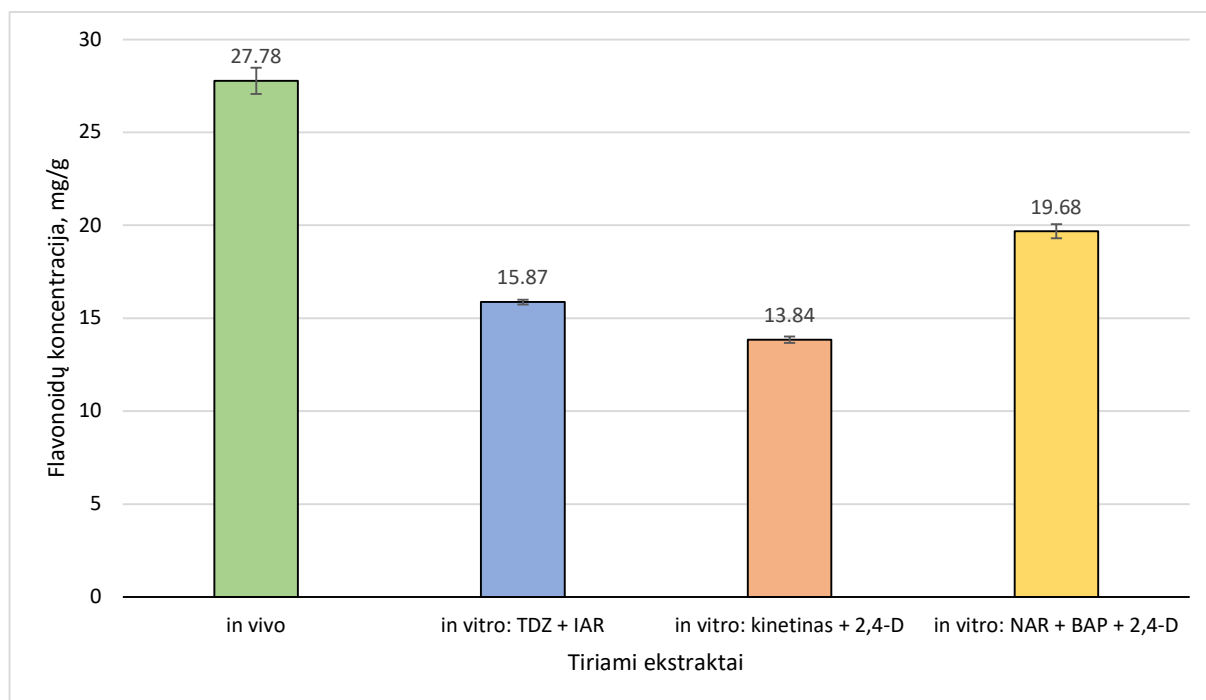
Didžiausia bendroji fenolinių rūgščių koncentracija nustatyta *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto. Kaip ir fenolinių junginių atveju (žr. 3.11 pav.), iš visų tirtų *in vitro* kultivavimo terpių, fenolinių

rūgščių sintezei ir kaupimuisi palankiausia *in vitro* MS terpė buvo su TDZ ir IAR augalų augimo hormonais (žr. 3.11 pav.).



**3.11 pav.** Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas

### 3.7. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

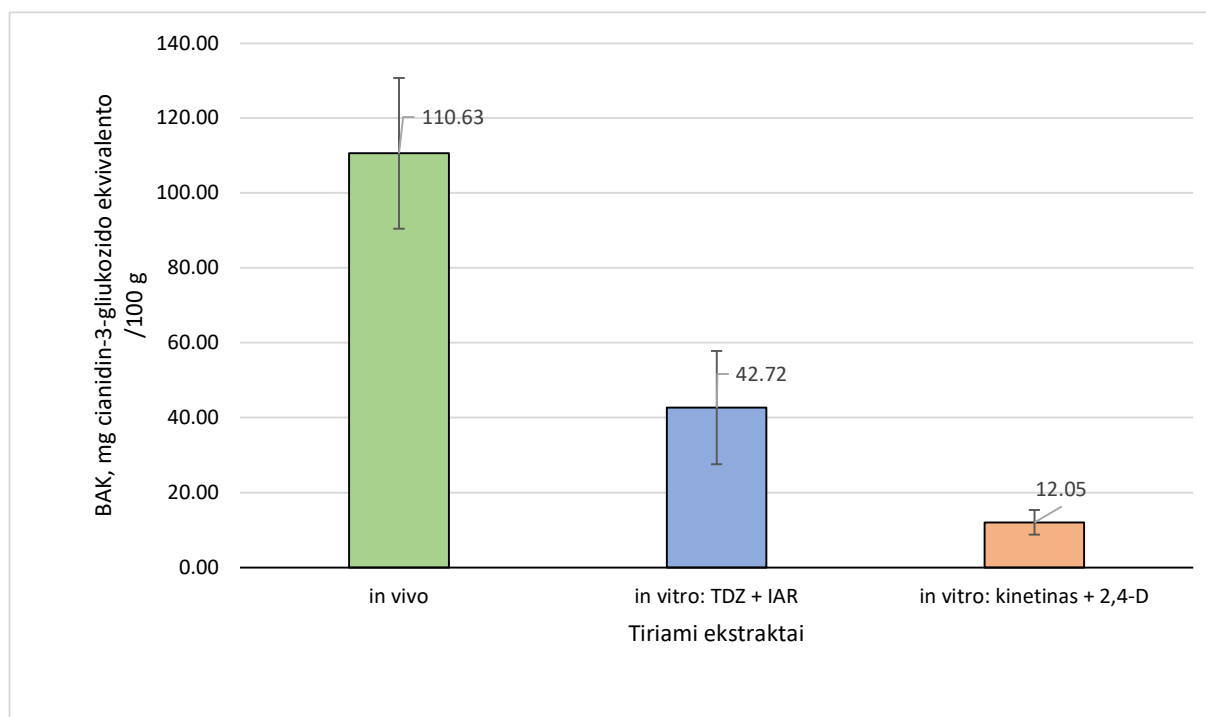


**3.12 pav.** Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Didžiausia flavonoidų koncentracija nustatyta taip pat *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto: 27,78 mg/g (žr. 3.12 pav.). Mažesnė koncentracija – 19,68 mg/g gauta MS terpėje su NAR, BAP ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto. 15,87 mg/g koncentracija buvo nustatyta ištyrus MS su TDZ ir IAR terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstraktą. Mažiausia flavonoidų koncentracija pasižymėjo MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstraktas, nustatyta koncentracija buvo 13,84 mg/g.

### 3.8. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas

Pateiktos bendrosios antocianinų koncentracijos (BAK) (žr. 3.13 pav.). MS su NAR, BAP ir 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto antocianinų nenustatyta ir dėl to nėra pateikta šioje diagramoje. Didžiausia antocianinų koncentracija nustatyta *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – 110,63 mg cianidin-3-gliukozido ekvivalento/100 g. MS su TDZ ir IAR terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstraktai parodė, kad buvo 42,72 mg cianidin-3-gliukozido ekvivalento/100 g. MS su kinetinu ir 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto koncentracija buvo 12,05 mg cianidin-3-gliukozido ekvivalento/100 g.

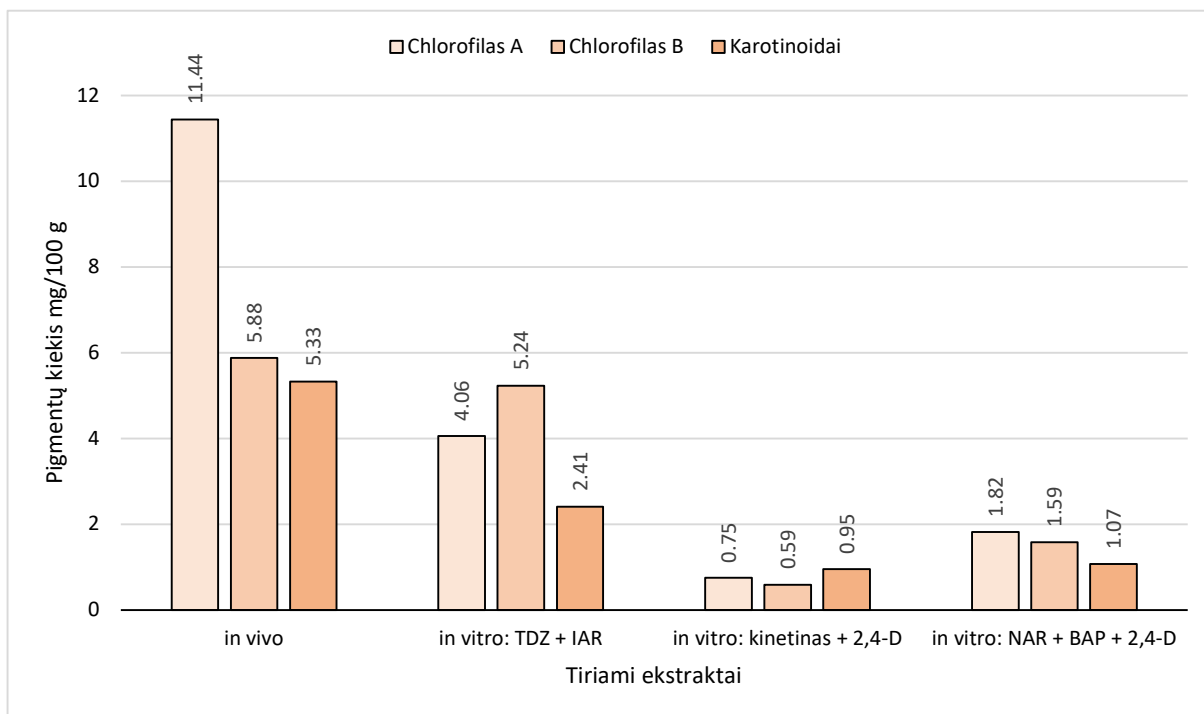


3.13 pav. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas

### 3.9. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas

Didžiausias chlorofilų *a* ir *b* bei karotinoidų kiekis (žr. 3.14 pav.) nustatytas *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto: 11,44 mg chlorofilo *a*/100 g, 5,88 mg chlorofilo *b*/100 g, 5,33 mg karotinoidų/100 g. Analizuojant MS su TDZ ir IAR terpėje augusių kaliaus kultūrų rezultatus, matoma, kad buvo 4,06 mg chlorofilo *a*/100 g, 5,24 mg chlorofilo *b*/100 g, 2,41 mg karotinoidų/100 g. MS su NAR, BAP ir 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 1,82 mg chlorofilo *a*/100 g, 1,59 mg chlorofilo *b*/100 g, 1,07 mg karotinoidų/100 g. MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto rezultatai: 0,75 mg chlorofilo *a*/100 g, 0,59 mg chlorofilo *b*/100 g, 0,95 mg karotinoidų/100 g.

Daugiausiai chlorofilų ir karotinoidų sukaupė *in vivo* augusi jonažolė. Tačiau lyginant visas tris *in vitro* terpes, daugiausia chlorofilų *a* ir *b* bei karotinoidų buvo MS su TDZ ir IAR terpėje augusiose kaliaus kultūrose.



3.14 pav. Chlorofilų ir karotinoidų koncentracijos įvertinimas

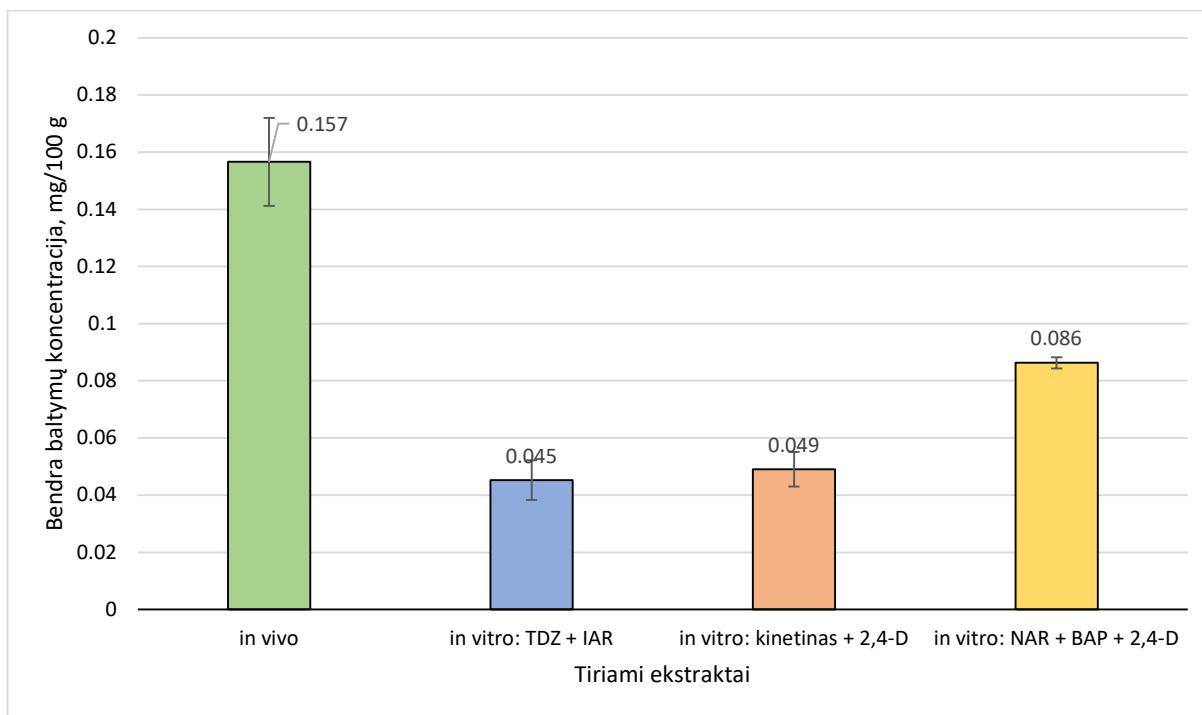
### 3.10. Bendros baltymų koncentracijos įvertinimas

Pateiktos skirtingai augintų jonažolių baltymų koncentracijos, kai ekstrakcijai buvo naudotas tirpalai, kurių pH buvo: 2,6 (žr. pav. 3.15), 4 (žr. 3.16 pav.) ir 8 (žr. 3.17 pav.).

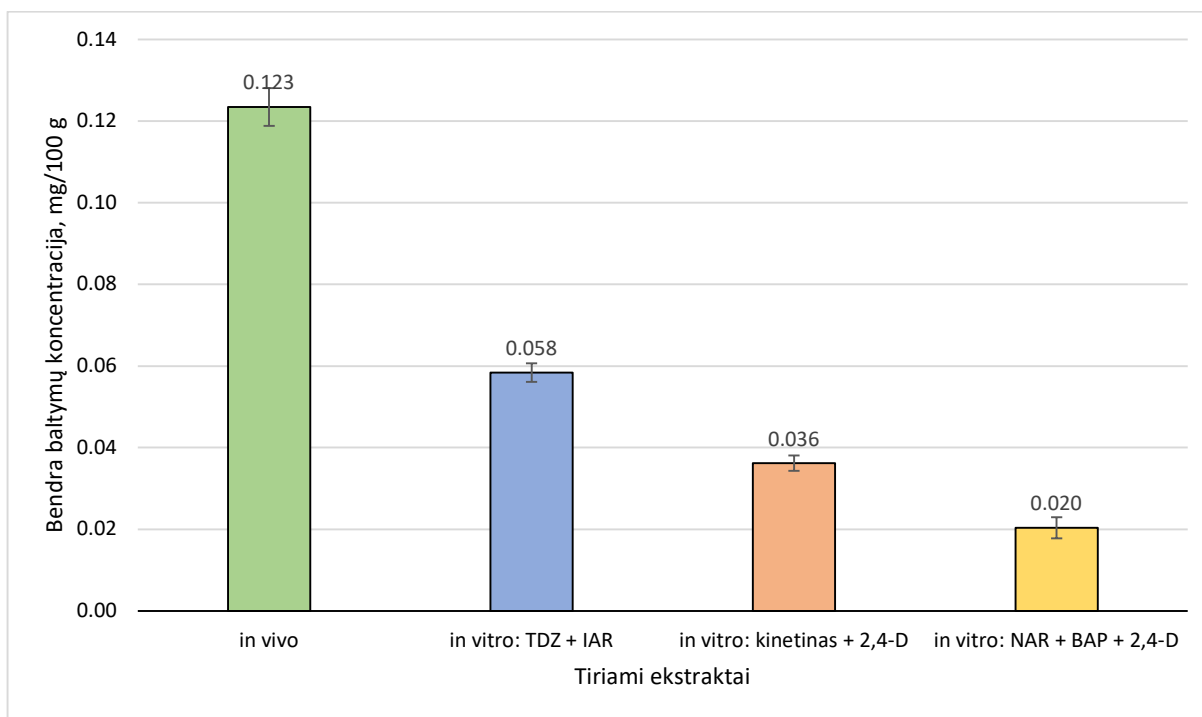
Didžiausia baltymų koncentracija nustatyta *in vivo* augusios jonažolės ekstrakto – 0,157 mg/100 g, kai ekstrakcijos tirpalo pH buvo 2,6.

*In vitro* augusių jonažolės kaliaus kultūrų ekstraktuose didžiausia baltymų koncentracija nustatyta, kai ekstrakcija vykdėta esant pH 8 (žr. 3.17 pav.): MS terpėje su TDZ ir IAR augusių kaliaus kultūrų baltymų koncentracija buvo 0,155 mg/100 g, MS terpėje su NAR, BAP ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto nustatyta 0,141 mg/100 g baltymų koncentracija, o MS terpėje su NAR, BAP ir 2,4-D – 0,141 mg/100 g.

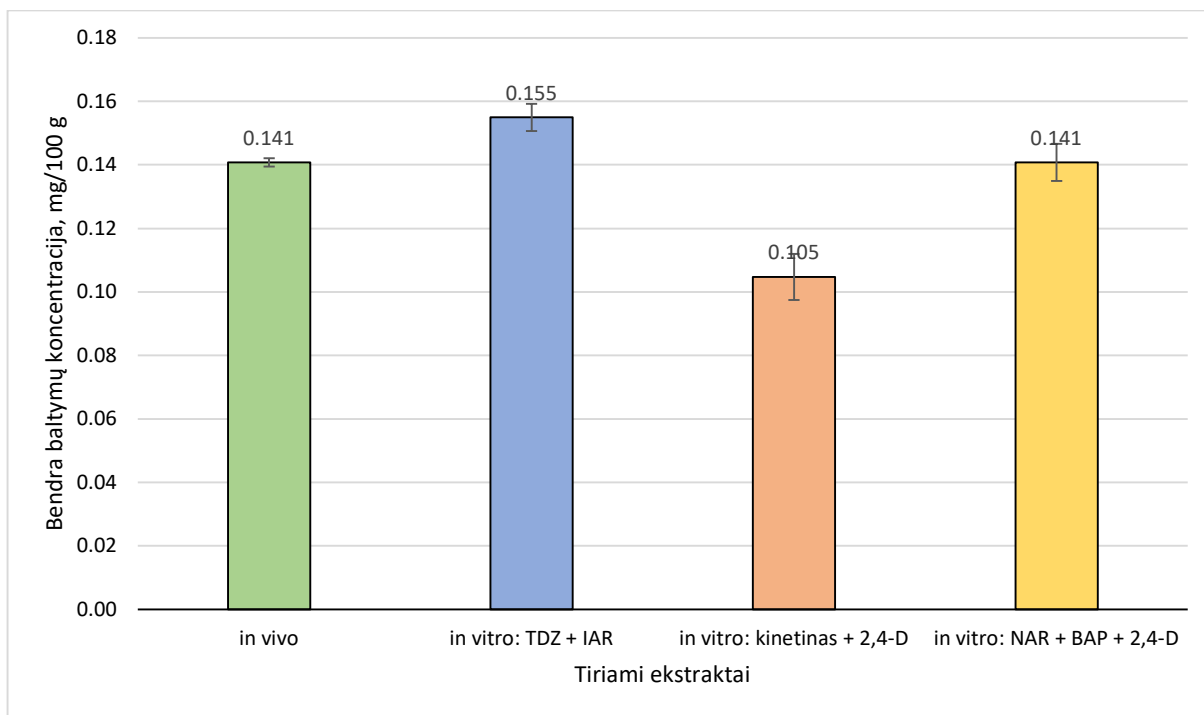
Apibendrinant šiuos rezultatus galima teigti, kad baltymų sintezei palankiausia buvo MS su TDZ ir IAR terpė ir ekstrakcijos sąlygos, kai pH buvo 8 (žr. 3.17 pav.).



**3.15 pav.** Baltymų koncentracijos įvertinimas, kai ekstrakcijos tirpalo pH 2,6



**3.16 pav.** Baltymų koncentracijos įvertinimas, kai ekstrakcijos tirpalo pH 4

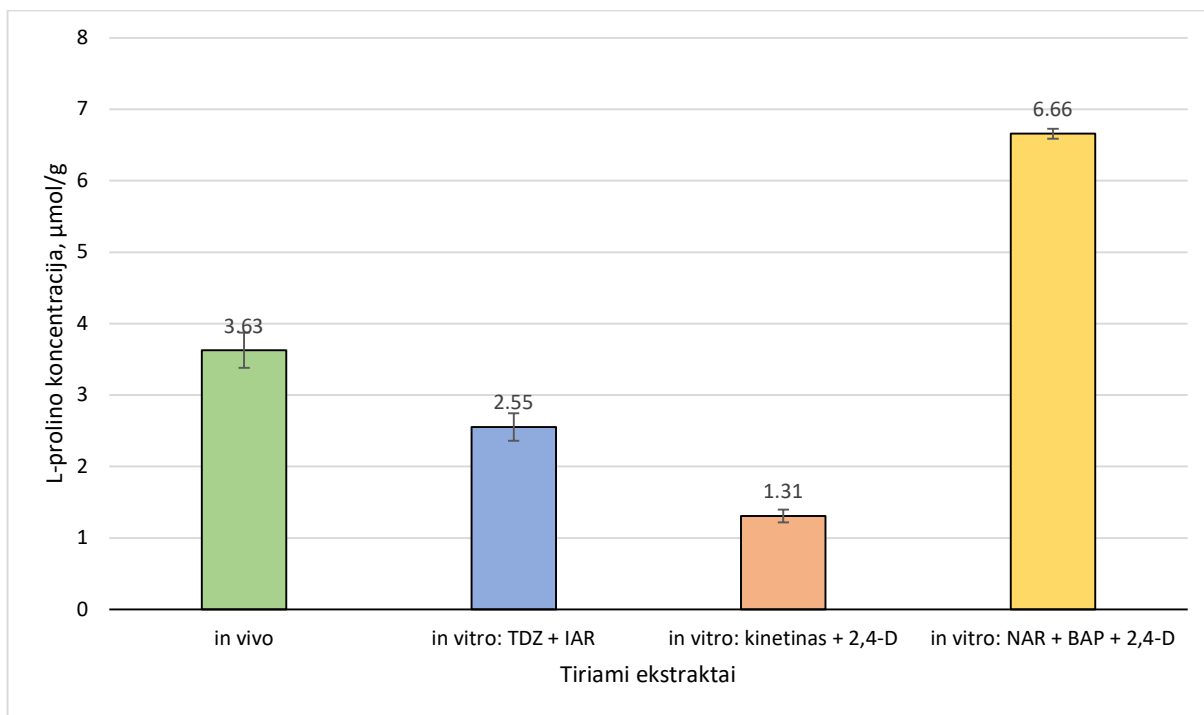


**3.17 pav.** Baltymų koncentracijos įvertinimas, kai ekstrakcijos tirpalo pH 8

### 3.11. L-prolino koncentracijos įvertinimas

Nustatyta L-prolino koncentracija (žr. 3.18 pav.) Didžiausia šio junginio koncentracija pasižymėjo *in vitro* MS su NAR ir BAP bei 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstraktas, nustatyta koncentracija buvo 6,66  $\mu\text{mol/g}$ . *In vivo* augusios jonažolės ekstrakto koncentracija buvo 3,63  $\mu\text{mol/g}$ . MS terpėje su TDZ ir IAR augusių kaliaus kultūrų ekstraktuose – 2,55  $\mu\text{mol/g}$ . Mažiausia koncentracija gauta MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstrakto – 1,31  $\mu\text{mol/g}$ .

Galima teigti, jog MS terpės praturtinimas NAR, BAP ir 2,4-D augalų augimo hormonais padidino L-prolino biosintezę kaliaus kultūrose.



**3.18 pav.** L-proolino koncentracijos įvertinimas

### 3.12. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Kontroliniame variante (žr. 3.19 pav.) matomas *Escherichia coli* bakterijų augimas MS mitybinėje terpėje nepridėjus papildomų medžiagų. Matomas tolygus bakterijų pasiskirstymas Petri lėkštelės plote.



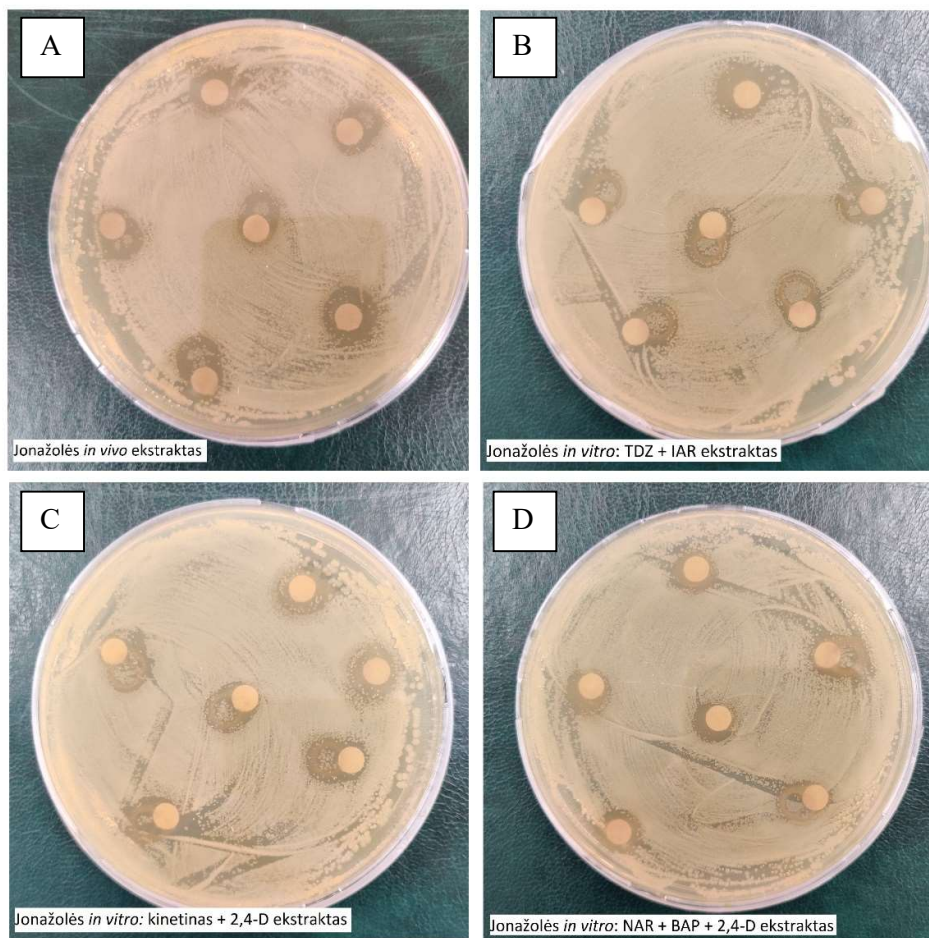
**3.19 pav.** *E. coli* bakterijų augimas (kontrolinis variantas)

Aplink diskelius, ant kurių buvo užpilta tiriamų ekstraktų, matomos bakterijų augimo slopinimo zonos (žr. 3.20 pav.): A nuotraukoje matomoje Petri lėkštelėje buvo naudotas *in vivo* augusios jonažolės ekstraktas, B nuotraukoje – MS terpėje su TDZ ir IAR augusių kaliaus kultūrų ekstraktas;

C nuotraukoje – MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstraktas; D nuotraukoje – MS terpėje su NAR, BAP bei 2,4-D augusių kaliaus kultūrų ekstraktas.

Antibiotiko ciprofloksacino ekstrakto poveikis *E. coli* bakterijoms pastebėtas didžiausias, su didžiausiomis slopinimo zonomis (žr. 3.21 pav.). Apibendrinti rezultatai (žr. 3.22 pav.) rodo antibiotiko pranašumą prieš jonažolės ekstraktus. Slopinimo zonos vidurkis, naudojant ciprofloksaciną, buvo 1,73 cm. Lyginant skirtingus ekstraktus, didžiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo jonažolės *in vivo* ekstraktas. Kitų ekstraktų slopinimo zonų vidurkiai nuo *in vivo* ekstrakto slopinimo zonos vidurkio skyrėsi nežymiai, todėl galima daryti išvadą, kad jonažolė pasižymi antibakterinėmis savybėmis, tačiau tirtų augalų augimo hormonų įtaka antibakterinio aktyvumo *in vitro* kaliaus kultūrose nepadidino.

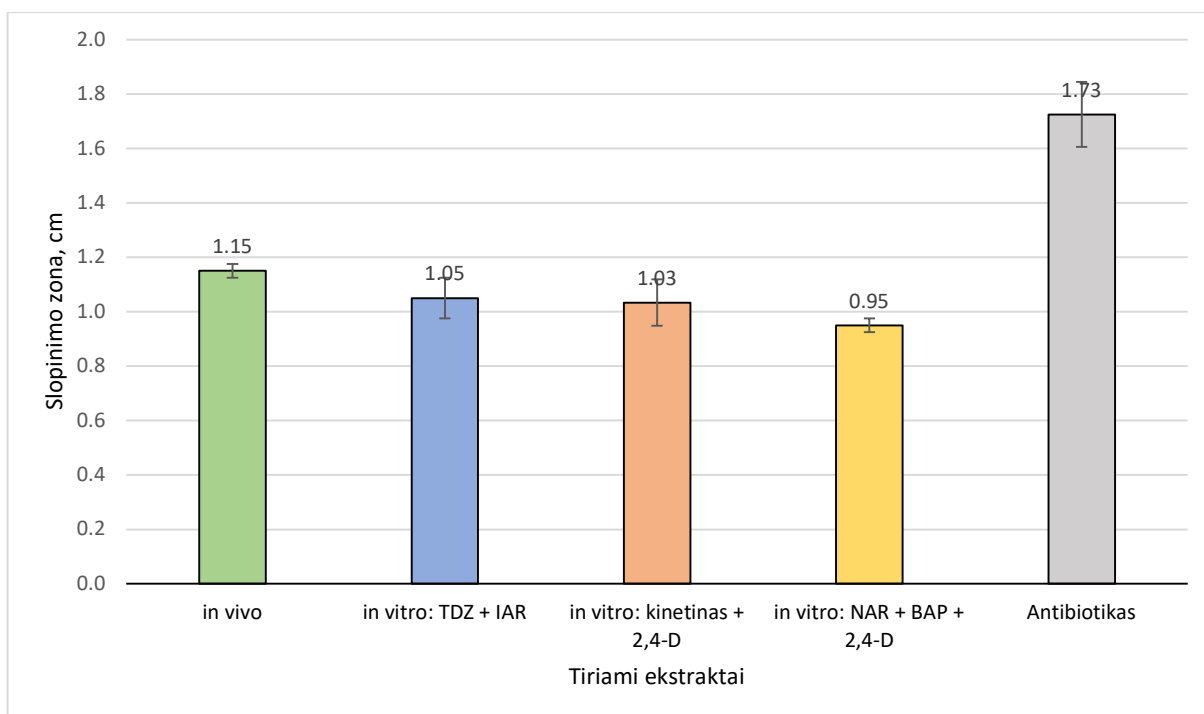
Jonažolės kaliaus kultūrų, augusių *in vitro* MS terpėje su TDZ ir IAR, ekstrakto slopinimo vidurkis buvo 1,05 cm. Jonažolės kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su kinetinu ir 2,4-D, ekstrakto slopinimo zonos vidurkis buvo 1,03 cm, o kultūrų, augusių MS terpėje su NAR, BAP ir 2,4-D – 0,95 cm.



**3.20 pav.** Skirtingų jonažolės ekstraktų poveikis *E. coli* bakterijoms



**3.21 pav.** Antibiotiko ciprofloksacino (25 µg/ml) poveikis *E. coli* bakterijoms

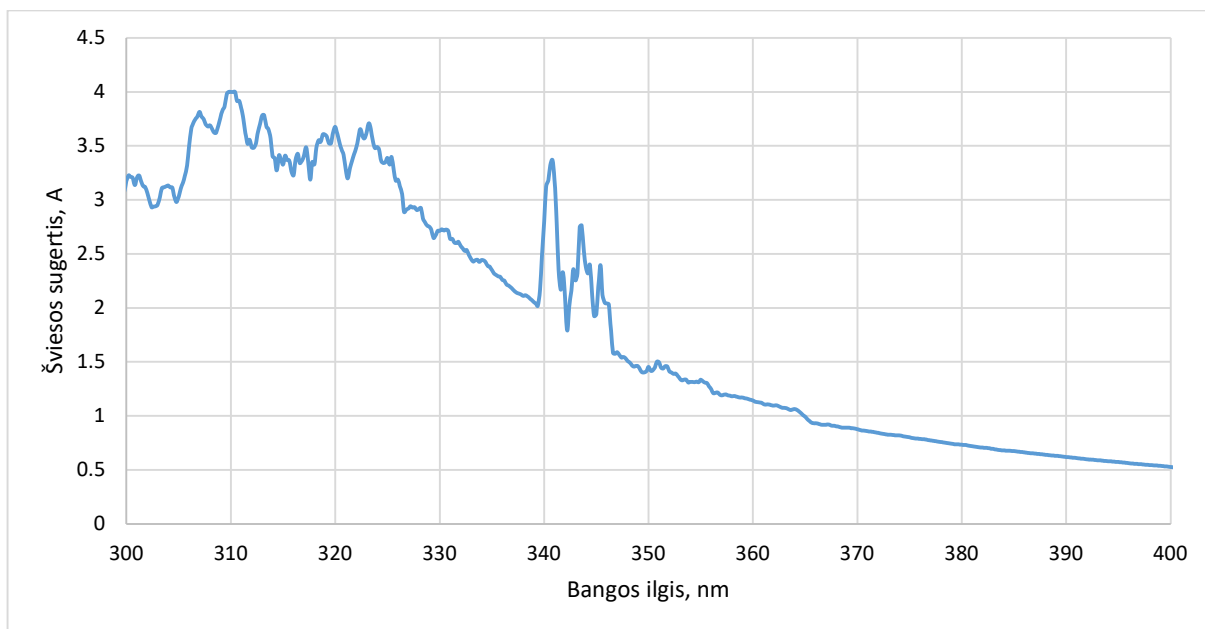


**3.22 pav.** Jonažolės ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

### 3.13. Titano oksido nanodalelių sintezės įvertinimas

Užrašytame titano oksido nanodalelių sintezės UV spektre (žr. 3.23 pav.) matoma žaliosios sintezės būdu gautoms titano oksido nanodalelėms būdinga absorbcija 300–350 nm bangos ilgių intervale. Absorbcija šiame intervale pasiekė maksimumą 340,8 nm bangos ilgyje – sugertis siekė 3,368 A.

Galima daryti išvadą, kad žaliosios sintezės būdu, naudojant jonažolės ekstraktą, buvo susintetinta titano nanodalelių.



**3.23 pav.** Titano oksido nanodalelių UV spektras

#### 4. Rekomendacijų dalis

Pateikta hipercino išskyrimo iš bioreaktoriuje augintos jonažolės (lot. *Hypericum perforatum* L.) gamybos schema (žr. 4.1 pav.). Schemos žymėjimai pateikti lentelėje (žr. 4.1 lentelę).

Pirmiausiai atliekant tyrimus turi būti išsiaiškinta, kokie augalų augimo hormonų deriniai yra optimalūs, kad būtų pasiekta didžiausia hipercino koncentracija.

Auginama jonažolės biomasė: jonažolės kaliaus kultūros yra pasodinamos į bioreaktorių (BR), kuriame yra MS terpė (MS) ir pasirinkta optimalūs augalų augimo hormonų (AAH) deriniai. Prieš biomasės, ji siurbliu (S-2) yra perduodama į džiovyklę (D-1) ir joje išdžiovinama. Išdžiuvusi biomasė susmulkinama smulkintuvu (H).

Susmulkinama biomase yra užpildoma superkritinio anglies dioksido ekstraktoriaus ekstrakcijos kolona. Skystas CO<sub>2</sub> yra saugomas talpoje, iš jos pereina per šilumokaitį (Š-1), kuriame pasiekia -10 °C temperatūrą, taip yra siekiama išvengti kavitacijos. Tuomet aukšto slėgio siurblys (ASP) suspaudžia CO<sub>2</sub> iki reikalingo ekstrakcijai slėgio. Suspaustas anglies dioksidas pereina pro šilumokaitį (Š-2), kuriame pasiekia ekstrakcijai reikalingą temperatūrą. Praėjęs ekstrakcijos koloną (EK), anglies dioksidas kartu su ištirpusiais junginiais keliauja į ekstrakcijos separatorių (ES). Praėjęs šį ciklą anglies dioksidas kondensatoriuje (K) yra suskystinamas ir grįžta į CO<sub>2</sub> talpą. Ekstrakcijos separatoriuje (ES) susikaupia ekstraktas ir jis yra pašalinamas per vožtuvą (V-4).

Tada yra atliekamas nereikalingų junginių: vaškų, lipidų pašalinimas šaldant ir filtruojant. Pašalinių medžiagų pašalinimo žingsnis yra itin svarbus, nes šie junginiai trukdo tolimesniam tikslinio produkto atskyrimui. Superkritinio CO<sub>2</sub> ekstrakcijos metu gautas ekstraktas šilumokaičiu (Š-3) pašildomas iki 40 °C temperatūros, kad labiau suskystėtų. Ekstraktas santykiu 2:1 (etanolis:ekstraktas) sumaišomas su etanolium per maišymo vožtuvą (MV-2) į talpą T1. Tuomet šis tirpalas talpoje T1 yra atšaldomas iki -20 °C temperatūros ir inkubuojamas 48 valandas. Praėjus nurodytam laikui, tirpalas filtruojamas per 20 µm filtrą (F). Atskirti šalutiniai produktai, tarp jų vašikai gali būti naudojami pakartotinai: elektronikoje ar žvakių gamyboje ir kitur.

Filtratas yra surenkamas talpoje T2 ir supilamas į rotacinio garintuvo (RG) kolbą. Rotaciniu garintuvu tirpiklis etanolis iš gauto mišinio yra pašalinamas. Etanolis gali būti grąžinamas į procesą ir naudojamas pakartotinai, nes yra grynas.

Po tirpiklio išgarinimo tirpalas supilamas į talpą T3 ir yra vykdoma distiliacija plėveliniu garintuvu (molekulinė distiliacija). Sistemoje vakuuminio siurblio (VS) pagalba yra palaikomas vakuumas. Plėvelio garintuvo (PG) viduryje yra vidinis kondensatorius bei rotorius, kuris srautą tolygiai paskirsto ant garintuvo sienelių, o patį garintuvą iš išorės gaubia kaitinamas apvalkalas. Sunkesnė frakcija surenkama į F1 frakcijos talpą: čia surenkami likę vašikai, druskos, chlorofilai ir kitos medžiagos. Į F2 frakcijos talpą surenkamas distiliatas – hipericinas. Prieš vakuuminį siurblį yra gaudyklė (G), kurioje palaikoma neigiama temperatūra, joje yra „sugaudomi“ lakūs junginiai, tirpiklio likučiai, kurie patenka į F3 frakcijos talpą.

Distiliatas yra džiovinamas džiovyklėje ir gaunamas proceso galutinis produktas – hipericinas.



**4.1 lentelė.** Schemos dalių sąrašas

| <b>Žymėjimas</b> | <b>Schemos dalis</b>              |
|------------------|-----------------------------------|
| BM               | Jonažolės biomasė                 |
| MS               | Maitinamoji MS terpė              |
| AAH              | Augalų augimo hormonai            |
| S-1–S-3          | SiurbLIAI                         |
| MV-1, MV-2       | Maišymo vožtuvai                  |
| BR               | Bioreaktorius                     |
| D1, D-2          | Džiovyklė                         |
| H                | Smulkintuvas                      |
| V1–V5            | Vožtuvas                          |
| EK               | Ekstrakcijos kolona               |
| K                | Kondensatorius                    |
| Š-1–Š-3          | Šilumokaitis                      |
| ASP              | Aukšto slėgio siurblys            |
| ES               | Ekstrakcijos separatorius         |
| EtOH             | Etanolis                          |
| T1               | Šaldoma talpa, -20 °C temperatūra |
| F                | Filtrai                           |
| T2               | Filtrato talpa                    |
| RG               | Rotacinis garintuvas              |
| T3               | Talpa                             |
| PG               | Plėvelinis garintuvas             |
| F1–F3            | Frakcijos                         |
| G                | Gaudyklė                          |
| VS               | Vakuuminis siurblys               |

## Išvados

1. Nustatyta, kad didžiausią redukcinį antioksidacinį aktyvumą turėjo jonažolės kaliaus kultūros, užaugintos MS terpėje su 0,5 mg/l TDZ ir 0,1 mg/l IAR – šviesos sugertis buvo 0,188 redukciniu metodu ir 33,30  $\mu\text{mol/l Fe}^{2+}$  koncentracija FRAP metodu. Didžiausias DPPH radikalo slopinimas buvo jonažolės kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su 0,1 mg/l NAR ir 0,2 mg/l BAP bei 0,5 mg/l 2,4-D ekstrakto – 94,29 %.
2. Ištirta, kad didžiausią fenolinių junginių koncentraciją (0,20 mg/100 g) turėjo jonažolės kaliaus kultūros, kurios buvo augintos MS terpėje su 0,5 mg/l TDZ ir 0,1 mg/l IAR. Daugiausia fenolinių rūgščių tarp *in vitro* augusių kultūrų sukaupė MS terpėje su 0,5 mg/l TDZ ir 0,1 mg/l IAR augusių jonažolės kaliaus kultūrų ekstraktas – 3,42 %. Didžiausią flavonoidų koncentraciją (19,68 %) sukaupė jonažolės kaliaus kultūros, augusios MS terpėje su 0,1 mg/l NAR ir 0,2 mg/l BAP bei 0,5 mg/l 2,4-D.
3. Gauta, kad didžiausia baltymų koncentracija (0,155 mg/100 g) buvo jonažolės kaliaus kultūrų, augusių MS su 0,5 mg/l TDZ ir 0,1 mg/l IAR terpėje, ekstrakto, o didžiausia L-prolino koncentracija (6,66  $\mu\text{mol/g}$ ) nustatyta MS su 0,1 mg/l NAR, 0,2 mg/l BAP ir 0,5 mg/l 2,4-D terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstrakto.
4. Ištirta, kad didžiausias superoksido dismutazės ir askorbatperoksidazės aktyvumas nustatytas *in vitro* terpėse augusiose kultūrose: MS terpėje su 0,11  $\mu\text{M}$  kinetinu ir 0,9  $\mu\text{M}$  2,4-D ir MS su 0,1 mg/l NAR ir 0,2 mg/l BAP bei 0,5 mg/l 2,4-D. Superoksido dismutazės aktyvumas nustatytas 43,63 vnt/mg ir 35,24 vnt/mg. Askorbatperoksidazės – 3,55 mmol/mg ir 4,13 mmol/mg atitinkamai.
5. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo *in vivo* jonažolės ekstraktas.
6. Žaliosios sintezės būdu iš jonažolės ekstrakto buvo susintetinta titano nanodalelių, kurios turėjo sugerties maksimumą būdingame bangos ilgyje – 340,8 nm.

## Literatūros sąrašas

1. BOKELMANN, J.M. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): Flowering Buds and Tops. *Medicinal Herbs in Primary Care*. Elsevier, 2022. 569–577 p. ISBN 9780323846769.
2. KLEMOV, K.M. et al. Medical attributes of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects: Second Edition*. CRC Press, 2011. 211–237 p. ISBN 9781439807163.
3. Assessment report on *Hypericum perforatum* L., herba. *European Medicines Agency* [interaktyvus], 2022. 8–19 p. [žiūrėta 2023-01-06]. Prieiga per: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-hypericum-perforatum-l-herba-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-hypericum-perforatum-l-herba-revision-1_en.pdf).
4. NAPOLI, E. et al. Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species – A comparative study. *Phytochemistry* [interaktyvus]. 2018, 152, 162–173 p. [žiūrėta 2022-10-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.003>.
5. DUYMUŞ, H.G. et al. In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 155, 112–119 p. [žiūrėta 2022-10-03]. Prieiga per: 10.1016/j.foodchem.2014.01.028.
6. CARRUBBA, A. et al. Content variability of bioactive secondary metabolites in *Hypericum perforatum* L. *Phytochemistry Letters* [interaktyvus]. 2021, 46, 71–78 p. [žiūrėta 2022-10-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.09.011>.
7. EGDELKRAUT-GOTTANKA, S.G. VON et al. Quantitative analysis of the active components and the By-products of eight dry extracts of *Hypericum perforatum* L. (St John's Wort). *Phytochemical Analysis* [interaktyvus]. 2002, 13, 170–176 p. [žiūrėta 2022-10-03]. Prieiga per: 10.1002/pca.638.
8. GHAVAMALDIN, A. et al. Study of variation of biochemical components in *Hypericum perforatum* L. grown in North of Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* [interaktyvus]. 2012, 6 (3), 366–372 p. [žiūrėta 2022-12-07]. Prieiga per: 10.5897/jmpr11.393.
9. MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* [interaktyvus]. 2020, 74 (1), 1–16 p. [žiūrėta 2023-01-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>.
10. JENDŽELOVSKÁ, Z. et al. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2016, 7, 1–20 p. [žiūrėta 2023-01-07]. Prieiga per: 10.3389/fpls.2016.00560.
11. KIOKIAS, S. et al. Phenolic acids of plant origin-a review on their antioxidant activity in vitro (O/W emulsion systems) along with their in vivo health biochemical properties. *Foods* [interaktyvus]. 2020, 9 (4), 1–22 p. [žiūrėta 2022-12-14]. Prieiga per: 10.3390/foods9040534.
12. LS, R. et al. Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review. *Journal of Nutrition & Food Sciences* [interaktyvus]. 2016, 6 (2), 2–7 p. [žiūrėta 2023-02-04]. Prieiga per: 10.4172/2155-9600.1000468.
13. KUMAR, S., PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal* [interaktyvus]. 2013, 2013 [žiūrėta 2023-02-04]. Prieiga per: 10.1155/2013/162750.
14. GONTIJO, V.S. et al. Biological and Chemical Aspects of Natural Biflavonoids from Plants: A Brief Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2016, 17 (10) [žiūrėta 2022-01-29]. Prieiga per: 10.2174/1389557517666161104130026.
15. CHAUDHARY, A., WILLETT, K.L. Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology* [interaktyvus]. 2006, 217 (2–3), 194–205 p. [žiūrėta 2023-04-02]. Prieiga per: 10.1016/j.tox.2005.09.010.
16. SALEHI, B. et al. The Therapeutic Potential of Anthocyanins: Current Approaches Based on Their Molecular Mechanism of Action. *Frontiers in Pharmacology* [interaktyvus]. 2020, 11

- (August), 1–20 p. [žiūrēta 2023-04-02]. Prieiga per: 10.3389/fphar.2020.01300.
17. MURTHY, H.N., KIM, Y. Hypericins : biotechnological production from cell and organ cultures. [interaktyvus]. 2014, 2014 98:9187–9198 [žiūrēta 2023-01-26]. Prieiga per: 10.1007/s00253-014-6119-3.
  18. KONG, W. et al. Non-destructive determination of Malondialdehyde (MDA) distribution in oilseed rape leaves by laboratory scale NIR hyperspectral imaging. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2016, 6 (February), 1–8 p. [žiūrēta 2022-11-15]. Prieiga per: 10.1038/srep35393.
  19. LÜ, J.M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [interaktyvus]. 2010, 14 (4), 840–860 p. [žiūrēta 2023-02-06]. Prieiga per: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
  20. KASOTE, D.M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. 2015, 11 (8), 982–991 p. [žiūrēta 2023-03-28]. Prieiga per: 10.7150/ijbs.12096.
  21. YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences* [interaktyvus]. 2018, 12 (3), 88–93 p. [žiūrēta 2023-03-08]. Prieiga per: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896077/#:~:text=Superoxide dismutases \(SODs\) constitute a,reactive oxygen species-mediated diseases.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896077/#:~:text=Superoxide%20dismutases%20(SODs)%20constitute%20a,reactive%20oxygen%20species-mediated%20diseases.)
  22. KUMAR, P. Measurement of Ascorbate Peroxidase Activity in Sorghum. *Bio Protoc* [interaktyvus]. 2022, 12 (20), e4531 [žiūrēta 2023-03-08]. Prieiga per: 10.21769/BioProtoc.4531.
  23. BHATIA, S., SHARMA, K. Plant Tissue Culture-Based Industries. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. Elsevier Inc., 2015, 405–417 p. [žiūrēta 2023-03-08]. ISBN 9780128022214. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00014-5>.
  24. EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* [interaktyvus]. 2019, 5 (1), 50–59 p. [žiūrēta 2023-02-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>.
  25. HABIB, D. et al. The Study of Ascorbate Peroxidase , Catalase and Peroxidase During In Vitro Regeneration of *Argyrolobium roseum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [interaktyvus]. 2013, 2014 (172), 1070–1084 p. [žiūrēta 2023-01-29]. Prieiga per: 10.1007/s12010-013-0591-6.
  26. JAVIER GUTIÉRREZ MAÑERO, F. et al. Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. *Pharmaceutical Biology* [interaktyvus]. 2012, 50 (10), 1201–1209 p. [žiūrēta 2023-01-29]. Prieiga per: 10.3109/13880209.2012.664150.
  27. SIMIC, S.G. et al. Effects of Polysaccharide Elicitors on Secondary Metabolite Production and Antioxidant Response in *Hypericum perforatum* L . Shoot Cultures. *The Scientific World Journal* [interaktyvus]. 2014, 2014, 1–10 p. [žiūrēta 2023-02-12]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/609649>.
  28. DEEPA, A.V. et al. The Applications of TDZ in Medicinal Plant Tissue Culture. *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator* [interaktyvus]. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018, 297–316 p. [žiūrēta 2023-02-12]. ISBN 9789811080043. Prieiga per: 10.1007/978-981-10-8004-3\_15.
  29. SCHALLER, G.E. et al. The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell* [interaktyvus]. 2015, 27 (1), 44–63 p. [žiūrēta 2022-12-28]. Prieiga per: 10.1105/tpc.114.133595.
  30. FARJAMINEZHAD, R., GAROOSI, G. ali New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. *3 Biotech* [interaktyvus]. 2019, 9, 1–17 p. [žiūrēta 2022-12-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1836-z>.
  31. KOCA, N., KARAMAN, Ş. The effects of plant growth regulators and L-phenylalanine on phenolic compounds of sweet basil. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 166, 515–521 p. [žiūrēta 2023-02-21]. Prieiga per: 10.1016/j.foodchem.2014.06.065.
  32. SHINDE, A.N. et al. Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root

- cultures of *Psoralea corylifolia* L. Using elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [interaktyvus]. 2009, 14 (3), 288–294 p. [žiūrėta 2023-01-14]. Prieiga per: 10.1007/s12257-008-0238-6.
33. EDAHIRO, J.I. et al. Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [interaktyvus]. 2005, 99 (1), 43–47 p. [žiūrėta 2023-01-14]. Prieiga per: 10.1263/jbb.99.43.
  34. LIU, X.Y. et al. Gold nanoparticles: synthesis, physiochemical properties and therapeutic applications in cancer. *Drug Discovery Today* [interaktyvus]. 2021, 26 (5), 1284–1292 p. [žiūrėta 2023-01-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.030>.
  35. ALAHMAD, A. et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Hypericum perforatum* L. Aqueous Extract with the Evaluation of Its Antibacterial Activity against Clinical and Food Pathogens. *Pharmaceutics* [interaktyvus]. 2022, 14 (5), 1104 p. [žiūrėta 2023-12-14]. Prieiga per: 10.3390/pharmaceutics14051104.
  36. EBADOLLAHI, R. et al. Effect of explant source, perlite nanoparticles and TiO<sub>2</sub>/perlite nanocomposites on phytochemical composition of metabolites in callus cultures of *Hypericum perforatum*. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2019, 9 (1), 12998, [žiūrėta 2023-02-23]. Prieiga per: 10.1038/s41598-019-49504-3.
  37. WÖLFLE, U. et al. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica* [interaktyvus]. 2014, 80 (2–3), 109–120 p. [žiūrėta 2023-01-09]. Prieiga per: 10.1055/s-0033-1351019.
  38. REY-MÉNDEZ, R. et al. Flower, stem, and leaf extracts from *Hypericum perforatum* L. to synthesize gold nanoparticles: Effectiveness and antioxidant activity. *Surfaces and Interfaces* [interaktyvus]. 2022, 32 (2–3), 102181, [žiūrėta 2023-02-02]. Prieiga per: 10.1016/j.surfin.2022.102181.
  39. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Grow and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* [interaktyvus]. 1962, 15 473–497 p. [žiūrėta 2022-12-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
  40. BHALODIA, N. et al. In vitro antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of *Cassia fistula* Linn. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)* [interaktyvus]. 2013, 34 (2), 209–214 p. [žiūrėta 2023-01-09]. Prieiga per: 10.4103/0974-8520.119684.
  41. SASIKUMAR, J.M. et al. In vitro antioxidant activity and polyphenolic content of commonly used spices from Ethiopia. *Heliyon* [interaktyvus]. 2020, 6 (9), e05027, [žiūrėta 2023-03-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05027>.
  42. FERNANDES, R.P.P. et al. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2016, 53 (1), 451–460 p. [žiūrėta 2023-03-05]. Prieiga per: 10.1007/s13197-015-1994-x.
  43. BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* [interaktyvus]. Academic Press, 1999, 15–27 p. [žiūrėta 2023-02-26]. ISBN 9780121822002. Prieiga per: 10.1016/S0076-6879(99)99005-5.
  44. BALIYAN, S. et al. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules* [interaktyvus]. 2022, 27 (4), 1–19 p. [žiūrėta 2023-02-26]. Prieiga per: 10.3390/molecules27041326.
  45. BRAND-WILLIAMS, W. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 1995, 28 (1), 25–30 p. [žiūrėta 2023-02-26]. Prieiga per: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

46. RATNAVATHI, C. V., KOMALA, V. V. Sorghum Grain Quality. *Sorghum Biochemistry: An Industrial Perspective* [interaktyvus] Elsevier, 2016, 1–61 p. [žiūrėta 2023-02-03]. ISBN 9780128031827. Prieiga per: 10.1016/B978-0-12-803157-5.00001-0.
47. ASHRAFUZZAMAN ZAHID, M. et al. Comparison of butylated hydroxytoluene, ascorbic acid, and clove extract as antioxidants in fresh beef patties at refrigerated storage. *Food Science of Animal Resources* [interaktyvus]. 2019, 39 (5), 768–779 p. [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per: 10.5851/kosfa.2019.e67.
48. LIU, C.L. et al. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* [interaktyvus]. 2002, 40 (5), 635–641 p. Prieiga per: 10.1016/S0278-6915(02)00002-9.
49. MILLER, F.J., GRIENDLING, K.K. Functional evaluation of nonphagocytic NAD(P)H oxidases. *Methods in Enzymology* [interaktyvus]. Elsevier Masson SAS, 2002, 220–233 p. [žiūrėta 2023-03-05]. ISBN 9780121822569. Prieiga per: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)53050-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(02)53050-0).
50. SAVICKA, M., ŠKUTE, N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* [interaktyvus]. 2010, 56 (1–2), 26–33 p. [žiūrėta 2023-03-08]. Prieiga per: 10.2478/v10055-010-0004-x.
51. LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* [interaktyvus]. John Wiley & Sons, 2017, 107–115 p. [žiūrėta 2023-01-24]. ISBN 9781119135388. Prieiga per: 10.1002/9781119135388.ch6.
52. GAWLIK-DZIKI, U. et al. The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2009, 42 (1), 137–143 p. [žiūrėta 2023-03-18]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.009>.
53. NALEWAJKO-SIELIWONIUK, E. et al. Comparative analysis of phenolic compounds in four taxa of *Erigeron acris* s. l. (Asteraceae). *Biologia* [interaktyvus]. 2019, 74 (12), 1569–1577 p. [žiūrėta 2023-02-01]. Prieiga per: 10.2478/s11756-019-00332-w.
54. SHRAIM, A.M. et al. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT - Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2021, 150 111932 [žiūrėta 2023-02-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>.
55. MALINAUSKAITĖ, R. Šarminio jonizuoto vandens įtaka paprastojai lęšio Smėlinukai morfofiziologiniams rodikliams. *Žmogaus ir gamtos sauga*. ASU, 2015, 1822–1824 p. ISSN 1822-1823.
56. FORLANI, G., FUNCK, D. A Specific and Sensitive Enzymatic Assay for the Quantitation of L-Proline. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2020, 11 1–12 p. [žiūrėta 2023-03-16]. Prieiga per: 10.3389/fpls.2020.582026.

## Priedai

### 1 priedas. Tyrimų metu naudoti reagentai

| Eil. Nr. | Pavadinimas                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------------------|
| 1.       | 300 mM natrio acetato buferinis tirpalas, pH 3,6                     |
| 2.       | 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazinas (TPTZ), ištirpintas 40 mmol/l HCl |
| 3.       | 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$                   |
| 4.       | 2000 $\mu\text{M}$ $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ .    |
| 5.       | 0,2 M natrio fosfato buferinis tirpalas, pH 6,6                      |
| 6.       | 1 % $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$                             |
| 7.       | 10 % trichloracto rūgštis                                            |
| 8.       | 0,1 % $\text{FeCl}_3$                                                |
| 9.       | 96 % metanolis                                                       |
| 10.      | DPPH                                                                 |
| 11.      | 20 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,4                          |
| 12.      | 0,17 mM kalio persulfatas                                            |
| 13.      | 2 mM ABTS                                                            |
| 14.      | Tanino rūgštis                                                       |
| 15.      | 70 % acetonas                                                        |
| 16.      | Folino-Kiokalto reagentas                                            |
| 17.      | 7,5 % natrio karbonato tirpalas                                      |
| 18.      | Albuminas                                                            |
| 19.      | Bradfordo reagentas                                                  |
| 20.      | 0,066 M natrio fosfato buferinis tirpalas                            |
| 21.      | 1 mM DTT                                                             |
| 22.      | 0,5 mM fenilmetilsufonilfluoridas (PMSF)                             |
| 23.      | DMSO                                                                 |
| 24.      | 40 mM Tris-HCl buferinis tirpalas                                    |
| 25.      | 10 mM L-metioninas                                                   |
| 26.      | 540 $\mu\text{M}$ nitromėlynasis tetrazolis (NBT)                    |
| 27.      | 0,025 % Tritonas X-100                                               |
| 28.      | 3 $\mu\text{M}$ riboflavinai                                         |
| 29.      | HCl, koncentracija 18 g/l                                            |
| 30.      | Arnovo reagentas                                                     |
| 31.      | NaOH, koncentracija 40 g/l                                           |
| 32.      | 96 % etanolis                                                        |
| 33.      | 80 % metanolis                                                       |
| 34.      | 2 % aliuminio chlorido tirpalas                                      |
| 35.      | Ledinė acto rūgštis                                                  |
| 36.      | Ninhidrininis reagentas                                              |
| 37.      | $\text{H}_3\text{PO}_4$                                              |
| 38.      | Prolinas                                                             |
| 39.      | 0,1 M glicino tirpalas, tirpinta HCl, pH 2,6                         |
| 40.      | Bradfordo reagentas                                                  |
| 41.      | 50 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$                                 |
| 42.      | KCl buferinis tirpalas, pH 1                                         |
| 43.      | NaOAc buferinis tirpalas, pH 4,5                                     |
| 44.      | 20 % trichloracto rūgštis                                            |
| 45.      | 0,5 % tiobarbitūrinė rūgštis (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) |
| 46.      | 0,1 M natrio acetatas, pH 4                                          |
| 47.      | Tris-HCl, pH 8                                                       |
| 48.      | Titano izopropoksidas                                                |

## 1 priedo tęsinys

| Eil. Nr. | Pavadinimas                                  |
|----------|----------------------------------------------|
| 49.      | 0,1 M kalio fosfato buferinis tirpalas, pH 7 |
| 50.      | 1 M DTT                                      |
| 51.      | 0,5 mM PMSF                                  |
| 52.      | 0,5 mM askorbo rūgštis                       |
| 53.      | 0,1 mM EDTA                                  |
| 54.      | 0,1 mM vandenilio peroksidas                 |

## 2 priedas. Tyrimų metu naudota įranga

| Eil. Nr. | Įranga                         | Pavadinimas                                    |
|----------|--------------------------------|------------------------------------------------|
| 1.       | Autoklavas                     | „CertoClav“                                    |
| 2.       | Centrifuga                     | „Universal 320R“, HETTICH                      |
| 3.       | Mikrocentrifuga                | „D-6015 Mini Centrifuge“, neoLab               |
| 4.       | Laminaras                      | „BV-100 Laminar Flow Cabinet“, Telstar         |
| 5.       | pH-metras                      | „WinLab“                                       |
| 6.       | Spektrofotometras              | „UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer“, Shimadzu   |
| 7.       | Svarstyklės                    | „ATX84“, Shimadzu                              |
| 8.       | Kratytuvas                     | „ZX3“, VELP Scientific                         |
| 9.       | Distiliatorius                 | „Elix Type 2 Water Purification Systems“, Merc |
| 10.      | Termostatuojamas inkubatorius  | „Binder“                                       |
| 11.      | Termostatuojama vandens vonelė | ULTRATHERM „BWT-U“, Biosan                     |
| 12.      | Termostatuojamas kratytuvas    | „ES – 20“, Biosan                              |

### 3 priedas. MS terpės sudėtis

| Reagentas                                            | Koncentracija terpėje, mg/l |
|------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Makroelementai</i>                                |                             |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 1650                        |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1900                        |
| CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O                | 440                         |
| MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O               | 370                         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 170                         |
| <i>Mikroelementai</i>                                |                             |
| KI                                                   | 0,83                        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 6,2                         |
| MnSO <sub>4</sub> × 4H <sub>2</sub> O                | 22,3                        |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O                | 8,6                         |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O | 0,25                        |
| CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O                | 0,025                       |
| CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O                | 0,025                       |
| <i>Geležies šaltiniai</i>                            |                             |
| FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O                | 27,8                        |
| Na <sub>2</sub> EDTA × 2H <sub>2</sub> O             | 37,3                        |
| <i>Organiniai priedai</i>                            |                             |
| Mioinozitolis                                        | 100                         |
| Nikotino rūgštis                                     | 0,5                         |
| Piridoksinas-HCl                                     | 0,5                         |
| Tiaminas-HCl                                         | 0,5                         |
| Glicinas                                             | 2                           |
| Sacharozė                                            | 30000                       |
| Agar-agaras                                          | 5                           |