



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*,
Kombucha) bioaktyvių frakcijų išskyrimas bei savybių tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

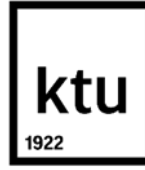
Viktorija Kietytė

Projekto autorė

doc. dr. Paulius Kraujalis

Vadovas

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*,
Kombucha) bioaktyvių frakcijų išskyrimas bei savybių tyrimai**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Viktorija Kietytė

Projekto autorė

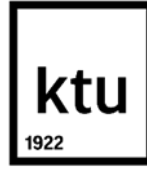
doc. dr. Paulius Kraujalis

Vadovas

doc. dr. Jonas Damašius

Recenzentas

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Viktorija Kietytė

Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) bioaktyvių frakcijų išskyrimas bei savybių tyrimai

Akademinių sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) 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 mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Viktorija Kietytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Kietytė, Viktorija. Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) bioaktyvių frakcijų išskyrimas bei savybių tyrimai. Magistro baigiamasis projektas vadovas doc. dr. Paulius Kraujalis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: grybų ekstraktai, superkryzinė ekstrakcija anglies dvideginiu, ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje, antioksidacinis aktyvumas, antibakterinis aktyvumas, ergosterolis.

Kaunas, 2023. 66 p.

Santrauka

Juodasis beržo grybas (lot. *Inonotus obliquus*), paprastoji poniabudė (lot. *Phallus impudicus*) ir arbatos grybas (lot. *Kombucha*) dėl savo maistinės vertės ir gydomųjų savybių – nuo senų laikų vertinami grybai. Šie grybai pasižymi antioksidacinėmis, antibakterinėmis, imunomoduliacinėmis bei priešvėžinėmis savybėmis. Jie labai vertinami dėl savo maistinės vertės, kadangi šiuose grybuose randama angliavandenių, baltymų, mineralinių medžiagų, riebalų ir vitaminų. Pavyzdžiui, randama vitaminų B, K, A, C, E ar ergosterolio, kuris gali būti lengvai paverčiamas vitaminu D₂. Taip pat šių grybų sudėtyje gausu bioaktyvių junginių (organinės rūgštys, fenoliniai junginiai, steroliai). Išskyrus šiuos aktyvius junginius įvairiais biorafinavimo metodais, jie gali būti plačiai pritaikomi įvairiose pramonės srityse, kuriant pridėtinės vertės produktus.

Šio projekto metu atliktas juodojo beržo grybo (lot. *Inonotus obliquus*), paprastosios poniabudės (lot. *Phallus impudicus*) ir arbatos grybo (lot. *Kombucha*) cheminių rodiklių nustatymas, ekstraktų išskyrimas superkryzinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE–CO₂) ir pakopinės ekstrakcijos didėjančio poliškumo tirpikliais (ETPS) metodu. Taip pat atliktas ekstraktų biologinių savybių nustatymas: antioksidacinių savybių nustatymas DPPH, FRAP, *Folin-Ciocalteu* metodais ir atliktas antibakterinio aktyvumo nustatymas agarų difuziniu metodu prieš *Escherichia coli* bei *Bacillus subtilis* bakterijų rūšis. Atliktas ergosterolio koncentracijos nustatymas ekstraktams, gautiems ETPS metodu, taikant efektyviąją skysčių chromatografiją (ESC). Taip pat suprojektuota geriausiomis biologinėmis savybėmis pasižymėjusio ekstrakto gamybos aparatūrinė schema.

Kietytė, Viktorija. Isolation and characterization of bioactive fractions of mushrooms (*Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*). Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Paulius Kraujalis. Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: mushroom extracts, supercritical carbon dioxide extraction, pressurized liquid extraction, antioxidant activity, antibacterial activity, ergosterol.

Kaunas, 2023. 66.

Summary

Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*), common stinkhorn (*Phallus impudicus*) and tea mushroom (*Kombucha*) have been valued mushrooms since ancient times for their nutritional value and medicinal properties. These mushrooms have antioxidant, antibacterial, immunomodulatory, and anti-cancer properties. For their nutritional value, these mushrooms are highly valued because they contain carbohydrates, proteins, minerals, fats, and vitamins, such as vitamins B, K, A, C, E and ergosterol, which can be easily converted into vitamin D₂. They are also rich in bioactive compounds (organic acids, phenolic compounds, sterols). The extraction of these active compounds by various biorefining methods can be widely applied in various industrial fields to create value-added products.

This project involves determining the chemical parameters of three mushroom species: chaga (*Inonotus obliquus*), common stinkhorn (*Phallus impudicus*), and mushroom tea (*Kombucha*). The extracts obtained from these mushrooms were subjected to two extraction methods: supercritical carbon dioxide extraction (SCE-CO₂) and pressurized liquid extraction (PLE) with increasing polarity. Furthermore, the biological properties of the extracts were evaluated. The antioxidant properties were determined using the DPPH, FRAP, and *Folin-Ciocalteu* methods, while the antibacterial activity was assessed using the agar diffusion method against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* bacterial species. Additionally, the ergosterol concentration of the extracts obtained through the ETPS method was determined using Efficient Liquid Chromatography (ELC). Finally, a hardware scheme was designed for the production of the extract with the best biological properties.

Turinys

Lentelių sąrašas.....	8
Paveikslų sąrašas.....	9
Santrumpų ir terminų sąrašas.....	10
Įvadas	11
1. Literatūros apžvalga	13
1.1. Grybų (lot. <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Phallus impudicus</i> , <i>Kombucha</i>) paplitimas.....	13
1.2. Grybų (lot. <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Phallus impudicus</i> , <i>Kombucha</i>) biocheminė sudėtis	15
1.2.1. Angliavandeniai	15
1.2.2. Baltymai.....	16
1.2.3. Riebalai.....	17
1.2.4. Mineralai.....	17
1.3. Grybų (lot. <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Phallus impudicus</i> , <i>Kombucha</i>) bioaktyvieji junginiai.....	17
1.3.1. Juodojo beržo grybo (lot. <i>Inonotus obliquus</i>) bioaktyvieji junginiai	18
1.3.2. Paprastosios poniabudės (lot. <i>Phallus impudicus</i>) bioaktyvieji junginiai	19
1.3.3. Arbatos grybo (lot. <i>Kombucha</i>) bioaktyvieji junginiai	20
1.4. Grybų (lot. <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Phallus impudicus</i> , <i>Kombucha</i>) funkcinės savybės ir nauda sveikatai.....	21
1.4.1. Antioksidacinės savybės.....	21
1.4.2. Antibakterinės savybės	23
1.5. Veikliųjų junginių išskyrimo metodai.....	24
1.5.1. Superkryzinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO ₂).....	24
1.5.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS)	25
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	26
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	27
2.1. Cheminės sudėties komponentų nustatymo metodai	28
2.1.1. Cheminiai reagentai ir medžiagos.....	28
2.1.2. Drėgmės kiekio nustatymas	29
2.1.3. Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu.....	29
2.1.4. Riebalų kiekio nustatymas	30
2.1.5. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas.....	30
2.1.6. Angliavandenių kiekio apskaičiavimas	31
2.2. Ekstraktų gamyba.....	31
2.2.1. Superkryzinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO ₂)	31
2.2.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS)	31
2.3. Ekstraktų <i>in vitro</i> antioksidacinio aktyvumo ir antibakterinio potencialo nustatymas	32
2.3.1. Bandinių paruošimas	32
2.3.2. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH* metodu	33
2.3.3. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6- tripiridil- s-triaziną	33
2.3.4. Ekstraktų bendras fenolinių junginių koncentracijos nustatymas <i>Folin-Ciocalteu</i> metodu..	34
2.3.5. Antibakterinio aktyvumo nustatymas agarų difuziniu metodu.....	35
2.3.6. Ergosterolio koncentracijos nustatymas	36

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	37
3.1. Grybų (lot. <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Phallus impudicus</i> , <i>Kombucha</i>) bendra cheminė sudėtis.....	37
3.2. Juodojo beržo grybo (lot. <i>Inonotus obliquus</i>), paprastosios poniabudės (lot. <i>Phallus impudicus</i>), arbatos grybo (lot. <i>Kombucha</i>) ekstraktų gavimo rezultatai	40
3.2.1. Superkryzinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO ₂).....	40
3.2.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje.....	41
3.3. Ekstraktų antioksidacinio potencialo nustatymas	43
3.4. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH* metodu	43
3.4.1. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną	44
3.4.2. Ekstraktų bendras fenolinių junginių koncentracijos nustatymas <i>Folin-Ciocalteu</i> metodu..	46
3.4.3. Antibakterinio aktyvumo nustatymas agar difuziniu metodu.....	47
3.5. Ergosterolio koncentracijos nustatymas	49
4. Rekomendacijų dalis	52
Išvados	54
Literatūros sąrašas.....	55

Lentelių sąrašas

2.1 lentelė. Bandinių numeracija ir pavadinimai.....	33
2.2 lentelė. LB terpės reagentų kiekiai	35
3.1 lentelė. Ergosterolio koncentracija ekstraktuose, mg/g	50
3.2 lentelė. Vitamino D rekomenduotina dienos dozė [144]	51
4.1 lentelė. Gamyboje naudoti įrenginiai.....	52

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Juodasis beržo grybas (lot. <i>Inonotus obliquus</i>) [5]	13
1.2 pav. Paprastoji poniabudė (lot. <i>Phallus impudicus</i>) [13].....	13
1.3 pav. Arbatos grybas SCOPY (lot. <i>Kombucha</i>) [17].....	14
1.4 pav. Juodajame beržo grybe randami triterpenoidai.....	19
1.5 pav. Juodojo beržo grybo polifenoliniai junginiai.....	22
1.6 pav. Antioksidantinį aktyvumą turintys polifenoliniai junginiai.....	22
1.7 pav. Superkritinės ekstrakcijos principinė schema.....	24
1.8 pav. Ekstrakcijos suspaustais skysčiais principinė schema	25
2.1 pav. Bandinių rafinavimo metodai ir tyrimų schema	27
2.2 pav. Celės sandara	32
2.3 pav. Slopavimo zonos skaičiavimas <i>Petri</i> lėkštelėje.....	36
3.1 pav. Angliavandenių kiekis, %.....	37
3.2 pav. Riebalų kiekis, %	38
3.3 pav. Baltymų kiekis, %	38
3.4 pav. Mineralinių medžiagų kiekis, %	39
3.5 pav. Drėgmės kiekis, %	39
3.6 pav. Ekstrakcijos išeigos priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės.....	40
3.7 pav. Gautos išeigos po superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu	40
3.8 pav. Gautos išeigos po ekstrakcijos su heksano tirpikliu padidintame slėgyje	41
3.9 pav. Gautos išeigos po ekstrakcijos su acetono tirpikliu padidintame slėgyje	42
3.10 pav. Gautos išeigos po ekstrakcijos su etanolio tirpikliu padidintame slėgyje	42
3.11 pav. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) metodo spalvinis kitimas	43
3.12 pav. Tiriamųjų 1–13 DPPH tyrimo rezultatai	44
3.13 pav. Geležies (Fe^{3+}) iki geležies (Fe^{2+}) spalvinis kitimas FRAP metode.....	44
3.14 pav. FeSO_4 kalibracinė kreivė	45
3.15 pav. Tiriamųjų 1–13 FRAP tyrimo rezultatai.....	45
3.16 pav. <i>Folin-Ciocalteu</i> reagento spalvinis kitimas	46
3.17 pav. Tanino rūgšties kalibracinė tiesė.....	46
3.18 pav. Tiriamųjų 1–13 bandinių <i>Folin-Ciocalteu</i> tyrimo rezultatai	47
3.19 pav. Tiriamųjų bandinių 1–13 antibakterinis poveikis prieš <i>Escherichia coli</i>	48
3.20 pav. Tiriamųjų bandinių 1–13 antibakterinis poveikis prieš <i>Bacillus subtilis</i>	49
3.21 pav. Ergosterolio konversija į ergokalciferolį [143].....	49
3.22 pav. Ergosterolio koncentracijos nustatymo kalibracinė kreivė.....	50
4.1 pav. Juodojo beržo 4 ekstrakto gamybos aparatūrinė schema	53

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

BHA – butilintas hidroksianizolas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

DPPH^{*} – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;

ESC – efektyvioji skysčių chromatografija;

ETPS – ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje;

LB – *Luria-Bertani* terpė;

NA – nėra aptikta;

SCOBY – simbiotinė bakterijų ir mielių kultūra;

SKE–CO₂ – superkrizinė ekstrakcija anglies dvideginiu;

SN – standartinis nuokrypis;

TPTZ – (2,4,6-tripiridil-s-triazinas);

UV– ultravioletinė spinduliuotė.

Įvadas

Grybai nuo senovės buvo vertinami ne tik dėl savo maistinės vertės, bet ir dėl svarbių gydomųjų savybių. Mokslininkai intensyviai ieško natūralių antioksidacinių, antibakterinių junginių, todėl šiuo metu susidomėjimas grybais vis didėja dėl dar platesnio pritaikomumo medicinoje, farmacijoje [1], maisto ir kitose srityse. Grybuose gausu baltymų, riebalų, fenolinių junginių, flavanoidų ir vitaminų, pavyzdžiui, vitamino B₁, B₂, B₃, C ir ergosterolio, kuris gali būti lengvai paverčiamas vitaminu D₂. Dažniausiai biologiškai aktyvūs junginiai egzistuoja kaip grybų ląstelės komponentai (angliavandeniai, pavyzdžiui, β -gliukanai), baltymai ar kaip organiniai antriniai metabolitai (steroidai, terpenai, fenoliniai junginiai ir kt.). Mokslinėje literatūroje minimi iš grybų išskirtų bioaktyvių junginių biologiniai aktyvumai: priešvėžinis, antimikrobinis, antioksidacinis, imunomoduliacinis, priešuždegiminis, hipoglikeminis, antivirusinis, hepatoprotekcinis ir antineurodegeneracinis poveikis [2].

Juodasis beržo grybas (lot. *Inonotus obliquus*), paprastoji poniabudė (lot. *Phallus impudicus*) ir arbatos grybas (lot. *Kombucha*), mokslinėje literatūroje minimi kaip turintys daugybę įvairių sveikatai naudingų savybių. Pavyzdžiui, šie grybai pasižymi antioksidaciniu, antibakteriniu bei priešvėžiniu poveikiu. Nors daug tyrimų su šiais grybais nėra atlikta, tačiau yra teigiama apie jų vertingą maistinę sudėtį, kadangi juose gausu angliavandenių, vitaminų, baltymų, fenolinių junginių bei mineralinių medžiagų.

Dėl plataus grybų medicininės veiklos spektro didėja biologiškai aktyvių junginių išskyrimas iš įvairių grybų rūšių [3], siekiant atrasti natūralių biologiškai aktyvių junginių ir juos pritaikyti kosmetikos, funkcinio maisto, papildų ar vaistų kūrime. Superkrintinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂) ir ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS) yra veiksmingos metodikos, siekiant išgauti bioaktyvias medžiagas iš natūralių žaliavų [4], kurių metu stengiamasi pasiekti geresnį bei selektyvesnį produkto gavimą, tuo pačiu prisidedant prie tvarumo, žaliosios chemijos principų [5].

Šio darbo tikslas – nustatyti juodojo beržo (lot. *Inonotus obliquus*), paprastosios poniabudės (lot. *Phallus impudicus*), arbatos grybo (lot. *Kombucha*) cheminės sudėties rodiklius. Įvertinti ekstraktų, gautų superkrintinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE–CO₂) ir pakopinės ekstrakcijos didėjančio poliškumo tirpikliais padidintame slėgyje metodu (ETPS), antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą bei ištirti ergosterio kiekį ekstraktuose, gautuose taikant ETPS. Taip pat sumodeliuoti naujo ekstrakto gamybos aparatūrinę schemą.

Darbo uždaviniai:

1. nustatyti pagrindinius grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) cheminės sudėties rodiklius (riebalų kiekis, drėgmės kiekis, mineralinių medžiagų kiekis, baltymų kiekis, angliavandenių kiekis);
2. išskirti grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) ekstraktus, taikant superkrintinę ekstrakciją anglies dvideginiu (SKE–CO₂);
3. išskirti grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) ekstraktus, taikant pakopinę ekstrakciją didėjančio poliškumo tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS), naudojant heksano / acetono / etanolio tirpiklius;

4. nustatyti ekstraktų, gautų SKE–CO₂ ir ETPS metodais, antioksidacinius aktyvumus, naudojant DPPH, FRAP ir *Folin-Ciocalteu* metodus;
5. ištirti ekstraktų, gautų SKE–CO₂ ir ETPS metodais, antibakterinį poveikį prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų rūšis;
6. nustatyti ekstraktuose, gautuose ETPS metodu, esančią ergosterolio koncentraciją, taikant efektyviają skysčių chromatografiją (ESC);
7. suprojektuoti ekstrakto, pasižyminčio geriausiomis biologinėmis savybėmis, gamybos aparatūrinę schemą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) paplitimas

Juodasis beržo grybas (lot. *Inonotus obliquus*) – juodai rudas parazitinis grybas (1.1 pav.), augantis ant brandaus beržo gyvų kamienų ir sukeliantis jų irimą [6]. Jis paplitęs šaltą klimatą turinčiose regionuose [7] Japonijoje, Kinijoje [8], Rusijoje, Skandinavijoje, vidurio ir rytų Europoje [9].



1.1 pav. Juodasis beržo grybas (lot. *Inonotus obliquus*) [5]

Jis buvo pastebėtas ant alksnio, buko, klevo, šermukšnio, skroblo, tuopos, ąžuolo, uosio, gluosnio, platano, kaštono, riešutmedžio ir kitų įvairių medžių rūšių, bet dažniausiai ant įvairių beržo rūšių [10]. Tradiciškai nuo XVI amžiaus Rusijoje, Lenkijoje ir Baltijos šalyse jis vartojamas virškinimo trakto vėžiniams susirgimams, širdies ir kraujagyslių ligoms bei diabetui gydyti. Vakarų Sibire juodasis beržo grybas buvo naudojamas tuberkuliozei, kepenų ligoms, skrandžio ligoms malšinti bei kaip organizmo vidaus valymo priemonė. Taip pat Rusijoje juodasis beržo grybas naudojamas opų, gastrito, gaubtinės žarnos karcinomoms gydyti, reprodukcinio organų ir liaukų hiperplazijai [11]. Šis grybas pripažintas kaip puiki priemonė gydymosiems medžiagoms kurti, pavyzdžiui, natūraliems vaistams, funkciniam maistui ir papildams. Dėl plataus spektro savybių, jis įvairiapusiškai pritaikomas farmacijos, medicinos bei natūralios kosmetikos srityse [12].

Paprastoji poniabudė (lot. *Phallus impudicus*) yra plačiai paplitęs grybas visame pasaulyje. Jam būdinga unikali išvaizda (1.2 pav.) ir nemalonus kvapas [10].



1.2 pav. Paprastoji poniabudė (lot. *Phallus impudicus*) [13]

Nepaisant nemalonaus kvapo, tai plačiai naudojamas grybas netradicinėje medicinoje. Ypač naudojami vandens ir alkoholiniais tirpikliais gauti ekstraktai, kurie pritaikomi gydant reprodukcinės sistemos funkcionavimą, širdies ir kraujagyslių ligas ar piktybinius navikus. Taip pat gauti ekstraktai naudojami chemoterapijoje ar spindulinės terapijos metu, norint išvengti metastazių ir onkologinių ligų pasikartojimo [10]. Moksliniuose straipsniuose minimos ir kitos paprastosios poniabudės sveikatai naudingos savybės: imuninės būklės gerinimas bei žaizdų gijimo pagreitinimas [14].

Arbatos grybo (lot. *Kombucha*) fermentuotas skysčio gėrimas yra kilęs iš šiaurės rytų Kinijos [15], nors jau prieš 2000 metų buvo vartojamas ne tik Kinijoje, jis taip pat pastebėtas ir Rusijoje, Filipinuose, Indijoje, Korėjoje ir Japonijoje [16]. Arbatos grybo gėrimas gaunamas iš simbiotinės kultūros acto rūgšties bakterijų (*Komagataeibacter*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*), pieno rūgšties bakterijų (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) ir mielių (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*). Saldžioje terpėje, kuriai sukurti dažniausiai naudojama juodoji arba žalioji arbata, esančios bakterijos ir mielės sukuria galingą simbiozę, kuri gali slopinti parazitinių mikroorganizmų augimą [17]. Ją sudaro dvi fazės: plūduriuojanti bioplėvelė (1.3 pav.), kuri vadinama SCOBY (simbiotinė bakterijų ir mielių kultūra) [18] ir rūgšti skystoji fazė [17]. Ši fermentacija trunka nuo 7 iki 10 dienų [18]. Pačiame SCOBY bakterinės celiuliozės grybe dominuojantys mikroorganizmai yra tokie patys kaip fermentuojamame skystyje. Mikroorganizmų gausa ir įvairovė priklauso nuo daug įvairių veiksnių, tokių kaip fermentacijai skirtas substratas, fermentacijos trukmė bei augimo klimatas [19].



1.3 pav. Arbatos grybas SCOBY (lot. *Kombucha*) [17]

Susidariusi bioplėvelė yra šalutinis arbatos grybo fermentacijos produktas, kuris anksčiau turėjo tik vieną panaudojimo paskirtį, jis buvo naudojamas kaip substratas naujo gėrimo gamyboje, o vėliau tapo vertinga žaliava. Didžiausias pritaikomumas yra maisto pramonėje [20]. Dėl savo biologinio skaidumo, ši bioplėvelė puikiai pritaikoma kaip įvairių produktų pakavimo medžiaga, kuri gali būti geru plastiko pakaitu. Pakuotė iš šios bioplėvelės pailgintų galiojimo laiką ir užkirstų kelią mikrobams daugintis bei augti [19]. Taip pat vertėtų paminėti ir tai, kad gerinant fermentaciją, išgaunant naujus skonius, papildant maistinę vertę – kuriami naujų rūšių gėrimai [17]. Kaip netoksiškas maisto papildas [20], dėl turtingos biomasės, ši grybo bioplėvelė taip pat yra naudojama gyvūnų pašaruose. Ši bakterijų gaminama bioplėvelė padeda prisitaikyti ir apsaugoti ląsteles nuo ypač nepalankių sąlygų, tokių kaip ultravioletinė spinduliuotė, aukštas hidrostatinis slėgis ar bet kokie kiti aplinkos veiksniai [19]. Arbatos grybas pasižymi gebėjimu sulaikyti didelį vandens kiekį, būti mechaniškai atsparus ir kartu turėti biologinį suderinamumą, tai suteikia patrauklumą bei didelį potencialą kuriant biomedicinos reikmenis. Biomedicinoje yra kuriami šios plėvelės biokompozitiniai produktai, kurie gerina žaizdų gijimą ir prisideda prie odos nudegimų bei kitų odos pažeidimų gydymo. Šis arbatos grybo fermentuotas gėrimas pasižymi antioksidacinėmis, senėjimą

stabdančiomis ir priešūždegiminėmis savybėmis, o tai – naudinga farmacijos ir kosmetikos srityse [17]. Nepaisant savo plataus spektro savybių ir pritaikomumo medicinoje, arbatos grybo bioplėvelė taip pat naudojama mados ir drabužių pramonėje, kur ji pritaikoma kaip odos pakaitalas ir yra vadinamas veganiška tekstile [19].

1.2. Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) biocheminė sudėtis

Grybai pasižymi didele maistine verte, juose gausu angliavandenių ir baltymų. Taip pat jie yra puikus vitaminų ir mineralų šaltinis [21]. Grybai yra laikomi patraukliu ir alternatyviu aukštos kokybės baltymų šaltiniu, turinčiu pakeičiamų ir nepakeičiamų aminorūgščių [22]. Dažniausiai randamos medžiagos grybuose yra baltymai, angliavandeniai, aminorūgštys, riebalų rūgštys ir vitaminai. Grybų biocheminė sudėtis susideda iš drėgmės (85–95 %), angliavandenių (35–70 %), baltymų (15–34,7 %), riebalų (10 %), mineralinių medžiagų (6–10,9 %) ir nukleino rūgščių (3–8 %). Juose taip pat yra daug vitaminų, tokių kaip tiaminas, riboflavinas, niacinas, biotinas, askorbo rūgštis, pantoteno rūgštis ir folio rūgštis. Grybuose taip pat randama mineralų, tokių kaip kalcis (Ca), geležis (Fe), manganas (Mn), magnis (Mg), cinkas (Zn), selenas (Se) [23]. Jie gali būti naudingi sveikatai, nes juose yra bioaktyvių junginių, tokių kaip β -gliukanai, peptidai, chitinas, terpenai, steroliai ir fenoliniai junginiai [22]. Esančių medžiagų kiekiui daug įtakos gali turėti įvairūs faktoriai, pavyzdžiui, geografinė augimo lokacija, sudarytos sąlygos ir daugybė kitų veiksnių [24].

1.2.1. Angliavandeniai

Grybų angliavandeniai apima kai kuriuos mono- ir disacharidus bei cukraus alkoholius, taip pat glikogeną ir chitiną [24]. Pastebėta, kad grybuose yra daug angliavandenių, nes juose yra daug gliukozės ir manitolio, ir dėl šios priežasties yra nedidelis kiekis sacharozės bei fruktozės. Dėl nekrakmolinių polisacharidų, grybuose gausu maistinių skaidulų. Grybuose yra apie 4–9 % tirpių skaidulų, taip pat 22–30 % netirpių skaidulų. Grybų polisacharidai taip pat turi hepatoprotekcinį, antioksidacinį, cheminį ir radioprotekcinį, antimikrobinį, antivirusinį, lipidų kiekį mažinantį poveikį [14].

Juodojo beržo grybe randami struktūriniai polisacharidai, turintys $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ ir $\beta(1\rightarrow6)$ glikozidines jungtis. β -gliukanai užima pagrindinį vaidmenį kai kuriose sveikatą stiprinančiose savybėse, jie prisideda prie imuninės sistemos stiprinimo, cholesterolio ir gliukozės mažinimo kraujyje [25], turi antiproliferacinių, antidiabetinių savybių [26] ir suteikia hipoglikeminį efektą [27]. Taip pat β -gliukanai dažniausiai veikia kaip maistinės skaidulos, kurios padeda organizmui virškinti maistą bei pasisavinti naudingas medžiagas [26]. Juodojo beržo grybo sienelėse randamas chitinas [28], susidedantis iš monomerinių *N*-acetilgliukozamino vienetų, sujungtų β -(1,4)-glikozidiniais ryšiais [29]. Jis yra plačiai paplitęs gamtoje ir tai antras pagal gausumą natūralus polimeras [28], kuris randamas vėžiagyvių, vabzdžių egzoskeletuose ir grybų bei dumblių ląstelių sienelėse. Juodojo beržo grybe randami chitinas ir chitozanas, pasižymi plačiu savybių spektru: apsauginiu poveikiu nuo infekcijų, netoksiškumu, biologiniu skaidumu bei suderinamumu. Dėl daugybės naudingų savybių, chitinas ir chitozanas plačiai naudojami farmacijoje, kosmetikoje, maisto bei tekstilės srityse [29]. Kinų mokslininkai teigia, kad juodojo beržo grybo polisacharidai mažina uždegimo lygį, gaubtinės žarnos audinių pažeidimus ir prisideda prie efektyvaus svorio mažinimo. Grybelinės kilmės chitozanas gali būti naudojamas maisto, farmacijos ar biomedicinos produktams kurti, jis gali būti pritaikomas kaip antimikrobinė medžiaga vandens valymui arba kaip biopesticidinė priemonė [30].

Paprastoji poniabudė turi įvairių polisacharidų, pavyzdžiui, β -glikanų, β -glukanų su ksilozės, manozės, galaktozės ir urono rūgšties heterosacharidinėmis grandinėmis [14]. Randami angliavandeniai paprastojoje poniabudėje gali stimuliuoti ar moduluoti organizmo imunines reakcijas, taip pat jie laikomi multicitokinių induktoriais, galinčiais paveikti įvairių genų ir jų receptorių ekspresiją [31]. Priešnavikinės paprastosios poniabudės savybės yra siejamos su joje randamais angliavandeniais β -glukanais, kurie aktyvuoja slopintus citotoksinius T limfocitus arba medžiagas, pradedančias gaminti perforino baltymus, kurie ardo vėžines ląsteles [32]. Lenkijos mokslininkas Vyacheslav Buko, kartu su kitais mokslininkais, atliktuose tyrimuose nustatė, kad iš šio grybo išskirti angliavandeniai turėjo imunomoduliuojančių savybių *in vitro* ir *in vivo* eksperimentinėse žiurkėse, kurios buvo sergančios streptozotocino sukeltu diabetu. Taip pat jų sukurtas tepalas, kuriame yra 10 % iš paprastosios poniabudės išskirtų angliavandenių, pagerino eksperimentinių žiurkių odos žaizdų gijimą, pagreitino granuliacinio audinio epitelizaciją, susitraukimą ir augimą. Taip pat pastebėtas chitinas, kuris sudaro 7,0–12,5 % cheminės sudėties. Išskirti angliavandeniai iš paprastosios poniabudės yra perspektyvi žaliava kuriant funkcinį maistą, naujus gydomuosius ir profilaktinius vaistus [33].

Pagrindiniai arbatos grybo susidarantys angliavandeniai yra ramnozė, arabinozė, galaktozė, gliukozė, ksilozė, manozė ir ribozė. Polisacharidų įvairovei įtakos turi arbatos rūšis, augimo aplinka ir apdorojimas [34]. Arbatos grybo fermentuojamame skystyje iš mielių ir pieno rūgšties bakterijų susidaro β -glukanai [35]. β -glukanai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, stipriu laisvųjų radikalų surišimu, imuninės sistemos stimuliavimu [36] ir taip pat mažina cholesterolio kiekį kraujyje [64]. Serbijos mokslininkų atliktame biologinio aktyvumo tyrime nustatyta, kad angliavandeniai, esantys arbatos grybe, parodė stiprias imunomoduliacinio savybes žmogaus ląstelės kultūrose. Taip pat angliavandenių ekstraktai gauti iš arbatos grybo gali prisidėti prie organizmo gynybos nuo įvairių išorinių patogenų, tokių kaip virusai [37]. Arbatos angliavandeniai sudaryti iš arabinozės, ribozės, galaktozės mažina kraujo riebumą, o iš galaktozės sudaryti angliavandeniai rodo stiprų hipoglikeminį aktyvumą [34].

1.2.2. Baltymai

Baltymų kiekis grybuose paprastai yra didelis, bet labai skiriasi. Skirtumui įtakos turi tokie veiksniai kaip grybo rūšis ir vystymosi stadija. Grybai yra geras baltymų šaltinis, nes juose yra 200–250 g/kg sausos masės. Dažniausiai grybuose randamos aminorūgštys yra leucinas, asparto rūgštis, valinas, glutaminas ir glutamo rūgštis [23].

Juodojo beržo grybe randamas platus spektras amino rūgščių. Tarp jų yra lizinas, argininas, histidinas, aspartatas, glutamatas, treoninas, serinas, prolinas, glicinas, alaninas, valinas, cisteinas, metioninas, leucinas, izoleucinas, tirozinas ir fenilalaninas [38].

Paprastojoje poniabudėje daugiausiai randama glutamo rūgšties ir metionino iš amino rūgščių [39]. Metioninas yra nepakeičiama amino rūgštis ir svarbus antioksidantas, kuris gali padėti apsaugoti organizmą nuo jonizuojančios spinduliuotės sukeltos žalos, detoksikuoti kenksmingas medžiagas, išvengti riebalų kaupimosi kepenyse [40].

Arbatos grybo fermentuojamame skystyje yra randama amino rūgščių, pavyzdžiui, teanino, glutamino junginių, teanino, [41] kuris turi atpalaiduojantį, stresą mažinantį poveikį ir gerina nuotaiką [42].

1.2.3. Riebalai

Grybai yra mažai kaloringi, turintys labai mažai riebalų ir be cholesterolio. Grybuose randamos svarbiausios riebalų rūgštys yra linolo rūgštis, oleino rūgštis ir palmitino rūgštis. Linolo rūgštis veiksmingai mažina lipidų kiekį kraujyje ir padeda sumažinti artritą [23]. Taip pat riebalų rūgštys turi stimuliuojantį poveikį grybų augimui ir biopolimerų gamybai grybuose [38].

Mokslinėje literatūroje minima, kad esančios riebalų rūgštys juodojo beržo grybe turi antioksidacinį, antimikrobinį, priešvėžinį poveikį [39]. Jame randama daug riebalų rūgščių, tokių kaip etilo dodekanoratas, oleino rūgštis, hidroksidozano rūgštis, hidroksitridoano rūgštis, hidroksitetrazano rūgštis, stearino rūgštis, linoleino rūgštis, palmitino rūgštis ir jos izomerai, vandenilio heksakozano rūgštis ar hidroksihenikozano rūgštis [40].

Mokslinėje literatūroje rašoma, kad paprastojoje poniabūdėje yra atrandama nesočiųjų riebalų rūgščių [10].

Arbatos grybo fermentuojame skystyje aptinkama linolio rūgšties, α -linolio rūgšties, palmitino rūgšties [41].

1.2.4. Mineralai

Grybai turi gerą mineralų mišinį. Grybus sudaro įvairūs mineralai, tokie kaip natris (Na), kalis (K), kalcis (Ca) ar fosforas (P). Tačiau nustatyta, kad grybuose, daugiausiai iš visų mineralų atrandama kalio [24].

Juodasis beržo grybas yra turintis gausų mikromineralų asortimentą, jame atrandama kalio (K), azoto (N), kalcio (Ca), magnio (Mg), chloro (Cl), fosforo (P), natrio (Na), rubidžio (Rb), sieros (S), mangano (Mn). Taip pat randama mikroelementų arba antioksidacinių mineralų, tokių kaip geležis (Fe), varis (Cu), cinkas (Zn), selenas (Se) ar jodas (I) [42].

Paprastojoje poniabūdėje randama įvairių mineralų, visgi didžiausias kiekis nustatytas kalio (K) mineralo, bet randama ir kalcio (Ca), geležies (Fe), magnio (Mg), cinko (Zn), vario (Cu), mangano (Mn) [43].

Arbatos grybo fermentuotas skystis turi daug mineralų, tokių kaip kalis (K), manganas (Mn), fluoro jonai (F⁻), kurie daugiausiai gaunami iš arbatos [44].

1.3. Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) bioaktyvieji junginiai

Grybų maistinės savybės ir juose esančių bioaktyvių junginių poveikis sveikatai sukuria pridėtinės vertės maistui. Šiuo metu mokslininkai labai domisi maisto bioaktyviosiomis medžiagomis, kurios daro teigiamą poveikį žmonėms sveikatos stiprinimo ir ligų rizikos mažinimo požiūriu. Grybai gali būti laikomi funkciniu maistu, kuris suteikia ne tik maistinės vertės, bet ir turi sveikatai pridėtinį savybių [23]. Antioksidacinių junginių šaltiniai tapo nauja perspektyva maisto srityje, kadangi tuo siekiama pakeisti sintetinius antioksidantus ir papildyti produktus bioaktyviais junginiais. Bioaktyvūs komponentai pritaikomi ne tik maisto srityje, bet puikiai pasitarnauja kosmetikos ir farmacijos srityse [45].

1.3.1. Juodojo beržo grybo (lot. *Inonotus obliquus*) bioaktyvieji junginiai

Juodojo beržo grybas turi įvairių bioaktyvių junginių, kurie prisideda prie jo naudingų savybių. Toliau pateikiami pagrindiniai bioaktyvūs junginiai ir jų potencialūs poveikiai:

Polifenoliai

Fenoliniai junginiai, kurie yra atrandami juodajame beržo grybe, susideda iš melaninų, flavanoidų, polifenolių ir mažų fenolinių junginių [46]. Juodasis beržo grybas turi įvairių polifenolių, kurie pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, radikalų surišimu [47], apsaugo žmogų nuo oksidacinio limfocitų DNR pažeidimo, turi priešūždegiminį bei priešnavikinį poveikį [48]. Juodasis beržo grybas turi melanino, kuris pasižymi praramagnetinėmis savybėmis [49]. Melaninas išgautas iš juodojo beržo grybo turi antioksidacinį, genoprotekcinį [50], priešūždegiminį ir imunomoduliacinį poveikį [51]. Taip pat melaninas naudojamas kaip prebiotikas bifidobakterijoms aktyvuoti, gali būti naudojamas kaip papildomas anglies ir azoto šaltinis bifidobakterijoms ir jame gausu baltymų bei polisacharidų [49].

Steroliai

Juodasis beržo grybas turi ergosterolio, kuris yra gausiausias sterolis randamas grybų ląstelių membranose bei yra laikomas vitamino D pirmtaku. Jis pasižymi imunoaktyvumu, sukeldamas užprogramuotą ląstelių mirtį šeimininko ląstelėse [52]. Nustatyta, kad ergosterolis taip pat turi priešnavikinių savybių [53]. Taip pat, kai kurie steroliai ir oksisteroliai yra labai susiję su įvairių genų transkripcijos reguliavimu imuninėse ląstelėse ir veikia kaip ligandai receptoriams, ekspresuojamiems imuninių ląstelių paviršiuje [54]. Tiksliai ergosterolio koncentracija juodajame beržo grybe nėra nustatyta.

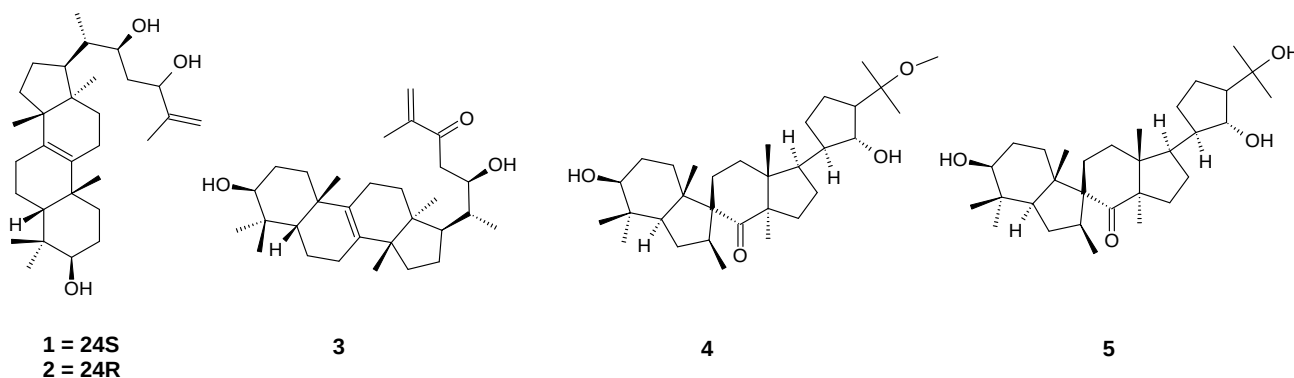
Organinės rūgštys

Juodajame beržo grybe aptinkama įvairių organinių rūgščių, tarp jų betulino [55] ir oksalo rūgščių [56]. Betulino rūgštis turi platų veikimo spektrą, ji veikia kaip nerimą ir stresą slopinanti [57], pasižymi priešvėžiniu, priešūždegiminiu bei antimaliariniu poveikiu [58]. Ištirta, kad oksalo rūgštis yra nustatyta pasižyminti antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ir *Streptococcus suis* bakterijų padermes [59]. Korėjos mokslininkai taip pat nustatė, kad oksalo rūgštis yra toksiškai veikianti prieš *Meloidogyne incognita*, ši rūgštis sukelia osmoreguliacijos sutrikimą ir skysčių kaupimąsi ląstelėse. Dėl šios priežasties nematodų ląstelės bei audiniai yra greitai sunaikinami [60].

Triterpenoidai

Juodasis beržo grybas turi triterpenoidų, tarp jų pagrindiniai – betulinas, betulino rūgštis, inotodiolis ir trametanolio rūgštis [61]. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad iš visų daugiausia yra inotodiolio, kuris pasižymi antialerginėmis savybėmis [62] ir sukelia žmogaus gimdos kaklelio vėžio, pelių leukemijos bei žmogaus plaučių vėžio ląstelių apoptozę. Kiti triterpenoidai taip pat pasižymi priešnavikiniu poveikiu. Vienas iš jų betulinas, kuris trukdo ląstelių metabolizmui, kepenų ląstelių karcinomai [63]. Betulinas taip pat naudojamas paviršinėms odos žaizdoms ir antrojo laipsnio nudegimo žaizdoms gydyti bei pasižymi antiproliferacinėmis savybėmis [51]. Kinijos mokslininkų išskirti triterpenoidai **1**, **2**, **3** (4 pav.) iš juodojo beržo grybo, pasižymėjo stipriu citotoksišku poveikiu prieš A549 naviko ląstelių liniją, kai IC₅₀ < 10 μM [64]. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad atlikus *in*

in vitro α -gliukozidazės slopinimo tyrimą, išskirti iš juodojo beržo triterpenoidai **4**, **5** (4 pav.) pasižymėjo stipriu aktyvumu, tai atitinkamai buvo $IC_{50}=42.2$ bei $IC=50.6$. Tai reiškia, kad šie išskirti **4**, **5** junginiai turi didelį potencialą kuriant antidiabetinius vaistus.



1.4 pav. Juodajame beržo grybe randami triterpenoidai

Vitaminai

Juodasis beržo grybas yra turtingas įvairių vitaminų šaltinis [65], tarp jų vitamino B grupės vitaminai B₁ (tiaminas), B₂ (riboflavinas), B₃ (niacinas) taip pat randama vitamino D₂ (ergokalciferolis) [42], K ir A [66].

1.3.2. Paprastosios poniabudės (lot. *Phallus impudicus*) bioaktyvieji junginiai

Paprastoji poniabudė turi daug įvairių bioaktyvių junginių, kurie yra perspektyvūs savo potencialu medicinos srityje [10] Keletas pagrindinių randamų bioaktyvių junginių ir jų potencialūs poveikiai:

Fenoliai junginiai

Fenoliniai junginiai yra antriniai grybų metabolitai. Polifenoliai buvo plačiai ištirti. Atlikus tyrimus įrodyta, kad jie yra veiksmingi gydant įvairias ligas, kadangi turi didelį antioksidacinį aktyvumą, priešvėžinį bei antiproliferacinį poveikį [67]. Apie paprastąją poniabudę mokslinėje literatūroje minima, kad jos sudėtyje yra fenolinių junginių ir jų bendras kiekis siekia 0,46 – 0,64 %, priklausomai nuo grybo vietos [14]. Joje randami fenoliniai junginiai, tokie kaip fenilacetaldehidas, 2-feniletanolis, benzilo alkoholis [68].

Steroliai

Paprastajoje poniabudėje randama ergosterolio ir ergosterolio peroksido, jie yra vitamino D pirmtakai ir turi priešuždegiminių, priešvėžinių, antimikrobinių, antiproliferacinių savybių [69]. Ergosterolis yra svarbus grybų ląstelių ir mitochondrijų membranų sterolis. Jis padeda palaikyti ląstelių membranų struktūrą, pralaidumą. Tinkamas ergosterolio kiekis ląstelėse yra svarbus norint išlaikyti normalias ląstelių funkcijas, tokias kaip: atsaką į aplinkos stresą, ląstelių detoksikaciją, maistinių medžiagų transportavimą ir šėimininko bei patogeno sąveiką. Taigi, ergosterolio biosintezė yra labai svarbi grybelių ląstelių augimui ir dauginimuisi [70]. Ergosterolis taip pat turi antihipertenzinių, imuninę sistemą moduluojančių, priešvėžinių, antibakterinių, antioksidacinių, antihipocholesteroleminių, antihiperglikeminių, antivirusinių, priešgrybelinių, priešuždegiminių ir antiosteoporozinių savybių [71]. Esančios tikslios ergosterolio ir ergosterolio peroksido koncentracijos mokslinėje literatūroje nenustatytos.

Toksinai

Paprastoji poniabudė gamina falotoksinus, kurie turi stiprių citotoksiškų savybių [72]. Jie slopina ląstelių dalijimąsi ir sukelia antiproliferacinį poveikį [73]. Svarbu paminėti, kad paprastoji poniabudė, dėl nemalonaus kvapo ir potencialaus toksiškumo, paprastai kaip maisto produktas – nevartojama. Tikslus falotoksinų kiekis paprastuojuje poniabudėje nėra nustatytas.

Vitaminai

Mokslinėje literatūroje yra stoka informacijos apie vitaminus, esančius paprastosios poniabudės grybe, tačiau minima, kad šis grybas turi tam tikrų vitaminų [10]. Galima daryti prielaidą, kad dėl esančio ergosterolio, kuris yra vitamino D pirmtakas, paprastoji poniabudė turėtų būti vitamino D šaltinis.

1.3.3. Arbatos grybo (lot. *Kombucha*) bioaktyvieji junginiai

Arbatos grybo fermentuojamame skystyje yra įvairių susidarančių bioaktyvių junginių. Pagrindiniai bioaktyvūs junginiai, kurie yra randami grybe, ir jų potencialūs poveikiai:

Polifenoliai

Arbatos grybo fermentuojamame skystyje susidaro įvairių polifenolinių junginių, tokių kaip flavanoidai [74], fenolinės rūgštys [75]. Šie polifenoliniai junginiai pasižymi antioksidaciniu [74], priešūždegiminiu, priešvėžiniu ir imuninę sistemą stiprinančiu poveikiu [76].

Organinės rūgštys

Arbatos grybo fermentuojamame skystyje susidaro pagrindinės acto, pieno, gliukono ir gliukurono organinės rūgštys. Šios esančios organinės rūgštys pasižymi antimikrobinio aktyvumu, organizmo detoksikacija, prisideda prie hormonų balanso išlaikymo [34]. Acto rūgštis susidaro dėl esančių *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans* bakterijų [77]. Acto rūgšties bakterijos gliukozę paverčia gliukono rūgštimi, o etanolį – acto rūgštimi [78]. Būtent acto rūgšties bakterijos suteikia arbatos gėrimui ir kitiems produktams acto skonį [77]. Nustatyta, kad ši rūgštis pasižymi antibakterinėmis savybėmis, nes organinės rūgšties molekulės gali sukelti citoplazmos rūgštėjimą [78], o tai sustabdo ląstelių augimą ir žudo bakterijas [79]. Acto rūgštis taip pat turi antioksidacinių [80], citotoksinių savybių ir mažina cholesterolio kiekį kraujyje [79]. Arbatos grybo fermentuojamame skystyje acto rūgšties bakterijos gamina gliukurono rūgštį. Ši rūgštis pasižymi hepatoprotekcinio ir detoksikuojančiu efektu, ji susijungia su toksiškais metabolitais ar atliekų produktais bei juos pašalina per šlapimą arba tulžį, atliekant gliukuronizaciją. Taip pat gliukurono rūgštis yra vitamino C pirmtakas bei atlieka esminį vaidmenį formuojant glikozaminoglikanus, pavyzdžiui, hepariną, haliurono rūgštį [81]. Arbatos grybo fermentuojamame skystyje, pieno rūgšties bakterijos fermentacijos metu, gaminama pieno rūgštis [82]. Ši rūgštis naudinga ne tik savo pridedamu skoniu maisto produktuose, bet ir turi naudingų sveikatai savybių, nes stiprina imuninę sistemą ir pasižymi antimikrobinio aktyvumu [83]. *D*-sacharino rūgštis–1,4-laktonas laikomas svarbiausiu arbatos grybo gėrimo komponentu. Šis junginys slopiną gliukuronidazės fermentą, kuris yra netiesiogiai susijęs su vėžiniais susirgimais, slopina apoptotinę kasos β -ląstelių mirtį, pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu ir geba sumažinti oksidacinę žalą [34].

Vitaminai

Yra atlikta daugybė mokslinių analizių apie vitaminus, randamus arbatos grybo fermentuojamame skystyje. Analizių metu nustatyta, kad šiame fermentuojamame skystyje randama vitaminų, tokių kaip folio rūgštis, vitaminas B [84], C [85], E, K buvimą šiame fermentuotame skystyje. Arbatos grybo fermentacijos metu vitaminų kiekis labai padidėja tiek dėl acto rūgšties bakterijų, tiek dėl pieno rūgšties bakterijų ir mielių metabolinio aktyvumo. Vitaminas C laikomas pagrindiniu arbatos grybo gėrimo vitaminu, kuris atsiranda dėl gliukozės metabolizmo. Jis pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu, stiprina imunitetą, didina geležies prieinamumą bei apsaugo nuo dantų ėduonies [34].

Bakteriocinai

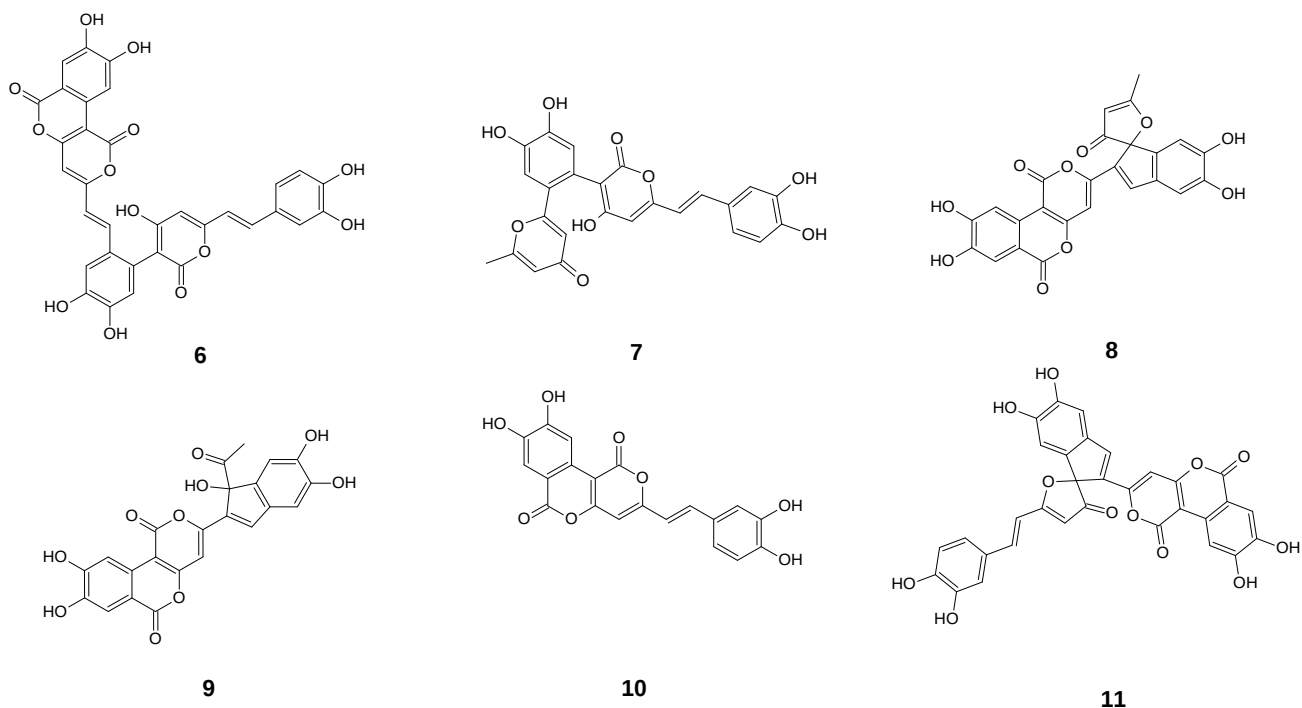
Fermentuotame arbatos grybo gėrime galime rasti bakteriocinų, bioaktyvių peptidų. Bakteriocinai yra mažos baltymų struktūros, kurios yra gaminamos *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Lactococcus spp.* ir *Leuconostoc spp.* pieno rūgšties bakterijų padermių. Bakteriocinai yra labai vertinami dėl savo saugumo, citoksiškumo nebuvimo ir tikslingo aktyvumo prieš konkrečią mikroorganizmų grupę [34]. Bioaktyvūs peptidai taip pat atlieka keletą reikšmingų funkcijų, pasižymi antioksidaciniu, priešuždegiminiu, priešvėžiniu, antimikrobiniu, imunomoduliaciniu ir antihipertenziniu poveikiu [86]. Bakteriocinas nizinas yra plačiausiai naudojamas maisto srityje, šis junginys yra veikiantis prieš gramteigiamas bakterijas, tokias kaip *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.* ir *Micrococcus luteus*. Taip pat žinomas *Leuconostoc mesenteroides* gaminamų bakteriocinų aktyvumas prieš *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* [34].

1.4. Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) funkcinės savybės ir nauda sveikatai

1.4.1. Antioksidacinės savybės

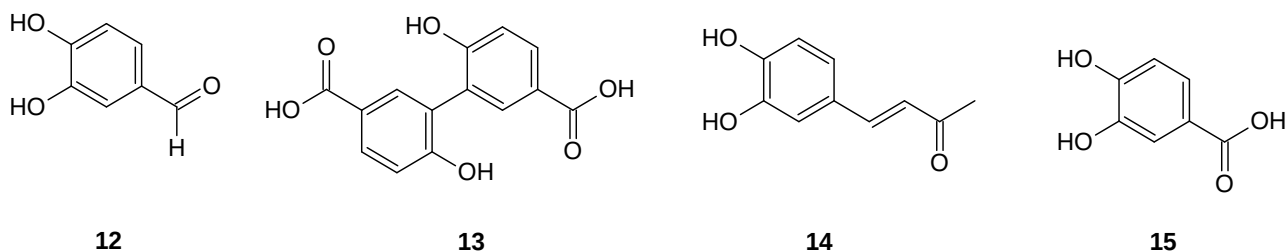
Literatūroje minima, kad augalų antioksidacinis aktyvumas yra atsakingas už gydomąjį poveikį įvairioms ligoms, tokioms kaip vėžiniai susirgimai, širdies ir kraujagyslių ligos bei diabetas [87]. Atsiranda vis daugiau mokslinės informacijos apie sintetinių antioksidantų šalutinius poveikius, tokius kaip kancerogenezė ir kepenų pažeidimai. Todėl bandoma atrasti kuo daugiau natūralių antioksidantų, kurie būtų kaip alternatyva sintetiniams junginiams ir galėtų apsaugoti žmogaus organizmą nuo laisvųjų radikalų be pašalinio poveikio [88]. Grybuose gausu antioksidantų, nes juose yra polisacharidų. Tyrimai parodė, kad grybai, kurių sudėtyje yra fenolio junginių, turi didelį antioksidantų potencialą. Kai kurių rūšių grybuose taip pat randama β -karotino ir linolo rūgšties, kurie slopina autooksidaciją [71]. Grybuose taip pat yra ergosterolio, kuris žinomas dėl veiksmingų antioksidacinių savybių [23].

Kinų mokslininkai teigia, kad atlikus tyrimus yra pastebėtas antioksidacinis aktyvumas polisachariduose, gautuose iš juodojo beržo grybo [89]. Taip pat kituose tyrimuose nustatyta keletas **6–11** polifenolinių junginių (1.5 pav.) iš juodojo beržo grybo, kurie nustatyti turintys stiprų antioksidacinį aktyvumą.



1.5 pav. Juodojo beržo grybo polifenoliniai junginiai

Korėjiečių mokslininkų išskirti polifenoliniai junginiai (1.6 pav.) iš juodojo beržo grybo, parodė puikų antioksidacinį aktyvumą. Junginys **12** parodė efektyvesnį laisvųjų radikalų slopinimą už sintetinius antioksidantus, BHA ($IC_{50}=154,4$) ir troloksą ($IC_{50}=113,2$), o junginių **13**, **14**, **15** efektyvumas buvo labai panašus į minėtus sintetinius antioksidantus [90].



1.6 pav. Antioksidantinį aktyvumą turintys polifenoliniai junginiai

Melanino junginiai pasižymi geru antioksidaciniu poveikiu. Dėl šios priežasties jis gali pašalinti deguonį iš terpės ir taip sudaryti tinkamas sąlygas būtinųjų anaerobinių bakterijų augimui [91]. Flavonoidai, polifenoliai, melaninai ir maži fenoliai gali sunaikinti laisvuosius radikalus, todėl teigiama, kad juodojo beržo grybas turi daug perspektyvų natūralių antioksidantų paieškose [92].

Mokslinėje literatūroje teigiama, kad paprastoji poniabudė turi antioksidacinių junginių, vienas pagrindinis jų – flavanoidai. Flavanoidai, rasti paprastosios poniabudės ekstraktuose, yra pasižymintys laisvųjų radikalų surišimu [93]. Taip pat mokslinėje literatūroje teigiama, kad paprastosios poniabudės ekstraktai, kuriuose yra polisachaidų, turi puikų potencialą dėl farmakologinio aktyvumo, tarp jų ir antioksidacinis poveikis [94].

Arbatos grybas fermentuodamas saldžią arbatą sudaro daug antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių. Tarp jų yra polifenoliai, vitaminai C, E, β -karotinas ir kiti karotenoidai. Taip pat buvo

pastebėtas fermentų aktyvumas, kuriuos išskiria bakterijos ir mielės, gėrimo fermentacijos metu. Šie fermentai suskaido kompleksinius polifenolius į mažas molekules ir padidina bendrą antioksidacinių junginių kiekį [95]. Taip pat yra žinoma, kad fermentacijoje dalyvauja antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčios pieno rūgšties bakterijos ir jų produktai [34].

Visi šie grybai turi antioksidacinį poveikį dėl įvairių bioaktyvių junginių buvimo. Šios antioksidacinės savybės gali prisidėti prie naujų natūralių antioksidantų paieškos, kurie apsaugo žmogaus organizmą nuo laisvųjų radikalų ir taip stabdo daugelio lėtinių ligų progresavimą [96].

1.4.2. Antibakterinės savybės

Grybai pasižymi antibakteriniu poveikiu, nes juose yra daug fenolinių ir alkaloidinių junginių. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad grybai yra veiksmingi prieš daugybę skirtingų bakterijų patogenų padermių, sukeliančių įvairias žmonių ligas. Taip pat pastebėta, kad grybai kovoja su įvairiais mikroorganizmais ir juos naikina [23].

Keletas Serbijos, Portugalijos ir Olandijos mokslininkų atliko iš skirtingų regionų gautų juodojo beržo ekstraktų antibakterinius tyrimus. Tyrinėtos geografinės lokacijos – Suomija, Rusija, Tailandas. Mėginys iš Rusijos pasižymėjo didžiausiu antibakteriniu aktyvumu. Ekstraktams jautriausios bakterijos buvo *Staphylococcus aureus* ir *Bacillus cereus*, o atspariausios – *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ir *Enterobacter cloacae*. Visų tirtų ekstraktų antibakterinis aktyvumas buvo mažesnis nei kontroliniai antibiotikai, išskyrus etanolinį ekstraktą iš Tailando prieš *Pseudomonas aeruginosa*, šis gautas ekstraktas parodė didžiausią antibakterinį pranašumą [97]. Taip pat, kitų mokslininkų teigimu, juodojo beržo grybo ekstraktai turi gerą antibakterinį poveikį daugeliui *Mycobacterium smegmatis* ir *Francisella tularensis* padermių. Todėl šie ekstraktai gali būti puikiai pritaikomi stomatologijoje, gydant danties kietųjų audinių eroziją ar burnos ertmės gleivinės bakteriniams uždegimams gydyti [98].

Apie paprastąją poniabudę yra užsimena ir Ukrainos mokslininkai. Jie teigia, kad dėl aktyvių junginių buvimo, ji pasižymi antibakteriniu poveikiu [93]. Atliktuose Minsko mokslininkų tyrimuose pastebėtas paprastosios poniabudės etanolinių ekstraktų antimikrobinis poveikis prieš *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus mycoides*, *Sarcina lutea*. Didžiausias antibakterinis aktyvumas pastebėtas prieš *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea* [99].

Arbatos grybo fermentuojamas gėrimas buvo žinomas dėl savo stiprių antimikrobinių savybių prieš daugelį patogeninių organizmų. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad daugelis komponentų, tokių kaip organinės rūgštys, bakteriocinai, baltymai, fermentai, arbatos polifenoliai ir jų dariniai, kurie susiformuoja fermentacijos metu, prisideda prie antibakterinio aktyvumo. Arbatos grybo fermentuota arbata pasižymi stipriu antibakteriniu poveikiu prieš enteropatogenines bakterijas, tokias kaip *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* dėl bendros polifenolinių medžiagų sąveikos. Didžiausias slopinimas nustatytas prieš *Escherichia coli*, kur slopinimo zona siekė 20,67 mm [100]. Mokslinėje literatūroje taip pat užsimenama apie arbatos grybo fermentuojamo gėrimo antibakterinį poveikį prieš *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų padermes [101]. Irano mokslininkai teigia, kad aptikti polifenoliai katechinas ir izorhamnetinas buvo pagrindiniai atrasti antibakteriniai junginiai. Minima, kad antibakteriniam aktyvumui, kaip ir kitoms

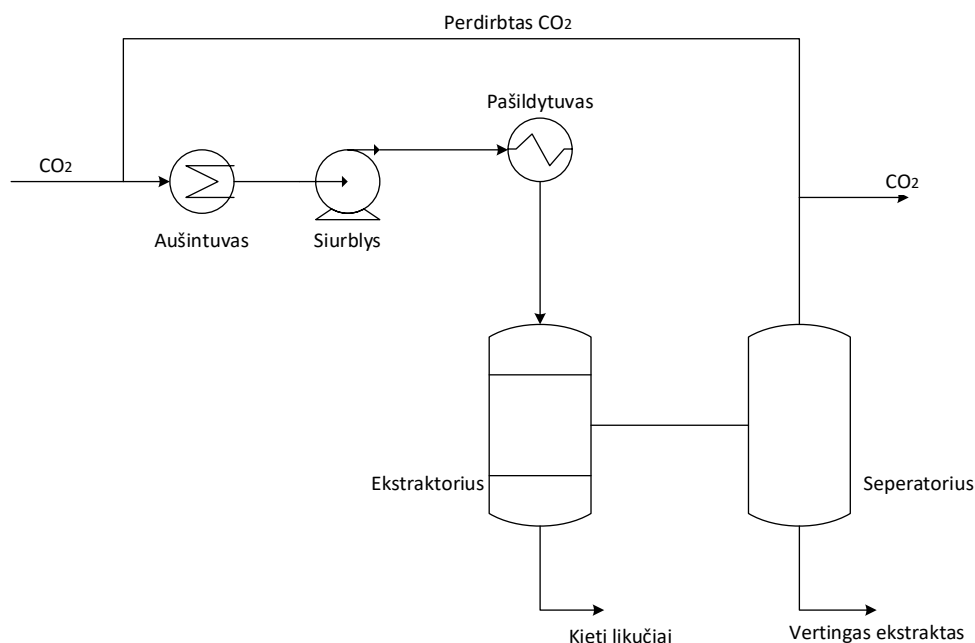
savybėms, įtakos turi įvairūs papildomi faktoriai, tokie kaip arbatos rūšies pasirinkimas, pavyzdžiui, žalioji ar juodoji arbata [102]. Taip pat mokslininkai iš Selangoro pareiškė, kad antimikrobiniam aktyvumui įtakos turi fermentacijos laikas ir terpės pokyčiai [103].

Grybai turi daug antibakterinių junginių. Juodasis beržo grybas, paprastoji poniabudė, arbatos grybas nėra išimtis, jie taip pat turi antibakterinių savybių turinčių junginių, kurie labai naudingi gaminant vertingus antibiotinius vaistus farmacijos srityje [104].

1.5. Veikliųjų junginių išskyrimo metodai

1.5.1. Superkryzinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂)

Per pastaruosius kelis dešimtmečius vis labiau didėja susidomėjimas bioaktyvių junginių ekstrahavimo ir izoliavimo metodikomis, kurios naudojamos maisto, kosmetikos ir įvairiose kitose srityse [105]. Superkryzinis ekstrahavimo metodas yra pakankamai nauja ekstrahavimo technika, kurioje naudojamas superkryzinis tirpiklis medžiagoms ekstrahuoti ir atskirti. Tiek superkryzinio skysčio temperatūra, tiek slėgis yra aukštesni už kritinį tašką. Superkryzinio skysčio ekstrakcija su CO₂ tirpikliu yra dažnai naudojama įvairioms nepolinėms ir silpnai polinėms medžiagoms išgauti iš augalinių žaliavų [106]. Superkryzinio ekstrahavimo procese superkryzinėmis sąlygomis naudojamas tirpiklis, kuris skirtas atskirti ekstrahentą nuo matricos, o ji paprastai yra kieta, bet gali būti skysta ar net klampi. Keičiant skysčio tankį atsiranda galimybė keisti proceso selektyvumą, o tai yra pagrindinis superkryzinio ekstrahavimo proceso privalumas [107]. Tai efektyvi technika, kuri nesukelia kenksmingo poveikio aplinkai ir suteikia galimybę išgauti didelio selektyvumo bei grynumo medžiagas [108]. Šioje ekstrakcijoje CO₂ atlieka tirpiklio funkciją, kuris virsta superkryziniu skysčiu veikiant padidintam slėgiui ir temperatūrai. Superkryzinėmis sąlygomis CO₂ tirpiklis teka per žaliavą į ekstraktorių ir išgauna iš žaliavos tirpius junginius. Tirpiklis kartu su ekstraktu pasišalina iš ekstraktoriaus ir patenka į atskyrimo indą, kuriame dėl sumažinto slėgio bei temperatūros ekstraktas nusėda, o CO₂ grįžta į dujų pavidalą (1.6 pav.) [107].

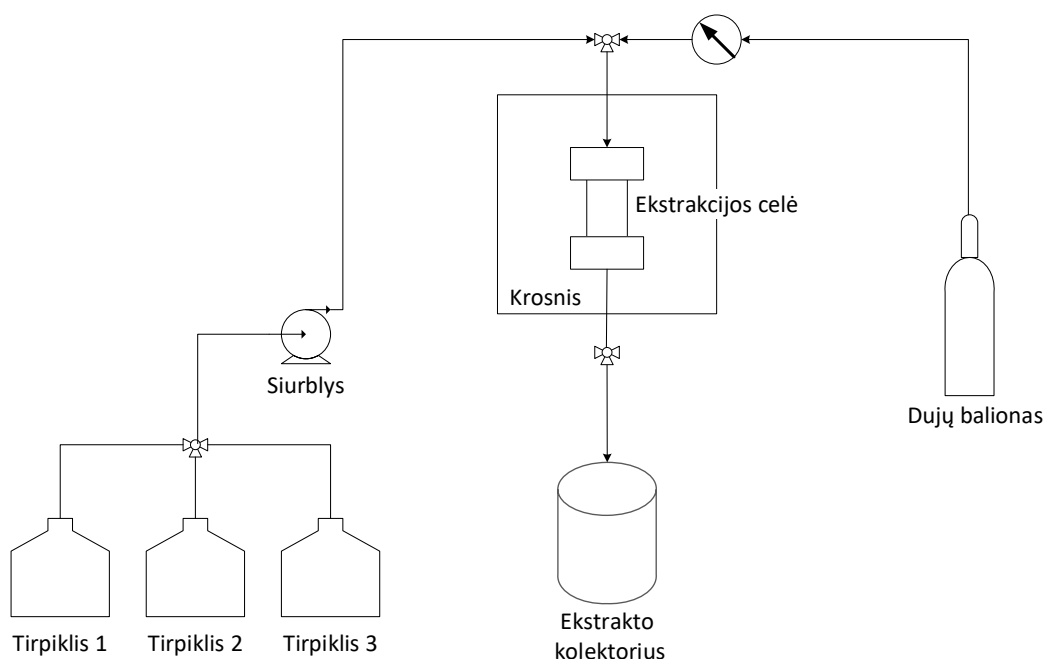


1.7 pav. Superkritinės ekstrakcijos principinė schema

Ekstrahavimo metodas superkritiniu CO₂ turi keletą pranašumų lyginant su kitais ekstrahavimo metodais, dėl gebėjimo išgauti platų medžiagų spektrą ir gebėjimo išgauti medžiagas mažose temperatūrose. Taip pat šis procesas turi didelį selektyvumą [109], mažą toksiškumą [110] ir leidžia atkurti bei pakartotinai panaudoti CO₂. Dėl pakartotinio CO₂ panaudojimo tai yra tvarus ir ekonomiškasis procesas [111]. Superkritinių skysčių minusai yra tokie, kad šio proceso įranga yra labai brangi ir sudėtinga, neišgaunamos polinės medžiagos bei sunaudojamas didelis energijos kiekis [112]. Moksliniai tyrimai parodė, kad naudojant superkritinę CO₂ ekstrakciją, iš augalinių medžiagų galima išgauti įvairius junginius, tokius kaip antioksidacinius junginius [107], eterinius aliejus, lipidus, karotinoidus [111], natūralius pigmentus [113] ir kitus bioaktyvius junginius. Mokslinėje literatūroje apžvelgiami konkretūs pavyzdžiai, kuriuose pritaikoma superkritinė CO₂ ekstrakcija: pigmentų ekstrahavimas iš dumblių [114], eterinio aliejaus gavimas iš kraujažolių (lot. *Achillea millefolium*) žiedų, kurio ekstraktai pritaikomi medicinoje bei gėrimų srityse [115], kofeino išskyrimas iš kavos pupelių, kurio ekstraktas gali būti pritaikomas gėrimų srityje, farmacijoje arba kaip sudedamoji dalis kosmetikos srityje [116].

1.5.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS)

Taip pat dažnai sutinkamas bioaktyvių komponentų išgavimo procesas – ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje. Šioje technologijoje naudojami skysti tirpikliai, pavyzdžiui, heksanas, etanolis ar acetonas [117]. Šis ekstrahavimo metodas pasižymi dideliu našumu, ekologiškumu ir tvarumu [118]. Šios ekstrakcijos metu naudojamas tirpiklis yra kaitinamas ir slėgiamas virš jo virimo taško, kad išlaikytų savo skystą būseną, leistų efektyviai prasiskverbti į mėginio celę bei išgauti tikslines medžiagas. Procesu metu ėminys dedamas į ekstrahavimo celę, pagamintą iš nerūdijančio plieno. Pripildžius celę pasirinktu tirpikliu, sukliamas slėgis ir kaitinama iki norimos temperatūros, tuomet mėginys paliekamas ekstrahuotis statiskai. Pasibaigus laikui, ekstraktas pašalinamas iš celės ir celė praplaunama šviežiu tirpikliu. Ciklas gali būti kartojamas keletą kartų. Kai ekstrahavimas baigtas, suslėgtas azotas perkelia visą tirpiklį iš celės į surinkimo indą. Ekstraktas filtruojamas prieš surenkant jį į imtuvą, todėl atskiro filtravimo etapo nereikia (1.7 pav.) [119].



1.8 pav. Ekstrakcijos suspaustais skysčiais principinė schema

Lyginant su klasikiniais metodais, šis ekstrahavimo metodas turi keletą pranašumų: mažesnės energijos sąnaudos, trumpesnis ekstrahavimo laikas, mažesnis tirpiklio kiekio suvartojimas [120]. Be to, ETPS skatina junginių išsiskyrimą iš kietų ir mechanškai atsparių augalų audinių bei junginių, kurie sudaro stiprius ryšius su ligninu [121]. Taip pat ETPS metodas leidžia naudoti skirtingo poliškumo tirpiklius, pasirenkant kokio poliškumo ir tirpumo medžiagos bandomos išgauti [122]. Mokslinėje literatūroje apžvelgiami konkretūs pavyzdžiai su ETPS panaudojimu: flavanoidų gavimas iš natūralių šaltinių [123], gaunamos β -gliukanų, chitino ir fenoliu praturtintos frakcijos, naudojant vandenį / etanolį, iš *T. aestivum* ir *T. claveryi* trumų, kurie yra potencialūs bioaktyvių junginių šaltiniai [124]; aromatinių komponentų išskyrimui iš vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris*), efektyviausia naudojant etilo acetatą, kurie pritaikomi kaip tinkami komponentai gerklės pastilėse, dantų higienos produktuose, odos kremuose ir tepaluose [125]; aukštos kokybės lipidų gavimui iš *Laminaria ochroleuca* dumblių, efektyviausia naudojant etanolio ir etilo acetato tirpiklius, šie gauti ekstraktai puikiai pritaikomi vegetarams bei veganams kaip tinkamas sveikųjų riebalų šaltinis ar maisto papildas, nes turi panašumų į kai kurias žuvų rūšis [126].

1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Juodasis beržo grybas (lot. *Inonotus obliquus*), paprastoji poniabudė (lot. *Phallus impudicus*), arbatos grybas (lot. *Kombucha*) nuo senų laikų garsėja savo medicininėmis savybėmis. Juose gausiai randama įvairių bioaktyvių komponentų, pavyzdžiui, fenolinių junginių, angliavandenių, vitaminų, organinių rūgščių. Šie grybai pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis ir prisideda prie farmakologinio poveikio žmogaus sveikatai, kadangi jie turi antioksidacinį, antibakterinį, priešvėžinį bei imonumoduliuojantį poveikį. Dėl šių priežasčių minėtieji grybai turi ypač didelių perspektyvų farmacijos, medicinos bei kosmetikos srityse. Superkrintinė ekstrakcija anglies dvideginiu bei tirpikliais padidintame slėgyje – naujos technologijos, kurios leidžia išgauti ekstraktus efektyviai ir tvariai.

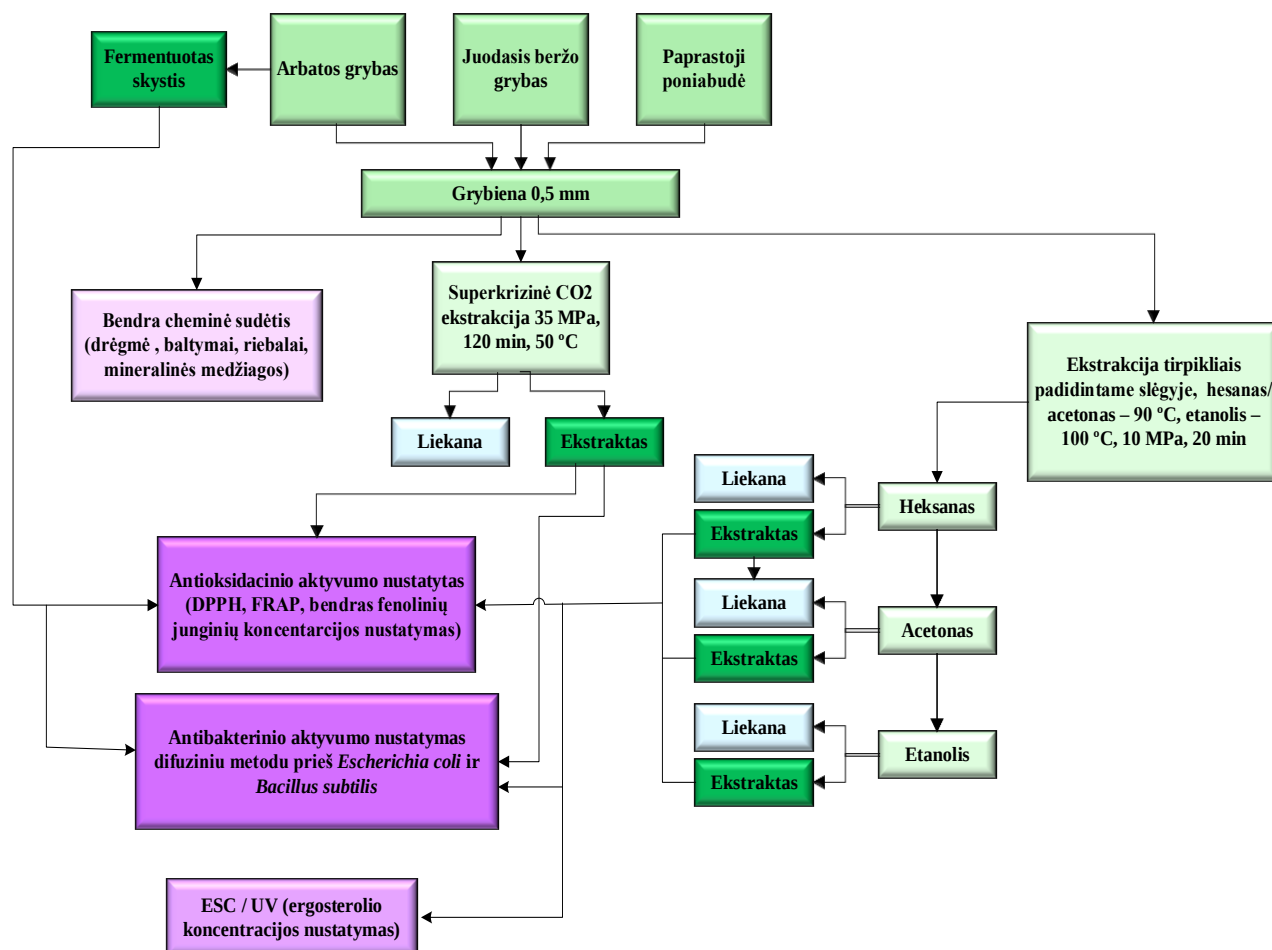
Taigi, dėl didelio antioksidacinių, antibakterinių, bioaktyvių junginių trūkumo, svarbu ieškoti naujų būdų kaip juos išgauti natūralių šaltinių. Grybai didelį potencialą turinti sritis, kuri puikiai gali būti tam pritaikoma, tačiau norint pasiekti tikslą, reikalinga atlikti daugiau mokslinių tyrimų apie bioaktyvių medžiagų išskyrimą bei jų savybes.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Biologinių savybių tyrimai atlikti Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakulteto laboratorijose.

Remiantis moksline literatūra ir joje atliktais tyrimais, nustatytas platus grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) biologinis aktyvumas. Šiame darbe nustatyti grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) cheminės sudėties rodikliai, atlikti keli skirtingi ekstraktų gavimo metodai, taikant SKE–CO₂ ir ETPS metodus. Taip pat atlikti gautų ekstraktų biologinių savybių tyrimai: nustatytos gautų ekstraktų antioksidacinės ir antibakterinės savybės bei įvertinta ergosterolio koncentracija ekstraktuose, išskirtuose ETPS metodu (2.1 pav.).

Analizėms naudotas juodasis beržo grybas (lot. *Inonotus obliquus*), paprastoji poniabudė (lot. *Phallus impudicus*), kurie rasti Lietuvoje. Arbatos grybas (lot. *Kombucha*) užaugintas namų sąlygomis, vykdant žaliosios arbatos fermentaciją su cukrumi. Prieš tyrimus grybai išdžiovinti taikant skirtingus metodus: juodojo beržo ir arbatos grybų mėginiai džiovinti šalčiu – liofilizuojant, o paprastosios poniabudės grybo mėginys išdžiovintas tamsoje, kambario temperatūroje. Džiovinti mėginiai susmulkinti laboratoriniu malūnu iki $\leq 0,5$ mm dalelių dydžio.



2.1 pav. Bandinių rafinavimo metodai ir tyrimų schema

2.1. Cheminės sudėties komponentų nustatymo metodai

2.1.1. Cheminiai reagentai ir medžiagos

Tyrimams naudoti tirpikliai:

- heksanas (C_6H_{14});
- acetonas (C_3H_6O);
- etanolis (C_2H_5OH);
- suspaustas CO_2 (99,9 %);
- metanolis (chromatografinės klasės);
- acetonitrilas (chromatografinės klasės);
- ultra švarus vanduo.

Naudoti reagentai:

- koncentruota sieros rūgštis (H_2SO_4);
- kalio sulfatas (K_2SO_4);
- vandenilio peroksidas (H_2O_2);
- natrio hidroksidas ($NaOH$);
- boro rūgštis (H_3BO_3);
- druskos rūgštis (HCl);
- dimetilsulfoksidas (DMSO);
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH);
- 300 mM acetato buferinis tirpalas ($pH = 3,6$);
- 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl ;
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mmol/l), 2000 $\mu mol/l$ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Folin-Ciocalteu reagentas (1 N);
- natrio karbonatas (Na_2CO_3);
- polivinilpolipirolidonas;
- standartinis tanino rūgšties tirpalas (0,1 mg/ml);
- natrio chloridas ($NaCl$);
- triptonas, mielių ekstraktas;
- mikro agaras;
- *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų suspensijos;
- tertrabutilo hidrochinonas (TBHQ);
- kalio hidroksidas (KOH);
- ergosterolis (sertifikuota etaloninė medžiaga).

Tyrimams naudota aparatūra ir įrenginiai:

- laboratorinis malūnas ZM 200 (Retsch, Haan, Vokietija);
- liofilizatorius (Maxi Dry Lyo, Danija);
- „Supercritical Fluid Technologies“ (*Supercritical fluid technologies* INC Model SFT-110, Newark, JAV) ekstrakcijos sistema;
- Dionex ASE 350 ekstrakcijos sistema (Dionex, Sunnyvale, JAV);
- vakuuminis – rotacinis garintuvas (Biuchi labortechnik AG, Šveicarija);
- autoklavas „Certoclav“;
- spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“;

- laminaras „Teostar BV-100“;
- termostatas „Binder“;
- termostatuojama vonelė „Biosan“;
- centrifuga „Universal 320R“;
- pH- metras „Winlab“;
- svarstyklės „Shimadzu“;
- „Water Alliance 2695 Separation Module“ chromatografijos sistema;
- „Waters Symmetry“ (Milford, MA, USA) RP C18 kolona (75 x 4.6 mm, 3,5 mm);
- 2487 UV detektorius (Milford, MA, USA).

2.1.2. Drėgmės kiekio nustatymas

Likutinė drėgmė nustatyta 105 °C temperatūroje standartiniu metodu iki pastovios masės. Prieš bandymą biuksai su dangteliais valandą laiko iškaitinami 105 °C temperatūroje. Praėjus valandai, atvėsunami 30 minučių eksikatoriuje ir pasveriami 0,0001 g tikslumu. Tuo pačiu tikslumu pasveriamas biuksas su 2 g džiovinto grybo bandiniu. Ėminys biukse tolygiai paskirstomas dugno paviršiuje vienodo storio sluoksniu. Biuksai su grybo bandiniais džiovinami 105 °C temperatūroje. Džiovinimas yra stabdomas, kai svoriu nusistovi pastovi svorio masė. Po kaitinimo biuksai su bandiniu atvėsunami 30 minučių eksikatoriuje ir pasveriami 0,0001 g tikslumu. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatuose pateikiama vidurkio reikšmė.

Bandinio drėgmės kiekiui (%) apskaičiuoti naudojama formulė (2.1):

$$x = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} \times 100, \% \quad (2.1);$$

čia:

m_1 – biukso su dangčiu masė, g;

m_2 – svėrimo lėkštelės su dangčiu ir ėminio masė prieš džiovinimą, g;

m_3 – svėrimo lėkštelės su dangčiu ir ėminio masė po džiovinimo, g [127].

2.1.3. Baltymų kiekio nustatymas Kjeldalio metodu

Baltymų kiekio nustatymui naudojamas Kjeldalio metodas. 1883m. jį sukūrė Johanas Kjeldahlas. Šis metodas apima trijų etapų baltymų kiekio nustatymo būdus: mineralizavimą, distiliavimą ir titravimą. Organinės medžiagos mineralizuojamos naudojant koncentruotą H_2SO_4 , šilumą, K_2SO_4 (virimo temperatūrai pakelti) ir katalizatorių H_2O_2 reakcijai paspartinti. Šis procesas mėginyje esantį azotą paverčia amonio sulfatu. Distiliuojant neutralizuojama pridėjus NaOH, kuris amonio sulfatą paverčia amoniaku, vėliau jis distiliuojamas ir surenkamas boro rūgštimi. Distiliatas titruojamas druskos rūgštimi, o pagal rūgšties sunaudotą kiekį apskaičiuojamas išsiskyręs amoniako kiekis [128]. Apskaičiavus gaunamas bendras azotinių medžiagų kiekis. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatuose pateikiama vidurkio reikšmė. Azoto kiekis (%), kuris išsiskyrė bandinyje, apskaičiuojamas pagal formulę (2.2):

$$x = \frac{1,4 \times n \times k \times (V_1 - V_0)}{m} \quad (2.2);$$

čia:

1.4 – azoto kiekis, kurį sujungia 1 ml 0,1 n HCl;

K – HCl tirpalo pataisos koeficientas;
n – HCl normalingumas 0,1 N;
m – analizuojamos medžiagos kiekis;
 V_1 – 0,1N HCl kiekis sunaudotas mėginiui titruoti;
 V_0 – 0,1N HCl kiekis sunaudotas kontrolei titruoti.

Baltymų kiekis yra apskaičiuojamas pagal gautą azoto kiekį, kuris padauginamas iš perskaičiavimo koeficiento (5,7). Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatuose pateikiama vidurkio reikšmė [131].

2.1.4. Riebalų kiekio nustatymas

Riebalų kiekis džiovintų grybų bandiniuose nustatomas Soksleto metodu. Iki pastovios masės išdžiovinti bandiniai supakuojami į filtro popierinius paketėlius. Šie paketėliai su bandiniu yra pasveriami 0,0001 g tikslumu. Paketėliai sudedami į Soksleto aparato antgalį, kuris turi grįžtamąjį kondensatorių ir yra sujungiamas su kolba šildoma iš apačios, kurioje yra nepolinis heksano tirpiklis. Kaitinamas heksanas pradeda garuoti, o kondensuoti garai kaupiasi ant paketėlio. Kai tirpiklis praeina pro mėginį, jis ištraukia riebalus ir perneša juos į kolbą. Tokiu būdu yra išekstrahuojami riebalai, kurie yra džiovintame grybų bandinyje. Ekstrakcija trunka 3 valandas, po kurių paketėliai pašalinami iš Soksleto aparato ir dedami džiovinti į džiovinimo spintą 30 minučių, palaikant 105 °C temperatūrą. Išdžiovinti paketėliai iki pastovios masės atvėsunami eksikatoriuje ir sveriami 0,0001 g tikslumu. Riebalų kiekis bandinyje yra apskaičiuojamas svorio skirtumu prieš ir po ekstrakcijos. Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatuose pateikiama vidurkio reikšmė.

Šis metodas yra vienas iš dažniausiai naudojamų, kadangi jo atlikimas nesudėtingas ir nereikalaujantis sudėtingos įrangos. Tačiau yra neišvengiama tam tikrų trūkumų, kadangi metodo taikymo metu naudojami pavojingi ir degūs organiniai tirpikliai, galimas toksinių junginių išmetimas ekstrahavimo metu, brangesnis bei didesnio grynumo tirpiklių naudojimas, daug etapų sudarančios procedūros, taipogi tai daug laiko reikalaujantis metodas [129].

2.1.5. Mineralinių medžiagų kiekio nustatymas

Prieš naudojimą, tušti tigliai iškaitinami krosnyje 550 °C temperatūroje valandą laiko. Po iškaitinimo tigliai atvėsunami 5–10 minučių ant karščiui atsparios plokštės. Praėjus šiam laikui, jie pernešami į eksikatorių, kuriame paliekami atvėsti iki kambario temperatūros. Atvėsę tigliai pasveriami 0,0001 g tikslumu. Tokiu pat tikslumu į iškaitintus tiglius atsveriamas 1 g sauso grybo mėginio. Mėginys paskirstomas taip, kad ant indo dugno pasidengtų vienodo sluoksnio storio. Tigliai su bandiniu sudedami į vėsią mufelinę krosnį ir pradedami kaitinti sudarytu režimu:

- Tiglis su bandiniu kaitinamas, kol medžiaga apanglėja, parausta ir nustoja rūkti dūmai;
- Apdegintas bandinys dedamas į mufelinę krosnį ir deginamas 600 °C temperatūroje 2–3 valandas;
- Po mineralizacijos mėginys atvėsinaamas iki 150 °C temperatūros ant karščiui atsparios plokštės, vėliau dedamas į eksikatorių ir atvėsinaamas iki kambario temperatūros;
- Atvėsęs tiglis su bandinio pelenais sveriamas 0,0001 g tikslumu.

Pelenų kiekis (%) apskaičiuojamas pagal šią formulę (2.3):

$$x = \frac{(m_2 - m) \times 100}{m_1 - m} \quad (2.3);$$

čia:

m – tuščios tiglio masė, g;

m₁ – tiglio su bandiniu masė, g;

m₂ – tiglio su pelenais masė, g [127].

Atlikti trys bandymų pakartojimai ir rezultatuose pateikiama vidurkio reikšmė.

2.1.6. Angliavandenių kiekio apskaičiavimas

Angliavandenių kiekis (%) apskaičiuojamas pagal formulę (2.4):

$$A = 100 - B - R - M - D \quad (2.4);$$

čia:

B – baltymų kiekis, %;

R – riebalų kiekis, %;

M – mineralinių medžiagų kiekis, %;

D – drėgmės kiekis, %.

2.2. Ekstraktų gamyba

2.2.1. Superkrizinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE-CO₂)

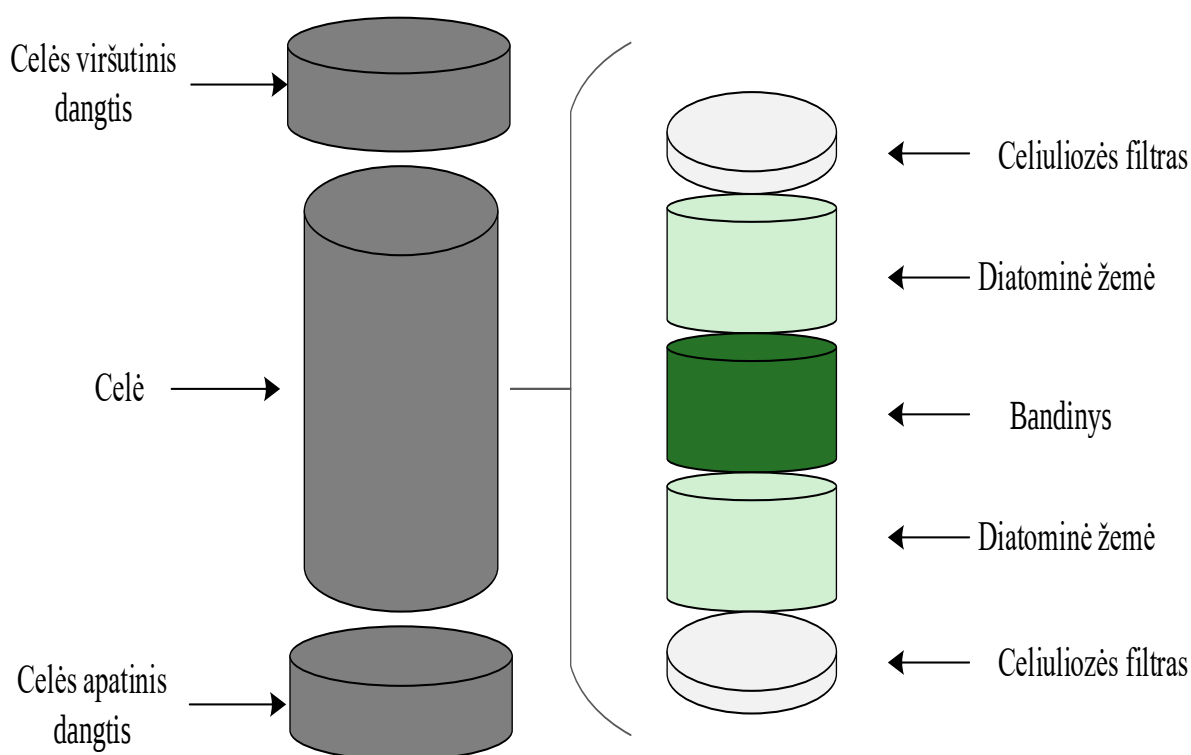
Ekstrakcija atliekama naudojant „Supercritical Fluid Technologies“ (*Supercritical fluid technologies INC Model SFT-110*, Newark, JAV) ekstrakcijos sistemą. Papildomai su bandiniu sumaišoma diatominė žemė, siekiant padidinti ekstrakcijos proceso tolygumą ir išvengti celės užsikimšimo. Bandinys sudedamas į 50 ml celę. Naudoti bandinio kiekiai: juodasis beržo grybas – 11 g, paprastoji poniabudė – 20 g, arbatos grybas – 10 g. Ekstrakcijoje naudotos 350 bar slėgis ir 50 °C temperatūra. CO₂ srautas laikomas vienodas (2 l/min). Sudaroma ekstrakcijos kinetikos kreivė, naudojant šią kreivę nustatomas ekstrakcijos laiko stabilizavimasis ir taip parenkama optimali kitų mėginių ekstrahavimo trukmė. Išskirti ekstraktai surenkami stikliniuose buteliukuose, kurie yra sveriami prieš ir po ekstrakcijos, naudojant analitines svarstyklės ir apskaičiuojamos išeigos (%). Ekstraktai surenkami į sandarius rudo stiklo buteliukus ir laikomi šaldytuve (0 - 4°C) iki tolimesnių tyrimų. Atsižvelgiant į turimo mėginio kiekį atlikta 2-3 ekstrakcijų pakartojimai [130].

2.2.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS)

Ekstrakcija tirpikliais įvykdyta naudojant *Dionex ASE 350* sistemą (Dionex, Sunnyvale, JAV). Ekstrakcijos procesas atliktas subkrizinėmis sąlygomis naudojant skirtingo poliškumo organinius tirpiklius viršijant jų virimo temperatūrą bei taikant aukštą slėgį, kad tirpiklis nepereitų į garų fazę. Šios ekstrakcijos proceso sąlygos užtikrina, kad iš mėginio būtų greitai ir efektyviai išgaunami skirtingo poliškumo junginiai. Kiekvienam bandiniui naudojami trys skirtingo poliškumo tirpikliai – heksanas, acetonas bei etanolis. Grybai ekstrahuojami pakopomis – nuosekliai didėjančio poliškumo organiniais tirpikliais: heksanas → acetonas → etanolis. Ekstrakcija su kiekvienu tirpikliu atliekama vienu ekstrakcijos ciklu, esant 10 MPa slėgiui, 20 min ekstrakcijos trukmei, 120 % praplovimui.

Taikyta temperatūra pagal tirpiklį: heksanas / acetonas – 90 °C, etanolis – 100 °C. Ekstrakcijos trukmė bei temperatūra parinkti pagal kitų autorių taikytus optimalius ekstrakcijos proceso parametrus su kitos rūšies grybais [131].

Naudoti bandinio kiekiai: juodasis beržo grybas – 8–9,5 g, paprastoji poniabudė – 11 g, arbatos grybas – 8,2–9,3 g. Celė užpildoma sausu bandiniu su diatomine žeme (2.2 pav.), abu celės galai (viršus / apačia) užfiksuojami su celiuliozės filtrais (*ThermoFisher Scientific*, Vilnius, Lietuva). Paruošta celė įkeliama į ekstraktoriaus „krosnį“ ir užpildoma pasirinktu tirpikliu. Celė kaitinama iki pasirinktos temperatūros, suslegiama ir laikoma atitinkamą laiką sudarytame slėgyje. Pasibaigus procesui, bandinys ir tirpiklis su siurbliu išvalomas: iš celės praplaunant ekstrahavimo celę tirpikliu bei inertinėmis azoto dujomis į surinkimo indą. Pasibaigus ekstrakcijai, tirpikliai nuo ekstraktų atskiriami rotaciniu garintuvu 40 °C temperatūroje ir pabaigiami džiovinti inertinėmis azoto dujomis. Ekstraktai surenkami į sandarius rudus buteliukus ir laikomi šaldytuve (0 - 4°C) iki tolimesnių tyrimų. Atlikti trys ekstrakcijų pakartojimai ir rezultatuose pateikiama vidurkio reikšmė.



2.2 pav. Celės sandara

2.3. Ekstraktų *in vitro* antioksidacinio aktyvumo ir antibakterinio potencialo nustatymas

2.3.1. Bandinių paruošimas

Visi gauti 1–12 ekstraktai, išgauti naudojantis superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu (SKE–CO₂) ir pakopinės ekstrakcijos didėjančio poliškumo tirpikliais padidintame slėgyje (ETPS), bei liofilizuotas arbatos grybo 13 bandinys (2.1 lentelė), buvo ištirpinti DMSO tirpale, kurių koncentracija atitiko 1 mg/ml.

2.1 lentelė. Bandinių numeracija ir pavadinimai.

Bandinio numeris	Bandinio pavadinimas
1	Juodasis beržo grybas (SKE–CO ₂)
2	Juodasis beržo grybas (ETPS / heksanas)
3	Juodasis beržo grybas (ETPS / acetonas)
4	Juodasis beržo grybas (ETPS / etanolis)
5	Paprastoji poniabudė (SKE–CO ₂)
6	Paprastoji poniabudė (ETPS / heksanas)
7	Paprastoji poniabudė (ETPS / acetonas)
8	Paprastoji poniabudė (ETPS / etanolis)
9	Arbatos grybas (SKE–CO ₂)
10	Arbatos grybas (ETPS / heksanas)
11	Arbatos grybas (ETPS / acetonas)
12	Arbatos grybas (ETPS / etanolis)
13	Arbatos grybo fermentuotas skystis (liofilizuotas)

2.3.2. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH[•] metodu

DPPH[•] laisvųjų radikalų sujungimo geba išmatuojama spektrofotometriškai pagal modifikuotą Brand-Williams, Cuvelier ir Berset (1995) metodiką [130]. Etaloninis DPPH tirpalas pagaminamas 0,0039 g DPPH radikalo tirpinant etanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje. Į 0,5 ml DMSO ištirpintų tiriamųjų **1–13** bandinių (0,5–1 mg/ml) įpilama 0,5 ml paruošto DPPH tirpalo. Palyginamajam tirpalui naudota 0,5 ml DMSO ir 0,5 ml DPPH[•] etaloninio tirpalo. Mišiniai yra išmaišomi ir paliekami stovėti tamsoje 20 minučių. Išmatuojamos šviesos sugertys spektrofotometru „Shimadzu UV-1280“ 517 nm bangos ilgyje. DPPH[•] slopinimo apskaičiavimas (2.5):

$$\text{Slopinimas, \%} = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100 \quad (2.5);$$

čia:

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis [130].

2.3.3. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

FRAP metodu nustatomos redukuojančios savybės, kurios yra susijusios su Fe³⁺-TPTZ pavirtimu į Fe²⁺-TPTZ ir išmatuojamos 593 nm bangos ilgyje. FRAP reagentas paruošiamas iš 25 ml 300

mM acetato buferinio tirpalo, 2,5 ml 10 mmol TPTZ ir 2,5 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/l). 20 μl DMSO ištirpintų tiriamųjų junginių (1 mg/ml) sumaišomi su 80 μl DMSO, o po to pridedama 3 ml FRAP reagento. Išmaišytų tirpalų šviesos sugertys išmatuojamos spektrofotometru „Shimadzu UV-1280“ 593 nm bangos ilgyje.

Kalibravimo kreivė ruošama naudojant skirtingas koncentracijas $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5, 10, 15, 20; 25 $\mu\text{mol/l}$). Formulė apskaičiuoti FeSO_4 2000 μM kiekius tirpalams (2.6):

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (2.6);$$

čia:

X – reikalingas paimti tirpalo tūris iš pradinio paruošto tirpalo su tiriamąja medžiaga, ml;

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mM/l;

B – praskiedimo tūris, l;

C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamuoju junginiu **1–13**, koncentracija, mg/ml.

Į skirtingos koncentracijos tirpalus (5, 10, 15, 20; 25 $\mu\text{mol/l}$) įpilamas FRAP reagentas ir išmatuojamos šviesų sugertys 593 nm bangos ilgyje. Iš gautų šviesos sugerčių sudaroma kalibracinė tiesė, iš kurios apskaičiuojama Fe^{2+} koncentracija tiriamuosiuose **1–13** tirpaluose [132].

2.3.4. Ekstraktų bendras fenolinių junginių koncentracijos nustatymas *Folin-Ciocalteu* metodu

Bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) yra nustatomas pagal modifikuotą Singleton, Orthofer ir Lamuela-Ravetos (1999) metodą [132].

Kalibracinės kreivės parengimas. Kalibracinė kreivė ruošama naudojant skirtingas tanino rūgšties koncentracijas. Į mėgintuvėlius įpilama 0,0; 20; 40; 60; 80; 100, 120 ml standartinio tanino rūgšties tirpalo ir užpildoma distiliuotu vandeniu iki 500 ml. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama 250 ml Folin-Ciocalteu reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Švelniai sumaišoma ir paliekama tamsoje 40 minučių, kambario temperatūroje. Praėjus 40 minučių, matuojama šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje. Sudaroma kalibracinė kreivė, kurioje ant x ašies žymima tanino rūgšties koncentracija, o ant y šviesos sugertis išmatuota 725 nm bangos ilgyje.

Fenolinių junginių koncentracijos nustatymas. Į mėgintuvėlį įpilama 30 ml tiriamojo junginio **1–13** ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki 500 ml. Pridedama į mėgintuvėlį 250 ml *Folin-Ciocalteu* reagento ir įpilama 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Švelniai sumaišoma ir laikoma tamsoje 40 minučių, kambario temperatūroje. Praėjus 40 minučių matuojama tirpalo absorbcija spektrofotometru „Shimadzu UV-1280“ 725 nm bangos ilgyje. Apskaičiuojama bendra fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (2.7):

$$X = aV \times 100/n \quad (2.7);$$

čia:

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

V – pradinis tūris, l;

N – bandinio masė, g [132].

2.3.5. Antibakterinio aktyvumo nustatymas agarų difuziniu metodu

Antibakterinis aktyvumas tiriamiesiems junginiams nustatomas agarų difuziniu metodu. Šiame metode naudojama *Luria-Bertani* (LB) terpė, kurį ruošama iš reagentų, kurie pavaizduoti 2.2 lentelėje. *Luria-Bertani* (LB) terpės paruošimas: 10 g natrio chlorido sumaišoma su 10 g triptonu, 5 g mielių ekstraktu ir ištirpinama distiliuotame vandenyje iki 200 ml. Lašinant 1 N natrio hidroksido ar 1 N sieros rūgšties tirpalą, vykdoma neutralizacija, kol terpės pH pasiekia vertę 7,2. Atlikus neutralizaciją, pridedama 15 g mikro agarų ir tirpalas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1000 ml. Terpė autoklavuojama ir išpilstoma į *Petri* lėkšteles, jos paliekamos pastovėti keletą dienų.

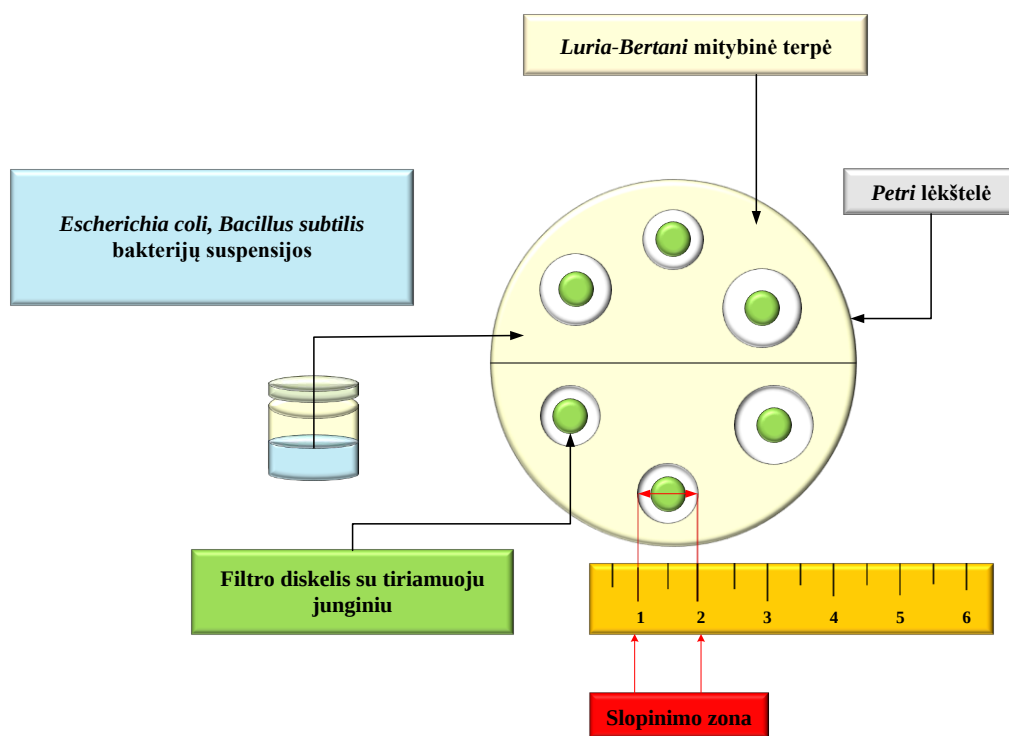
2.2 lentelė. LB terpės reagentų kiekiai

Reagentai	Reagentų kiekiai (g) 1 l terpės
NaCl	10
Triptonas	10
Mielių ekstraktas	5
Mikro agaras	15

Tyrime buvo naudotos ir užpildytos dehidratuotos *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijos, kurios patalpintos ampulėje, vakuuminėje aplinkoje. Ampulės atidarymas ir bakterijų dehidratavimas vykdomas keliais etapais:

1. ampulės galiukas pakaitinamas liepsnoje;
2. ant nukaitinto ampulės galiuko užlašinami 2–3 lašai vandens;
3. nulaužiamas ampulės galiukas;
4. žnyplėmis pašalinama izoliacinė medžiaga ir išimama vidinė kapsulė;
5. žnyplėmis ištraukiamas medvilninis kamštis ir nudeginama viršutinė vidinės kapsulės dalis;
6. į kapsulę įpilama 0,5 ml terpės rehidratavimui ir uždengus kamščiu paliekama 30 minučių;
7. praėjus 30 minučių turinys sumaišomas mikrobiologine kilpele;
8. gautas mišinys perkeliamas į mėgintuvėlį su 5 ml skystos terpės, iš kurios bakterijos gali būti sėjamos ant kietųjų ir skystųjų terpių.

Antibakterinio tyrimo metu ant LB terpės *Petri* lėkštelėse užpilama *Escherichia coli* ar *Bacillus subtilis* 50 µl bakterijų suspensijos, tuomet uždedami 3 popieriniai filtro diskeliai (d = 0.6 cm), kurie suvilgyti 50 µl tiriamuoju 1–13, palyginamuoju ar kontroliniu tirpalu. Palyginamajam tirpalui naudotas ciprofloksacinas ištirpintas DMSO (25 µg/ml), o kontroliniam tirpalui naudota DMSO be tiriamojo junginio. Paruoštos *Petri* lėkštelės sudėtos į termostatą 37 °C parai laiko. Po 24 valandų skaičiuojamas tiriamųjų junginių antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis*. Slopinimo zona apskaičiuojama susumavus *Petri* lėkštelėse esančius slopinimo skersmenis ir padalijus iš jų kiekio (2.3 pav.) [133]. Atlikti trys pakartojimai ir rezultatuose pateikiama vidurkio reikšmė.



2.3 pav. Slopinimo zonos skaičiavimas *Petri* lėkštelėje

2.3.6. Ergosterolio koncentracijos nustatymas

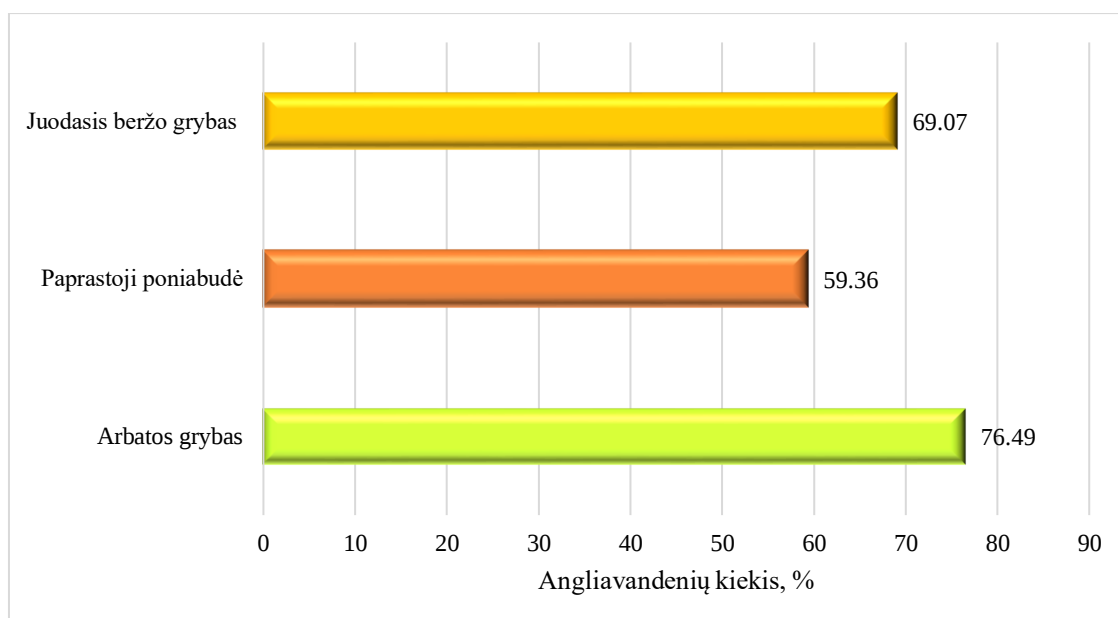
Ekstraktų kiekybinis įvertinimas atliktas naudojant efektyviąją skysčių chromatografiją (ESC). ESC analizė buvo atliekama naudojant chromatografijos sistemą *Water Alliance 2695 Separation Module*. Bandinys analizuojamas naudojant *Waters Symmetry* (Milford, MA, USA) RP C18 koloną (75x4.6 mm, 3,5mm) esant 30°C temperatūrai. Analizė atliekama tiekiant mobilios fazės mišinį 1 ml/min greičiu, kurį sudaro metanolis – acetonitrilas (30:70). Mėginio injekcijos tūris 20 µL. Ergosterolis analizuojamas naudojant 2487 UV detektorius (Milford, MA, USA) 280 nm bangos ilgyje [134]. Kalibracinė kreivė sudaryti naudojama ergosterolio sertifikuota etaloninė medžiaga, iš kurios paruošti etaloniniai tirpalai (0,01–0,20 mg/ml). Iš kalibracinės kreivės yra apskaičiuojama ergosterolio koncentracija (mg/g).

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) bendra cheminė sudėtis

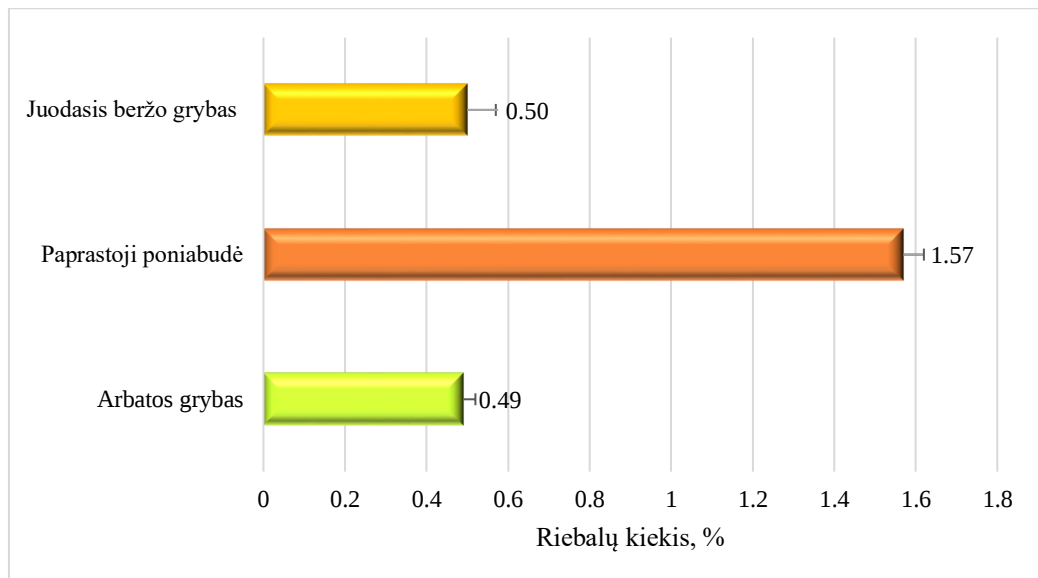
Tyrimo metu nustatyta išdžiovintų ir susmulkintų juodojo beržo grybo (lot. *Inonotus obliquus*), paprastosios poniabudės (lot. *Phallus impudicus*), arbatos grybo (lot. *Kombucha*) bendra cheminė sudėtis: riebalų kiekis (%), drėgmės kiekis (%), mineralinių medžiagų kiekis (%), baltymų kiekis (%), angliavandenių kiekis (%).

Riebalų, mineralinių medžiagų, baltymų ir angliavandenių kiekis nusako bendrą bandinių maistinę vertę. Šie kiekiai yra kintamas dydis, kadangi jiems įtaką daro daug veiksnių, pavyzdžiui, grybų auginimo, laikymo sąlygos bei pati grybo veislė. Didžiausią dalį sudarė angliavandenių kiekis, kuris svyravo nuo 59,36–74,49 % intervale (3.1 pav.). Didžiausias šios medžiagos kiekis nustatytas arbatos grybo bandinyje, kurio kiekis siekė 74,49 %, o mažiausias paprastojoje poniabudėje, kurio vertė lygi 59,36 %. Remiantis kitų mokslininkų tyrimais, angliavandenių kiekis nustatytas juodajame beržo grybo bandinyje siekė 87,77 % [135], paprastojoje poniabudėje svyravo 50,6–54,1 % ribose [94], o moksliniuose tyrimuose angliavandenių kiekis, esantis arbatos grybe, nėra nustatytas.



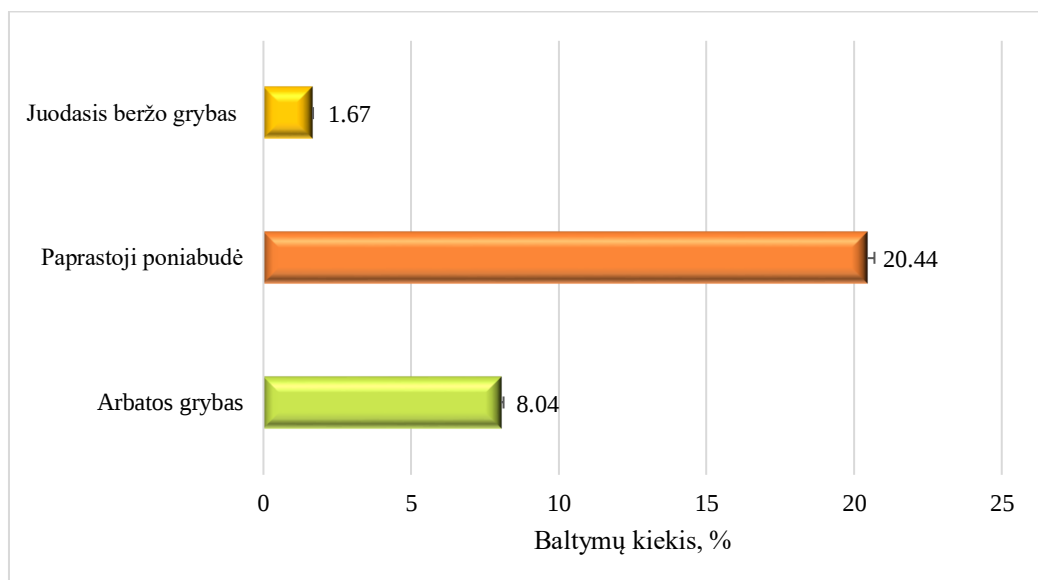
3.1 pav. Angliavandenių kiekis, %

Mažiausią dalį bandiniuose sudarė riebalų kiekis. Jų kiekis svyravo tarp 0,50–1,57 % (3.2 pav.). Didžiausiu riebalų kiekiu pasižymėjo paprastoji poniabudės bandinys, kurioje riebalai sudarė 1,57 %. Juodojo beržo ir arbatos grybo bandiniai pasižymėjo ženkliai mažesniu kiekiu, kuris buvo labai panašus bei siekė 0,49–0,50 %.



3.2 pav. Riebalų kiekis, %

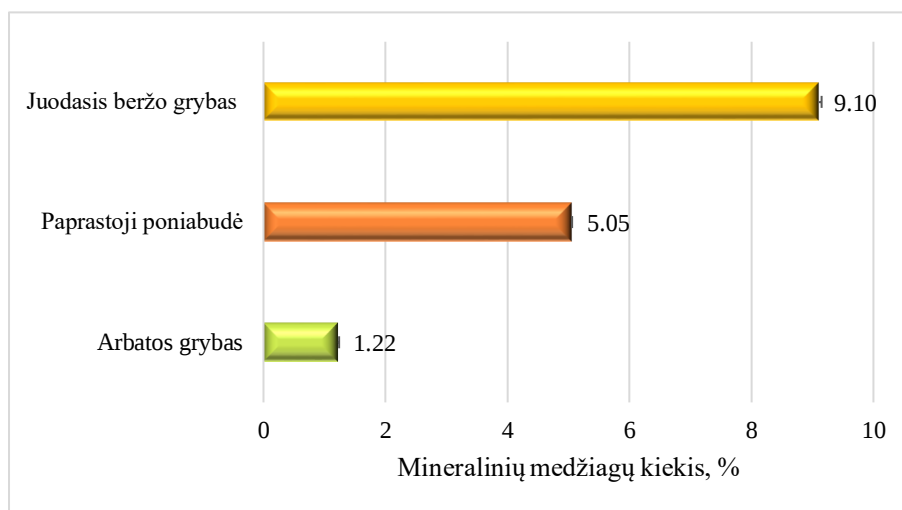
Baltymų kiekis bandiniuose labai skyrėsi, jų kiekis svyravo nuo 1,67 % iki 20,44 % (3.3 pav.). Didžiausiu baltymų kiekiu pasižymėjo paprastosios poniabudės bandinys, kurio vertė siekė 20,44 %, o mažiausiu baltymų kiekiu pasireiškė juodojo beržo grybo bandinys, kurio vertė prilygsta tik 1,67 %. Lyginant baltymų kiekio tyrimo rezultatus su kitų mokslininkų atliktais tyrimais, juodajame beržo grybo bandinyje nustatytas baltymų kiekis – 1,51 % [127], o paprastosios poniabudės bandinyje svyravo tarp 20,00–25,20 % [94], apie baltymų kiekį arbatos grybo bandiniuose mokslinių tyrimų nerasta.



3.3 pav. Baltymų kiekis, %

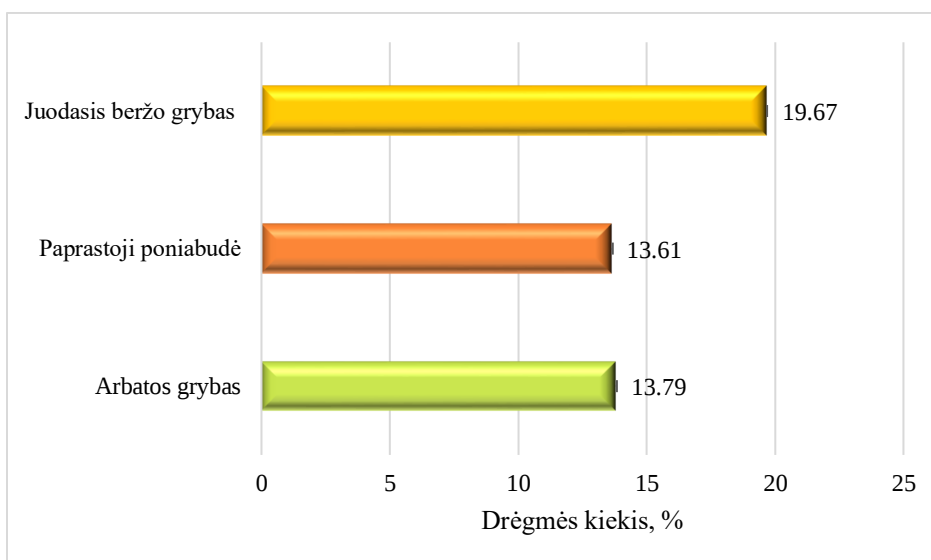
Didžiausias mineralinių medžiagų kiekis nustatytas juodojo beržo grybo bandinyje, kuriame nustatyta net 9,10 % mineralinių medžiagų, o mažiausią kiekį turintis nustatytas bandinys – arbatos grybas, kuriame mineralinių medžiagų vertė lygi 1,22 % (3.4 pav.). Šio bandinio vertė siekė vos 1,22 %. Moksliniuose straipsniuose juodojo beržo grybo bandinyje mineralinių medžiagų kiekis nustatytas

8,36 % [127], o arbatos grybo bandinyje svyruoja 1,27–1,71 % ribose [130], apie mineralinių medžiagų kiekį paprastojoje poniabudėje mokslinių tyrimų nerasta. Didžiausias randamas mineralinių medžiagų kiekis, esantis bandiniuose, nustatytas kalio (K) [42][43], tačiau taip pat atrandama ir daug kitų mineralinių medžiagų.



3.4 pav. Mineralinių medžiagų kiekis, %

Grybų bandiniai pasižymi hidroskopiškumu, nes geba sugerti drėgmę iš aplinkos, nors yra išdžiovinti, todėl prieš atliekant tyrimus svarbu bandinius laikyti sandariose talpose, norint išsaugoti jų kokybę. Taip pat drėgmės kiekiui įtakos turi grybo rūšis, auginimo bei džiovavimo sąlygos. Tyrimams naudoti iš anksto įvairiais būdais išdžiovinti grybai (žr. skyrius nr. 2). Likutinis drėgmės kiekis grybų bandiniuose svyravo tarp 13,61–19,67 % (3.5 pav.), didžiausiu likutinės drėgmės kiekiu pasižymėjo juodasis beržo grybo bandinys, kuriame nustatyta 19,67 % drėgmės. Labai panašiu drėgmės kiekiu pasižymėjo likusieji grybų bandiniai – paprastoji poniabudė bei arbatos grybas, jų vertės nustatytos 13,61–13,79 % ribose.

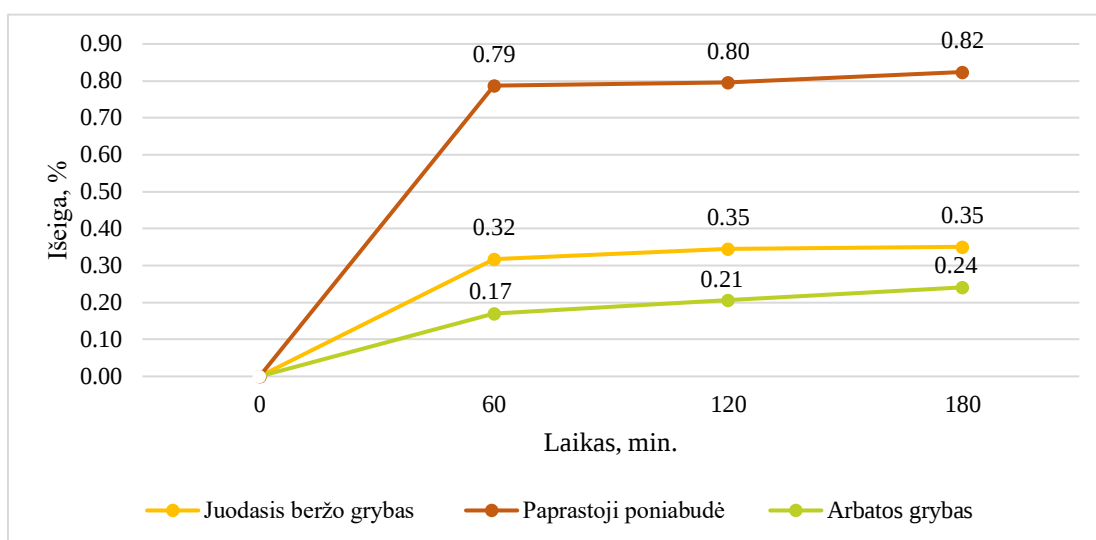


3.5 pav. Drėgmės kiekis, %

3.2. Juodojo beržo grybo (lot. *Inonotus obliquus*), paprastosios poniabudės (lot. *Phallus impudicus*), arbatos grybo (lot. *Kombucha*) ekstraktų gavimo rezultatai

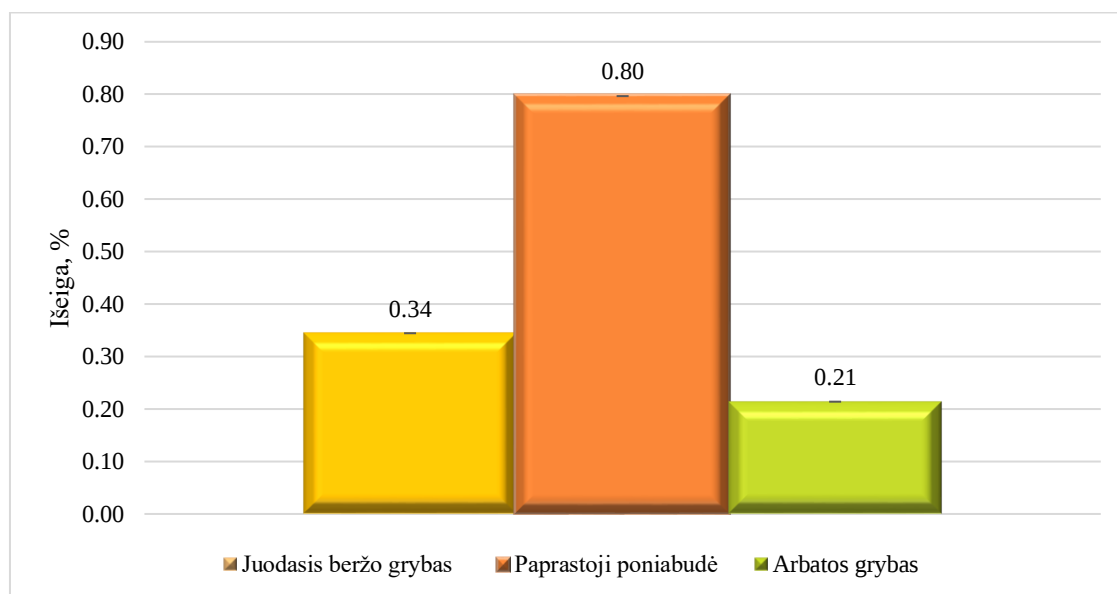
3.2.1. Superkrizinė ekstrakcija anglies dvideginiu (SKE–CO₂)

Tyrimo pradžioje sudaryta grybų ekstrakcijos kinetikos kreivė. Iš sudarytos kreivės (3.6 pav.) pastebėta, kad visi grybų bandiniai didžiausią išėigos pakitimą turėjo per pirmąsias 60 minučių, vėliau išėiga neženkiai didėjo ir stabilizavosi praėjus papildomoms 60 minučių. Atsižvelgus į sudarytą ekstrakcijos kinetikos kreivę, nuspręsta, kad optimaliausia ekstrakcijos trukmė – 120 minučių.



3.6 pav. Ekstrakcijos išėigos priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės

Atlikus superkrizinę ekstrakciją anglies dvideginiu, gauti duomenys atskleidžia, kad didžiausia išėiga gauta iš paprastosios poniabudės bandinio, kuri siekė 0,80 %, o mažiausia išėiga iš arbatos grybo bandinio – 0,21 % (3.7 pav.). Gauta išėiga iš juodojo beržo grybo bandinio siekė 0,34 %.

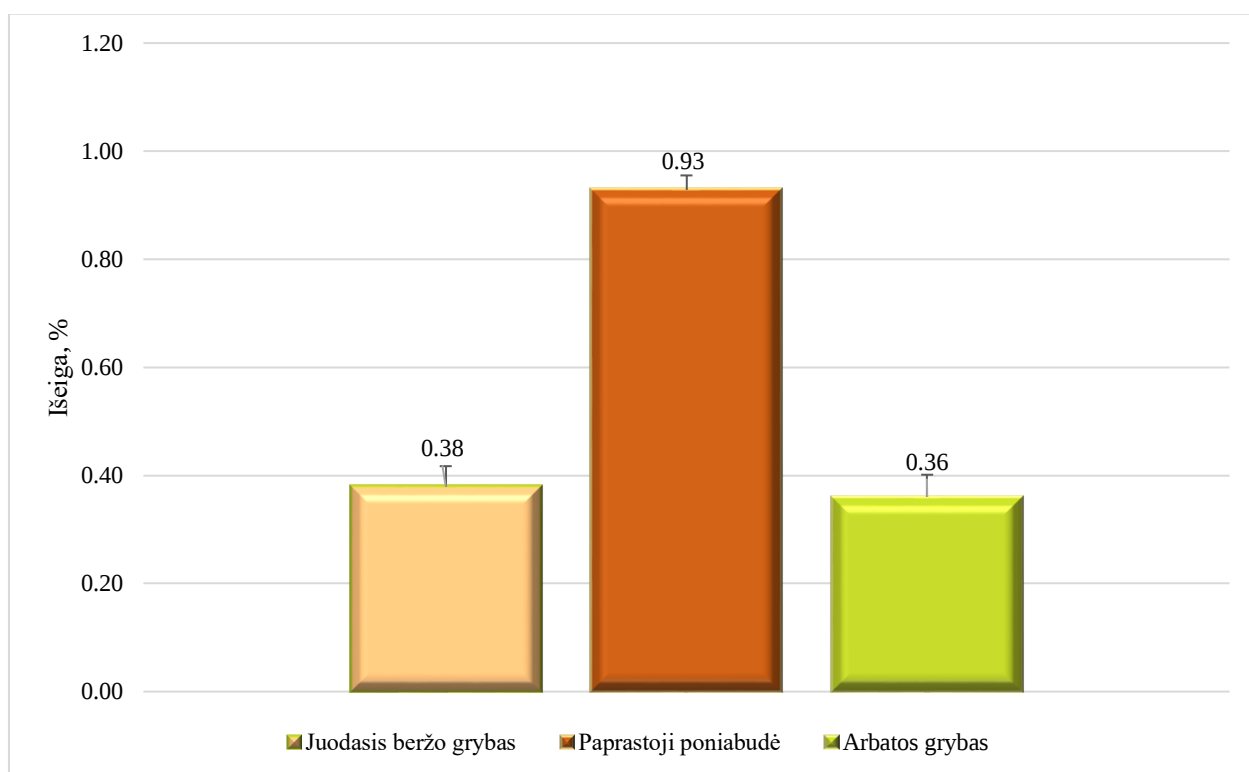


3.7 pav. Gautos išėigos po superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginiu

Lyginant su analogiškai tyrimais atliktais kitų mokslininkų, juodojo beržo grybo išėigos, atliekant SKE–CO₂ metodą (50 °C, 35 MPa), siekia 0,4–0,5 % ribas [136]. Mažesnę ekstrakcijos išėigą, lyginant su literatūroje gautais rezultatais, galėjo įtakoti mėginių kompozicijos netolygumas dėl įvairių aplinkos bei techninių tyrimo atlikimo faktorių. Literatūroje duomenų apie paprastosios poniabudės ir arbatos grybo bandinius nerasta.

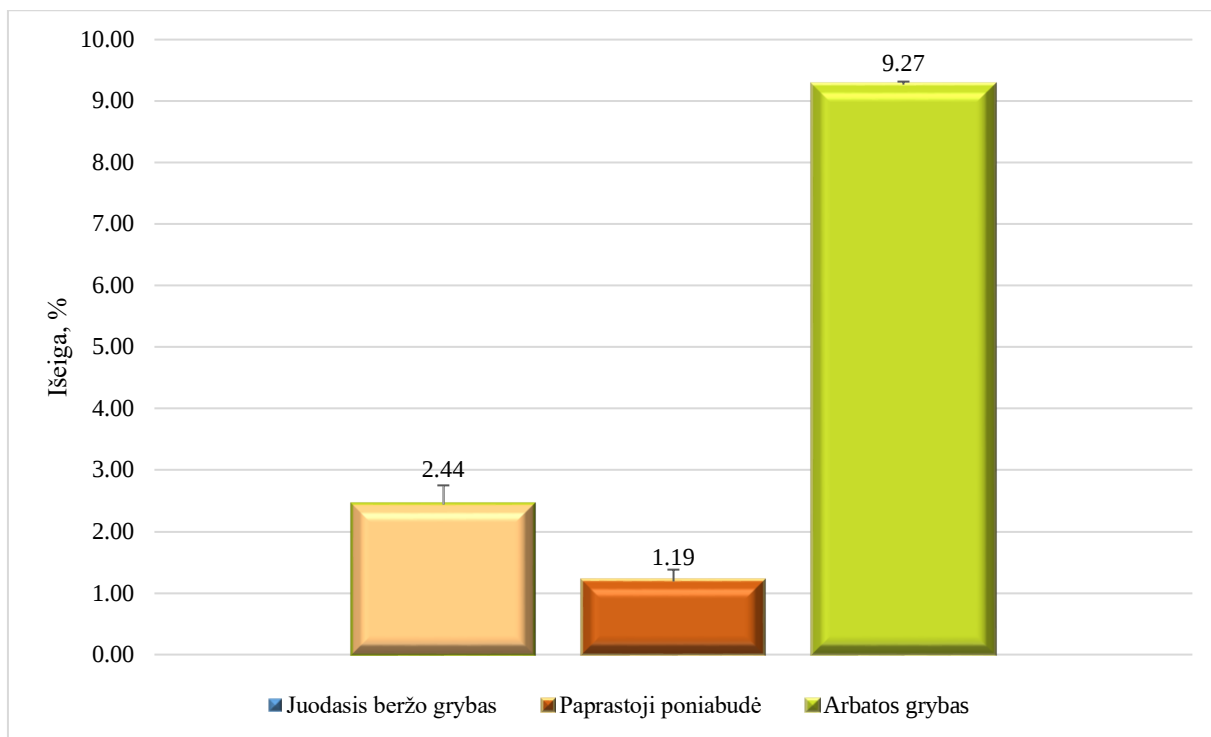
3.2.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje

Atlikus pagreitinto tirpiklio ekstrahavimo metodą su heksanu, kuris yra nepolinis tirpiklis, nustatyta, kad didžiausia surinkta išėiga gauta iš paprastosios poniabudės, kuri siekia 0,93 % (3.8 pav.). Tai leidžia patvirtinti, kad paprastoji poniabudė sukaupia daugiausiai nepolinių junginių. Mažiausia lipofilinių komponentų išgauta iš arbatos grybo bandinio, kurio vertė siekė vos 0,36 %, o juodojo beržo grybo išgautų lipofilinių komponentų išėiga lygi 0,38 %, kuri neženkiai aplenkė arbatos grybo bandinį. Heksanu išekstrahuotų lipofilinių komponentų kiekis yra šiek tiek didesnis nei superkritinės ekstrakcijos anglies dvideginiu metu.



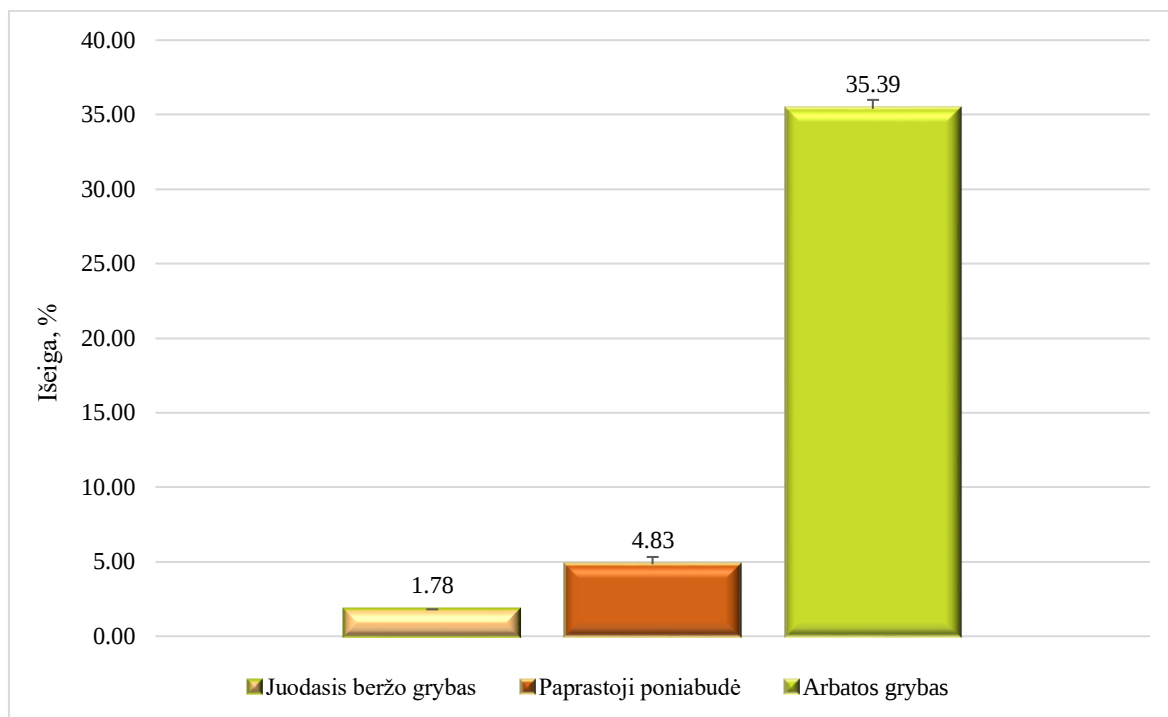
3.8 pav. Gautos išėigos po ekstrakcijos su heksano tirpikliu padidintame slėgyje

Atlikus ekstrakciją su acetonu, kuris yra vidutinio poliškumo tirpiklis, gauti rezultatai atskleidžia, kad didžiausia išėiga gauta iš arbatos grybo bandinio, kuri siekė net 9,27 %, o mažiausias išėigos kiekis nustatytas iš paprastosios poniabudės, kurios gauta tik 1,19 % (3.9 pav.). Gauta išėiga iš juodojo beržo grybo siekė 2,44 %.



3.9 pav. Gautos išėigos po ekstrakcijos su acetono tirpikliu padidintame slėgyje

Ekstrakcijos etanoliu rezultatai pateikti 3.10 paveiksle. Gauti rezultatai rodo, kad didžiausias etanolyje tirpių komponentų kiekis yra išekstrahuotas iš arbatos grybo, kurio gauta išėiga siekia net 35,39 %. Tai leidžia teigti, kad iš arbatos grybo galima gauti daugiausiai polinių junginių. Mažiausia išėiga gauta iš juodojo beržo grybo bandinio, kurio vertė siekė vos 1,78 %, o paprastosios poniabudės šiek tiek daugiau – 4,83 %. Literatūroje duomenų su tiriamaisiais grybų bandiniais nerasta.



3.10 pav. Gautos išėigos po ekstrakcijos su etanolio tirpikliu padidintame slėgyje

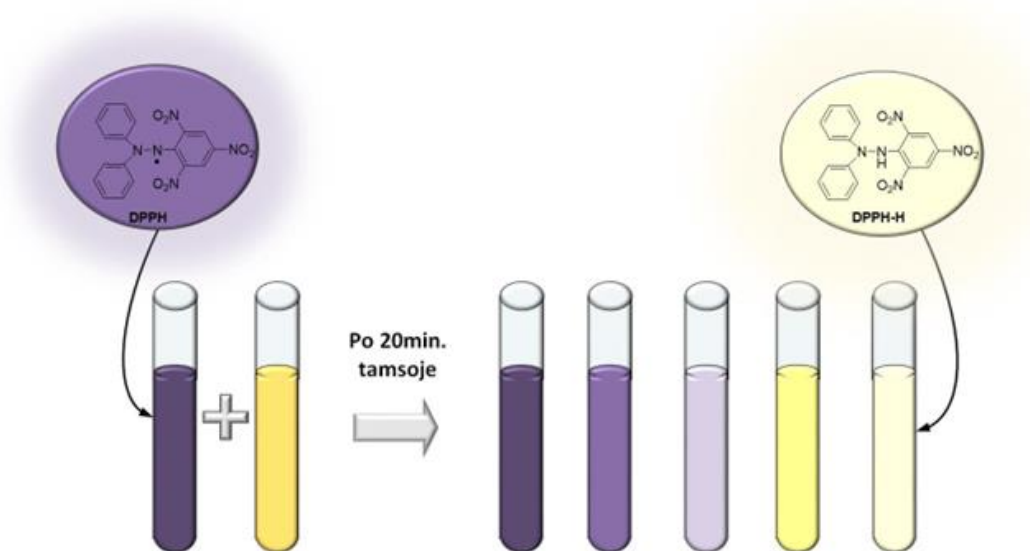
Apibendrinant tirtų grybų ekstrakcijos tirpikliais padidintame slėgyje išėigų rezultatus gauta: susumuota bendra juodojo beržo grybo išėiga yra 4,60 %, bendra paprastosios poniabudės grybo išėiga yra 6,95 % ir bendra arbatos grybo išėiga yra 45,38 %.

3.3. Ekstraktų antioksidacinio potencialo nustatymas

Laisvieji radikalai yra susiję su įvairiomis patogeninėmis ligomis, jie išprovokuoja širdies ir smegenų kraujagyslių ligas, cirozę, diabetą, uždegimus, neurodegeneracines ligas, vėžį ir su senėjimu susijusias ligas [136]. Antioksidantai vaidina lemiamą vaidmenį žmonių sveikatai, nes gali slopinti arba atitolinti nepageidaujamas oksidacijos reakcijas ir taip užkirsti kelią oksidaciniam stresui [132]. Todėl antioksidantai ir jų paieška yra labai svarbi, norint apsisaugoti nuo laisvųjų radikalų bei išvengti įvairių ligų.

3.4. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH[•] metodu

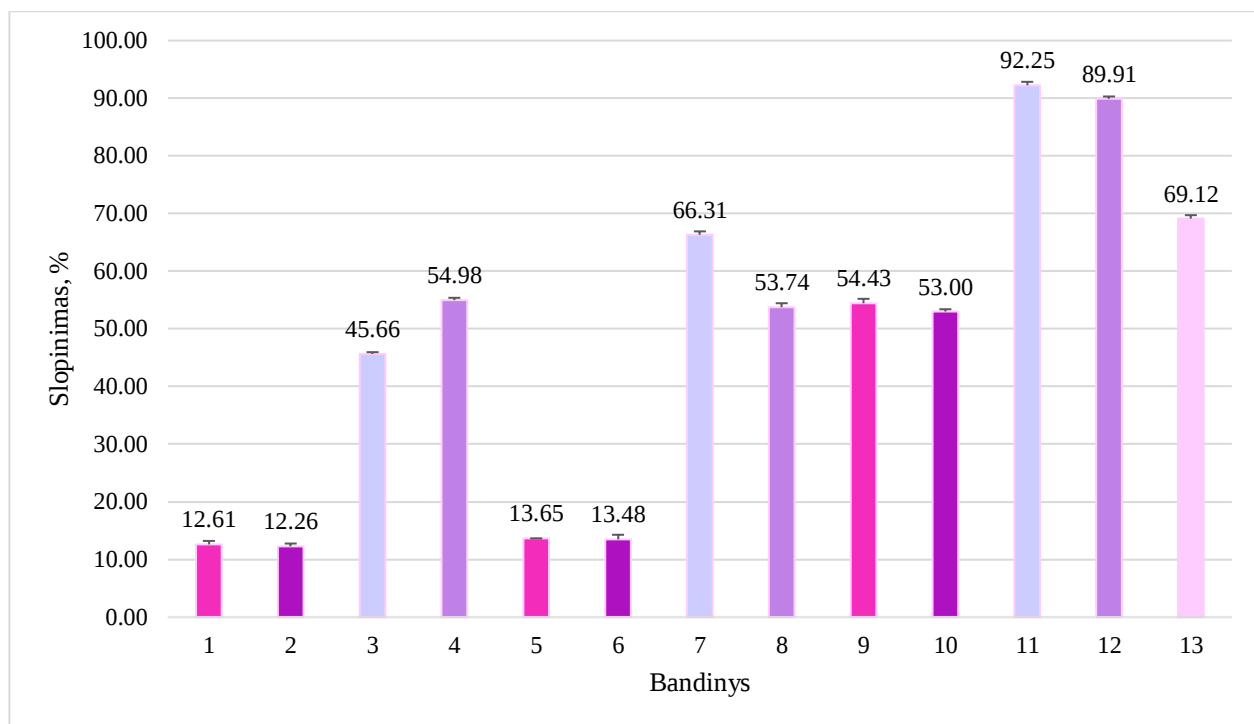
Laisvųjų radikalų DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-hidratas) metodą sukūrė Blois 1958 metais, siekdamas nustatyti antioksidacinį potencialą naudojant stabilų laisvąjį DPPH[•] radikalą. Tyrimas pagrįstas elektronų surišimu. Reakcijos metu įvyksta spalvos kitimas iš violetinės spalvos tirpalo į bespalvį tirpalą (3.11 pav.). Kuo spalva artimesnė bespalvei, tuo labiau junginys yra pasižymintis antioksidacinėmis savybėmis, kurio tiksli antioksidacinio poveikio vertė įvertinama spektrofotometriniu būdu 517 nm bangos ilgyje. Naudojant šį metodą, galima greitai bei lengvai įvertinti antioksidacinį junginių efektyvumą [130].



3.11 pav. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo) metodo spalvinis kitimas

Atlikus šią analizę visi mėginiai pasižymėjo antioksidaciniu aktyvumu. Gauti duomenys rodo, kad labiausiai laisvuosius radikalus surišo ekstraktai, kurie buvo gauti iš arbatos grybo grybienos: acetoninis (11) ir etanolinis (12) ekstraktai bei liofilizuotas arbatos grybo fermentuoto skysčio (13) bandinys. Šių ekstraktų rezultatai atitinkamai siekė 92,25 %, 89,91 %, bei 69,12 % laisvųjų radikalų slopinimą (3.12 pav.). Juodojo beržo grybo acetonis (3) ir etanolinis (4) bei paprastosios poniabudės acetoninis (7) ekstraktai, taip pat pasižymėjo dideliu antioksidaciniu aktyvumu, atitinkamai 45,66 %, 54,98 % ir 66,31 %. Sumažinus ekstrakto koncentraciją tirpale per pusę, jų slopinimo vertės nesumažėjo. Arbatos grybo CO₂ bei heksaniniai ekstraktai pasižymėjo stipriu antioksidaciniu

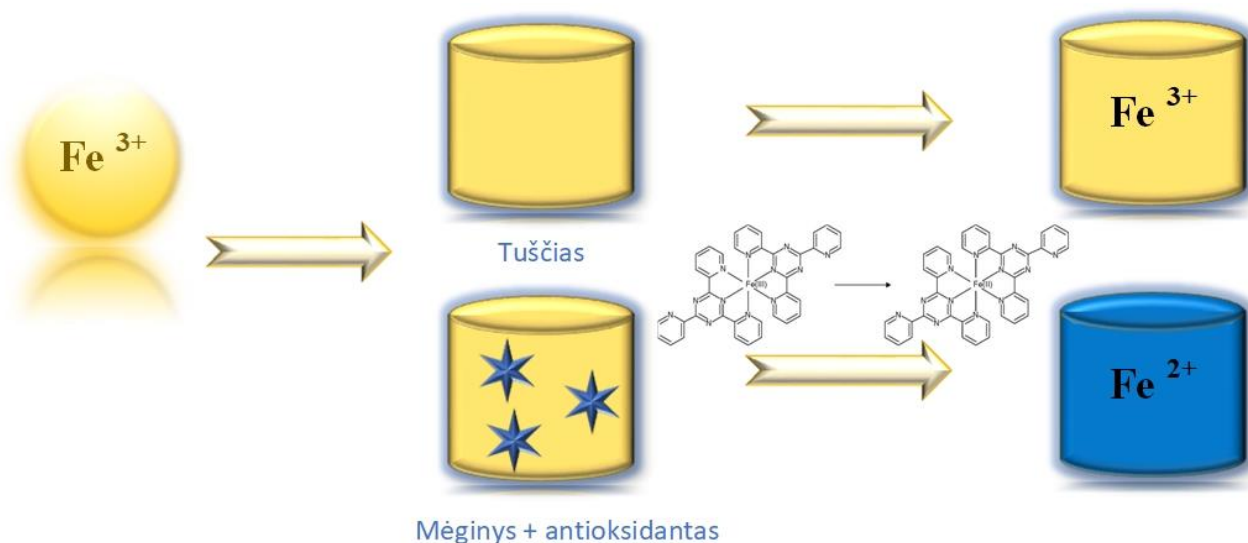
aktyvumu, atitinkamai 54,43 % ir 53,00 % priešingai nei paprastosios poniabudės ir juodojo beržo grybo CO₂ bei heksaniniai ekstraktai, kurie pasižymėjo mažiausiu antioksidaciniu aktyvumu 12,26–13,65 % ribose. Galime daryti išvadą, kad poliniuose ekstraktuose yra daugiau antioksidaciniu efektu pasižyminčių junginių nei napoliniuose.



3.12 pav. Tiriamųjų 1–13 DPPH tyrimo rezultatai

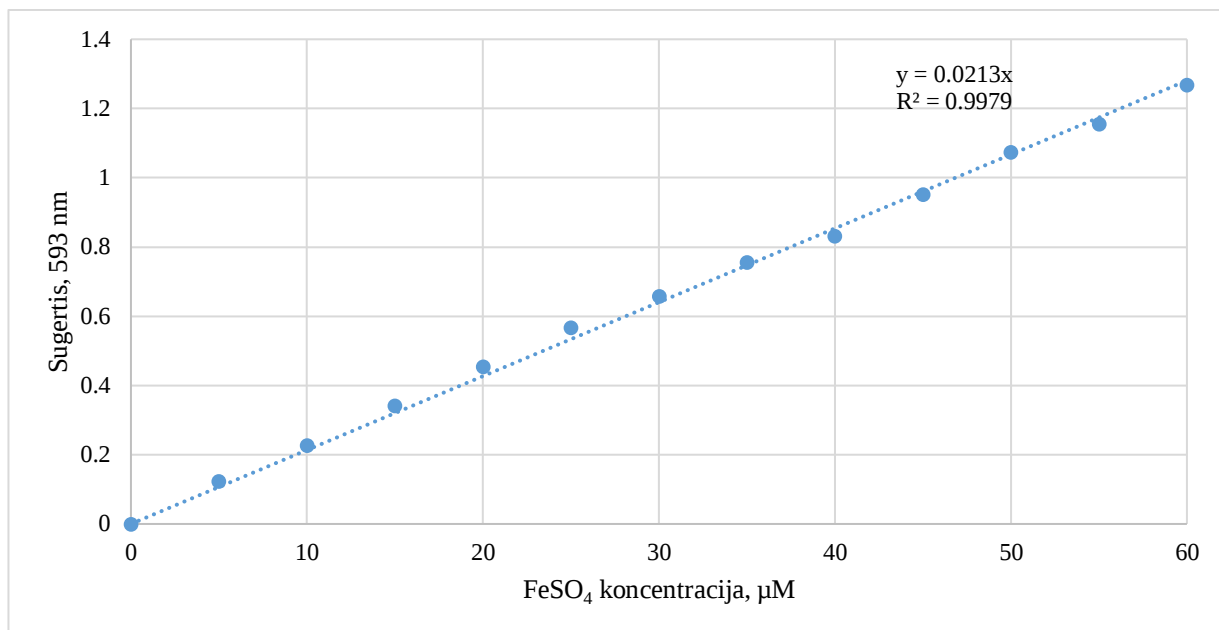
3.4.1. Ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

FRAP tyrimas naudojamas antioksidaciniai galiai išmatuoti, remiantis geležies-tripiridiltriazzino (Fe^{3+} TPTZ) redukavimu iki intensyvios mėlynos spalvos geležies – tripiridiltriazzino komplekso (Fe^{2+} TPTZ), kuris spektrofotometriškai išmatuojamas 593 nm bangos ilgyje (3.13 pav.) [138].



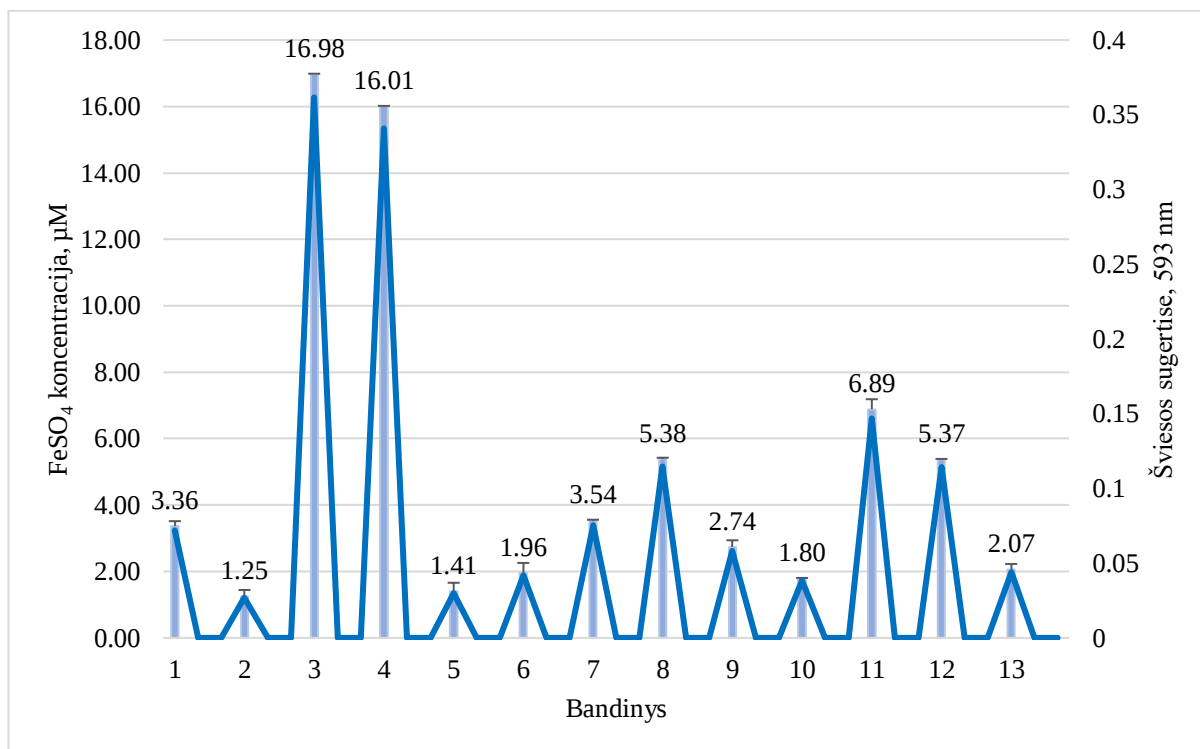
3.13 pav. Geležies (Fe^{3+}) iki geležies (Fe^{2+}) spalvinis kitimas FRAP metode

Nubrėžiama $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ kalibracinės tiesės šviesos sugerties priklausomybė nuo Fe^{2+} jonų koncentracijos ir iš šios kreivės išreiškiama lygtis bei apskaičiuojama Fe^{2+} jonų koncentracija bandiniuose (3.14 pav.).



3.14 pav. FeSO_4 kalibracinė kreivė

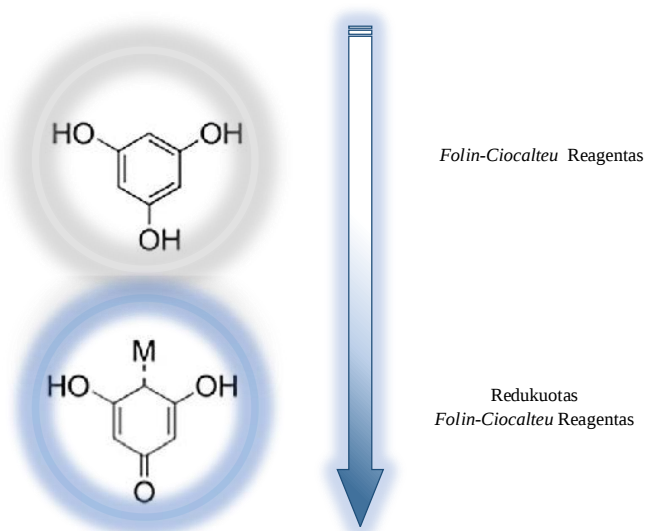
Tyrime visi ekstraktai parodė antioksidacinį potencialą (3.15 pav.). Didžiausias potencialas pastebėtas juodojo beržo acetoninio (3) ir etanolinio (4) ekstraktuose. Šių ekstraktų Fe^{2+} jonų koncentracijos siekė apie 16,01–16,98 μM intervale. Mažiausią antioksidacinį aktyvumą atskleidė juodojo beržo grybo heksaninis (2) ekstraktas, kurio Fe^{2+} jonų koncentracijos vertė siekė vos 1,25 μM .



3.15 pav. Tiriamųjų 1–13 FRAP tyrimo rezultatai

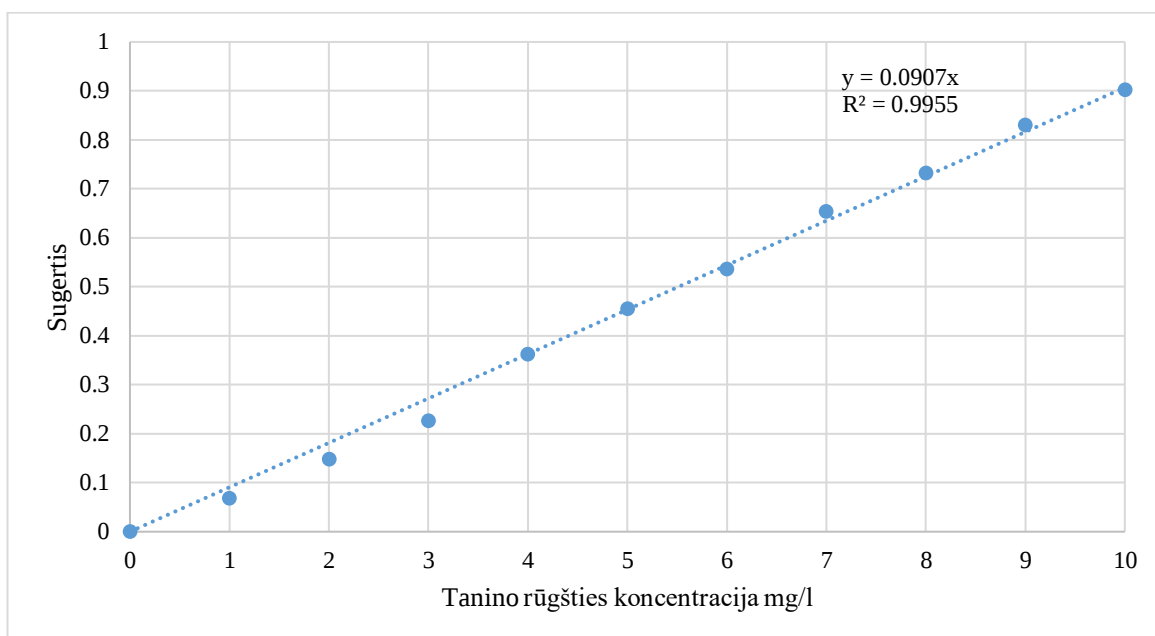
3.4.2. Ekstraktų bendras fenolinių junginių koncentracijos nustatymas *Folin-Ciocalteu* metodu

Folin-Ciocalteu metodas skirtas įvertinti bendrą fenolinių junginių kiekį, pagrįstas elektronų perdavimu, kuriuo matuojamas antioksidanto redukcinis pajėgumas spektrofotometrinio būdu 725 nm bangos ilgyje (3.16 pav.). Jis plačiai taikomas nustatant bendrą fenolių / polifenolių kiekį bandiniuose [139].



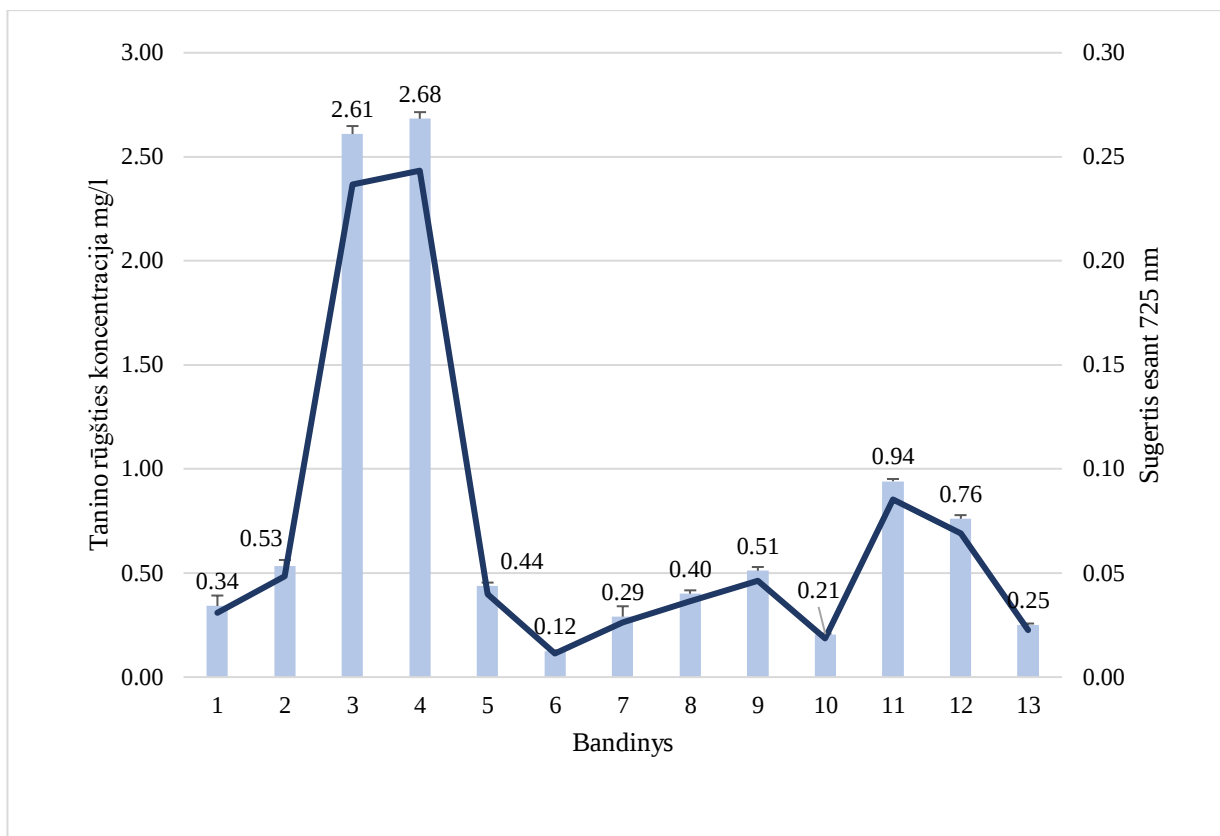
3.16 pav. *Folin-Ciocalteu* reagento spalvinis kitimas

Bendras fenolinių junginių kiekis yra išreiškiamas tanino rūgšties koncentracija, mg/L. Siekiant įvertinti bendrą fenolinių junginių kiekį nubrėžta tanino rūgšties kalibracinė kreivė, kurioje yra atvaizduota tanino rūgšties koncentracijos priklausomybė nuo šviesos sugerties bei išreiškiama lygtimi (3.17 pav).



3.17 pav. Tanino rūgšties kalibracinė tiesė

Šis analizės metodas taip pat patvirtino, kad visi ekstraktai turi fenolinių junginių (3.18 pav.). Didžiausiu fenolinių junginių kiekiu pasižymėjo beržo grybo etanolinis (3) ir acetoninis (4) ekstraktai. Šių ekstraktų reikšmės svyravo 2,61–2,68 mg/l ribose. Šie rezultatai patvirtina prieš tai gautų DPPH, FRAP tyrimų rezultatus, kad 3, 4 bandiniai turintys didžiausią fenolinių junginių koncentraciją, taip pat pasižymėjo stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Todėl galima teigi, kad fenolinių junginių koncentracija siejasi su antioksidaciniu aktyvumu. Paprastosios poniabudės heksaninis (6) ekstraktas, pasižymėjo mažiausia fenolinių junginių koncentracija. Šiame ekstrakte tanino rūgšties koncentracija siekė vos 0,12 mg/l.



3.18 pav. Tiriamųjų 1–13 bandinių Folin-Ciocalteu tyrimo rezultatai

3.4.3. Antibakterinio aktyvumo nustatymas agaro difuziniu metodu

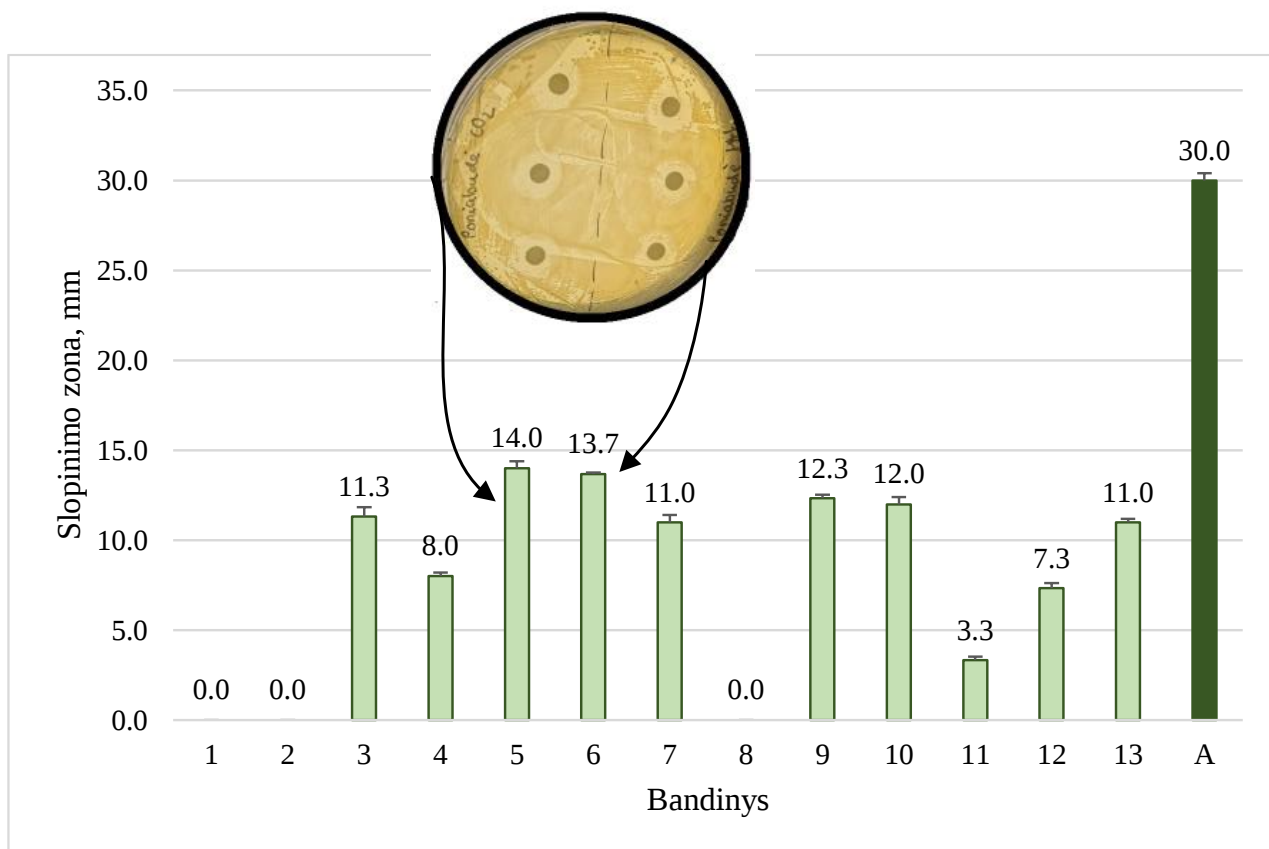
Antibakterinis aktyvumas yra susijęs su junginiais, kurie naikina bakterijas arba lėtina jų augimo greitį. Antibakterinės medžiagos ypač svarbios kovojant su infekcinėmis ligomis, tačiau dėl plataus jų naudojimo ir piktnaudžiavimo vystosi bakterijų atsparumas naudojamoms antibakterinėms medžiagoms. Šiuo metu tai yra viena didžiausių farmacijos srities problemų, todėl labai svarbu ieškoti naujų junginių pasižyminčių antibakteriniu poveikiu [140].

Escherichia coli yra gramneigiama lazdelės formos bakterija, kuri kolonizuojasi žmonių ir kitų šiltakraujų gyvūnų žarnose. Ši bakterija viena svarbiausių ligoninių, gyvūnų infekcijų, apsinuodijimų maistu priežasčių, kuri plačiai plinta tarp žmonių, gyvūnų ir aplinkos. Klinikiniu požiūriu *Escherichia coli* gali sukelti įvairias kliniškes ligas, pavyzdžiui viduriavimą, šlapimo takų infekcijas, bakteriemiją, meningitą, septicemiją ir pneumoniją [141].

Bacillus subtilis yra gramteigiama lazdelės formos bakterija, formuojanti karščiui atsparias sporas. Gamtoje ši bakterija gyvena dirvožemyje, augalų šaknyse ir vandens aplinkoje. Nors ji gali augti gyvūnų virškinimo trakte, ji nėra laikoma žmogui patogenine bakterija [142].

Antibakterinio aktyvumo **1–13** bandinių rezultatai prieš *Escherichia coli* (gram (-)) ir *Bacillus subtilis* (gram (+)) pavaizduoti 3.19 ir 3.20 paveikslėliuose. Tyrimo metodikos metu skaičiuojama slopinimo zona (mm) aplink tris tiksliniais bandiniais suvilgytus filtro diskelius *Petri* lėkštelėje. Pagal rezultatus matome, kad tiriamieji **1–13** bandiniai parodė pranašesnę antibakterinę aktyvumą prieš *Bacillus subtilis* (gram (+)).

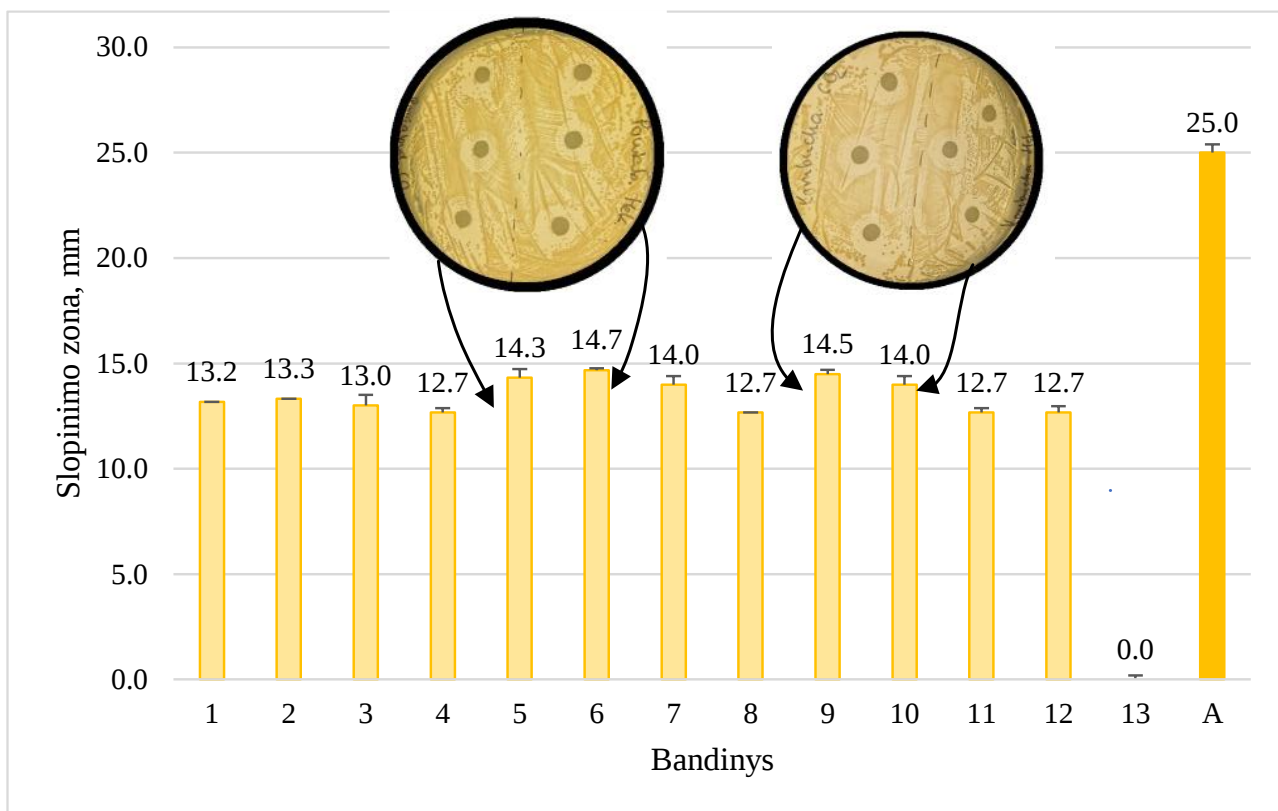
Didžiausią antibakterinį poveikį prieš *Escherichia coli* (gram (-)) atskleidė paprastosios poniabudės **5, 6** ekstraktai, kurie gauti naudojant ekstrakciją su heksanu padidintame slėgyje ir superkrizinę ekstrakciją anglies dvideginiu. Šių ekstraktų slopinimo zonos siekė 13,7–14,0 mm ribose (3.19 pav.). Prieš šią bakteriją neparodė jokio poveikio šie bandiniai: juodojo beržo **1, 2** ekstraktai, kurie gauti naudojant ekstrakciją su heksanu padidintame slėgyje ir superkrizinę ekstrakciją anglies dvideginiu bei paprastosios poniabudės etanolinis (**8**) ekstraktas. Antibiotiko (ciproflaksacino), kurio slopinimo zona siekė 30,0 mm, o šį antibiotiką aktyvumu aplenkusių bandinių nebuvo.



3.19 pav. Tiriamųjų bandinių **1–13** antibakterinis poveikis prieš *Escherichia coli*

Antibakteriniu poveikiu prieš *Bacillus subtilis* (gram (-)) pasižymėjo dauguma bandinių (3.20 pav). Didžiausią antibakterinį aktyvumą pavaizdavo paprastosios poniabudės **5, 6** ekstraktai, kurie gauti naudojant ekstrakciją su heksanu padidintame slėgyje ir superkrizinę ekstrakciją anglies dvideginiu. Šie ekstraktai pasireiškė 14,7 mm bei 14,3 mm slopinimo zonomis prieš šią bakteriją. Taip pat ryškus poveikis pastebėtas **9, 10** arbatos grybo ekstraktų, gautų naudojant superkrizinę ekstrakciją anglies dvideginiu ir ekstrakciją su heksanu padidintame slėgyje. Jų slopinimo zona nustatyta 14,0–14,5 mm

ribose. Prieš šią bakteriją jokio poveikio neparodė arbatos grybo liofilizuoto skysčio **13** bandinys. Antibiotiko (ciproflaksacino) pralenkiančių junginių nebuvo, jo slopinimo zona prieš šią bakteriją lygi 25,0 mm.

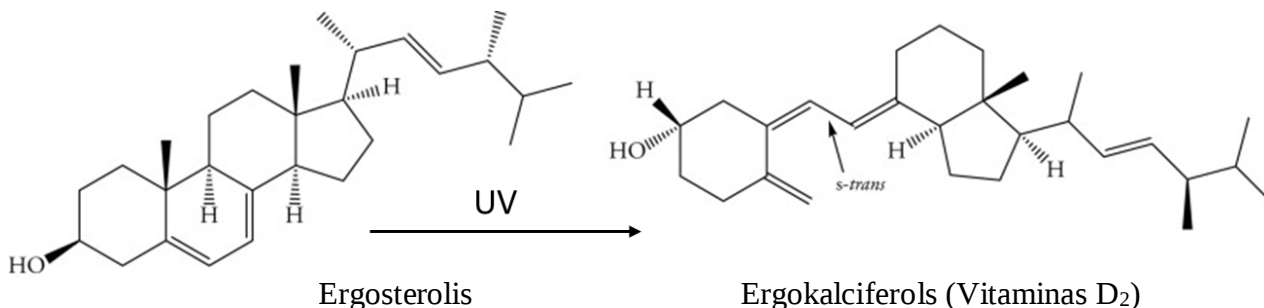


3.20 pav. Tiriamųjų bandinių 1–13 antibakterinis poveikis prieš *Bacillus subtilis*

Apibendrinus galime teigti, kad didesniu antibakteriniu aktyvumu pasižymintys yra lipofiliniai bandinių ekstraktai.

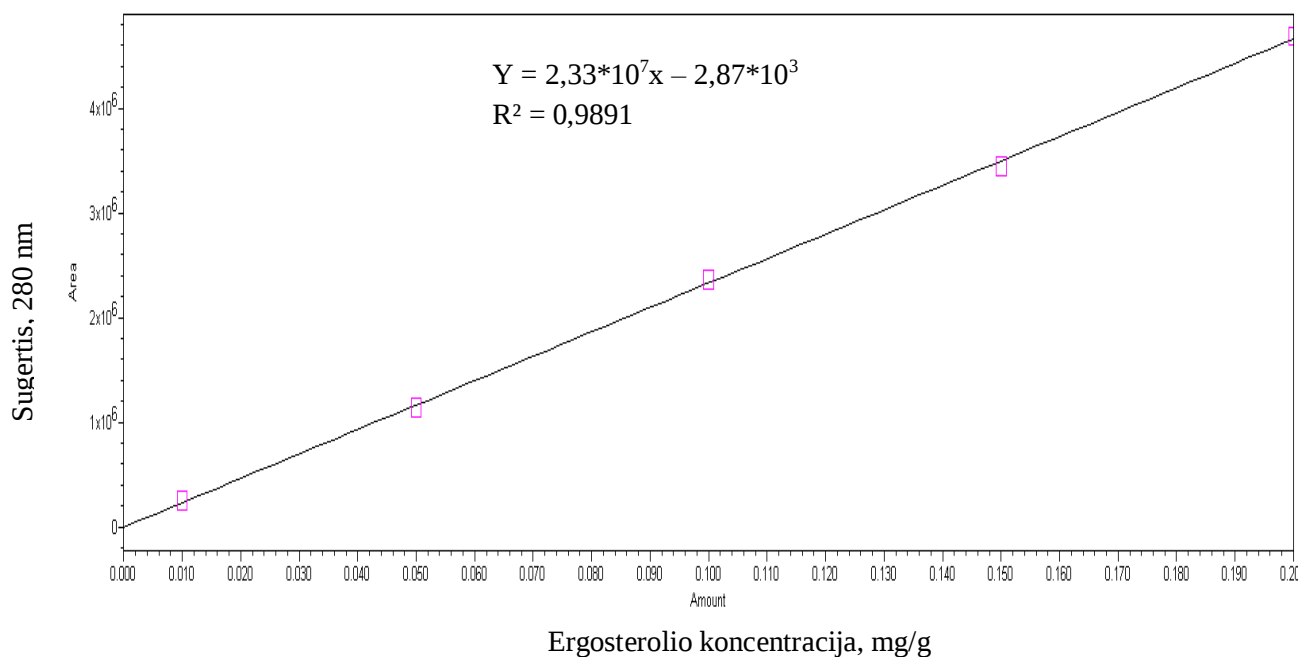
3.5. Ergosterolio koncentracijos nustatymas

Fitosteroliai yra natūraliai esančių augaluose steroidinių triterpenų grupė. Fitosteroliai pasižymi plačiu farmakologinių savybių spektru, pavyzdžiui priešuždegiminiu, imunomoduliuojančiu poveikiu, kelio užkirtimu aterosklerozei, širdies ir kraujagyslių ligoms [143]. Ergosterolis yra gausus grybuose esantis biologiškai aktyvus fitosterolinis junginys, kuris ultravioletiniu (UV) apšvitinimu gali virsti vitaminu D₂ (3.21 pav.) [143].



3.21 pav. Ergosterolio konversija į ergokalciferolį [143]

Iš sudarytos ergosterolio koncentracijos kreivės (3.22 pav.) yra apskaičiuojama ergosterolio koncentracija, esanti grybų ekstraktų bandiniuose.



3.22 pav. Ergosterolio koncentracijos nustatymo kalibracinė kreivė

Atlikus efektyviųjų skysčių chromatografiją, nustatyta, kad didžiausia ergosterolio koncentracija pasižymėjo paprastosios poniabudės acetoninis (7) ekstraktas, jo vertė ženkliai pralenkė kitus bandinius, kuri yra lygi 17,29 % (3.1 lentelė.). Ergosterolis visiškai neaptiktas visuose tirtuose arbatos grybo 10, 11, 12 ekstraktuose bei juodojo beržo grybo heksaniniame (2) ekstrakto.

3.1 lentelė. Ergosterolio koncentracija ekstraktuose, mg/g

Bandinys	Heksanas	Acetonas	Etanolis
Juodasis beržo grybas	NA	2,29 ± 0,11	1,19 ± 0,02
Paprastoji poniabudė	1,09 ± 0,12	17,29 ± 0,12	5,99 ± 0,12
Arbatos grybas	NA	NA	NA

NA – nėra aptikta; SN – standartinis nuokrypis;

nurodytos vidutinės trijų pakartojimų vertės ± SN.

Moterims ir vyrams, esantiems 9–70 metų amžiaus, rekomenduotina dienos dozė 600 IU, tai atitinka 0,015 mg D₂ vitamino kiekio, o esant vitamino D trūkumui – 600–2000 IU, kas atitinka 0,015–0,05 mg (3.2 lentelė) [145]. Gauti kiekie vitamino D₂ yra ženkliai didesni už reikiamą dienos dozę, todėl galima teigti, kad gauti kiekiai yra dideli.

3.2 lentelė. Vitamino D rekomenduotina dienos dozė [144]

Amžiaus grupės	Rekomenduotina dienos dozė (IU)	Rekomenduotina dozė, esant trūkumui (IU)	Paprastosios poniabudės acetoninio (7) ekstrakto kiekis, norint gauti rekomenduotiną dienos dozę
0–12 mėn.	400	400–1000	0,59 mg (400 IU)
1–8 m.	400	600–1000	0,59 mg (400 IU)
9–18 m.	600	600–1000	0,87 mg (600 IU)
19–70 m.	600	1500–2000	0,87 mg (600 IU)
>70 m.	800	1500–2000	1,16 mg (800 IU)
Nėštumo metu (14–18 m.)	600	600–1000	0,87 mg (600 IU)
Nėštumo metu (>18 m.)	600	1500–2000	0,87 mg (600 IU)
Žindimo metu (14–18 m.)	600	600–1000	0,87 mg (600 IU)
Žindimo metu (>18 m.)	600	1500–2000	0,87 mg (600 IU)

4. Rekomendacijų dalis

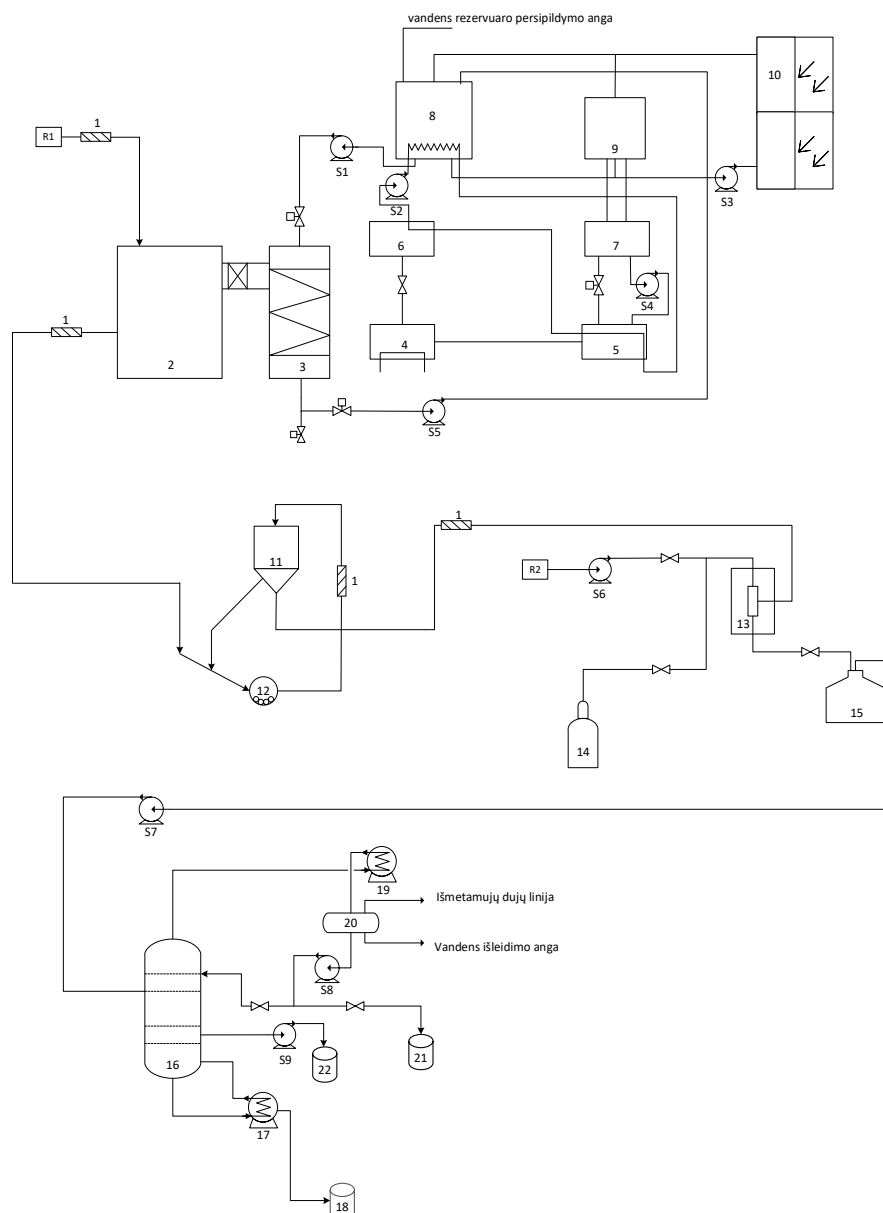
Šiame darbe juodo beržo ekstraktas **4**, gautas naudojant ekstrakciją su etanolio tirpikliu padidintame slėgyje, pasižymėjo efektyviu antioksidaciniu veikimu ir antibakteriniu aktyvumu prieš gam (-) bei gram (+) bakterijas. Dėl savo išskirtinio biologinio aktyvumo, šio ekstrakto panaudojimas būtų puikiai pritaikomas farmacijos pramonėje. Šiame skyriuje pateikiama šio ekstrakto gavimo aparatūrinė schema (4.1 pav.), kuria remiantis būtų galima komercializuoti šį ekstraktą.

4.1 lentelė. Gamyboje naudoti įrenginiai

Įrenginio nr.	Įrenginys	Įrenginio nr.	Įrenginys
1	Sraigtinis transporteris	13	Krosnis su cele
2	Liofilizavimo kamera	14	Dujų balionas
3	Liofilizatoriaus šalčio gaudyklė	15	Surinkimo talpa
4	Garintuvas	16	Distiliacinė kolona
5	Absorberis	17	Reboileris
6	Kondensatorius	18	Surinkimo talpa
7	Generatorius	19	Kondensatorius
8	Atitirpinimo talpa	20	Refliukso būgnas
9	Karšto vandens šaldymo talpa	21	Surinkimo talpa
10	Saulės kolektorius	22	Surinkimo talpa
11	Seperatorius	R1-R2	Rezervuarai
12	Rutulinis malūnas	S1-S9	Išcentriniai siurbliai

Pradinė medžiaga juodasis beržo grybas (rezervuaras **R1**) tiekiamas su sraigtiniu transporteriu **1** į liofilizavimo kamerą **2**. Šiame darbe naudojama liofilizatoriaus energijos taupymo sistema naudojant saulės energiją sugeriantį šaldymą. Sistemą iš viso sudaro trys įrenginiai, tai yra saulės energijos surinkimo kolektorius, absorbcinis šaldymo įrenginys ir šilumos kaupimo įrenginys. Absorbcinį šaldymo įrenginį sudaro generatorius **7**, kondensatorius **6**, garintuvas **4** ir adsorberis **5**. Saulės energijos surinkimo įrenginį sudaro saulės kolektorius **10**, karšto vandens šaldymo talpa **9**. Šilumos kaupimo įrenginį sudaro atitirpinimo talpa **8** ir atliekamo karšto oro kondicionavimo šilumos atgavimo mechanizmas. Liofilizacijos proceso metu užšaldyta pradinė medžiaga sublimuojama į kietą būseną vakuumo aplinkoje, drėgmė pašalinama garų pavidalu ir galiausiai pradinė medžiaga išdžiūsta. Į liofilizatoriaus šalčio gaudyklę **3** perduota drėgmė vėl sublimuoja ir virsta ledu. Sudžiovinta medžiaga perkeliama sraigtiniu transporteriu **1** į rutulinį malūną **12**. Jame susmulkinta žaliava keliauja sraigtiniu transporteriu **1** į separatorių **11**, kuriame stambesnės nei 0.5 mm dalelės keliauja atgal į rutulinį malūną **12**, o smulkesnės perkeliama sraigtiniu transporteriu **1** į ekstrakcijos celę. Krosnyje su cele **13** vykdoma ekstrakcija padidintame slėgyje. Slėgiui sukelti naudojamos azoto

dujos iš dujų baliono **14**, o etanolis yra tiekiamas į celę išcentrinio siurbliu **S6**. Po ekstrakcijos gautas ekstraktas laikomas surinkimo talpoje **15**, iš kurios jis išcentrinio siurbliu **S7** tiekiamas į distiliacijos koloną **16**. Į reboilerį **17** tiekama šiluma, kad susidarytų garai. Reboileryje **17** pakilę garai patenka į distiliavimo koloną **16**, iš kurios atvėsę vėl sugrįžta į reboilerį **17** per kolonos apačią. Atidirbęs skystis, kuris vadinamas dugno produktu, išmetamas į surinkimo talpą **18**. Garai distiliavimo kolonoje **16** juda aukštyn, o išėję per viršų aušinami kondensatoriuje **19**. Kondensuotas skystis laikomas talpykloje, vadinamoje reflukso būgnu **20**. Dalis šio skysčio išcentrinio siurbliu **S8** grįžta į kolonos viršų (tai vadinama grįžtamuju srautu), o kita dalis pasišalina į surinkimo talpą **21** (tai vadinama distiliatu arba viršutiniu produktu, kuris mūsų atveju yra etanolis). Gautas sukonzentruotas juodojo beržo ekstraktas (**4**) išcentrinio siurbliu **S9** tiekiamas į surinkimo talpą **22**.



4.1 pav. Juodojo beržo **4** ekstrakto gamybos aparatūrinė schema

Išvados

1. Įvertinus grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) cheminės sudėties rodiklius, nustatyta, kad visuose grybų bandiniuose didžiausią dalį sudarė angliavandeniai. Didžiausias kiekis nustatytas arbatos grybo bandinyje – 74,49 %, o mažiausias paprastosios poniabudės bandinyje – 59,36 %. Mažiausią dalį visuose grybų bandiniuose sudarė riebalų kiekis, didžiausias riebalų kiekis nustatytas paprastosios poniabudės bandinyje – 1,57 %, o mažiausias arbatos grybo bandinyje – 0,49 %. Didžiausias baltymų kiekis nustatytas paprastosios poniabudės bandinyje – 20,44 %, o mažiausias kiekis juodojo beržo grybo bandinyje – 1,67 %. Paaiškėjo, kad didžiausiu kiekiu mineralinių medžiagų pasižymi juodojo beržo grybo bandinys – 9,10 %, o mažiausiu arbatos grybo bandinys – 1,22 %. Taip pat didžiausias drėgmės kiekis nustatytas juodojo beržo grybo bandinyje – 19,67 %, o mažiausias paprastosios poniabudės bandinyje – 13,61 %.
2. Atlikus grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) ekstrakciją, taikant superkrizinę ekstrakciją anglies dvideginiu, didžiausia gauta išeiga – iš paprastosios poniabudės bandinio. Šios ekstrakcijos išeiga siekė 0,80 %, o mažiausia – iš arbatos grybo bandinio, šio ekstrakto gauta išeiga – 0,21 %.
3. Atlikus grybų (lot. *Inonotus obliquus*, *Phallus impudicus*, *Kombucha*) pakopinę ekstrakciją, didėjančio poliškumo tirpikliais padidintame slėgyje su heksanu, didžiausia išeiga gauta paprastosios poniabudės bandinio – 0,93 %, o mažiausia arbatos grybo bandinio – 0,36 %. Atlikus ekstrakciją su acetonu, didžiausia išeiga gauta arbatos grybo bandinio – 9,27 %, o mažiausia paprastosios poniabudės bandinio – 1,19 %. Atlikus ekstrakciją su etanolium, didžiausia išeiga gauta arbatos grybo bandinio – 35,39 %, o mažiausia juodojo beržo grybo bandinio – 1,78 %.
4. Atlikus DPPH, FRAP, *Folin-Ciocalteu* metodus, nustatyta, kad visi junginiai yra pasižymintys antioksidacinėmis savybėmis. Stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo juodojo beržo (3) acetoninis ir (4) etanolinis ekstraktai. Mažiausiu efektyvumu pasižymėjo visų bandinių nepolinių junginių ekstraktai, gauti superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginiu ir tirpikliais padidintame slėgyje metodu.
5. Antibakterinis aktyvumas nustatytas 1–13 bandinių prieš *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų rūšis. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Escherichia coli* pasižymėjo paprastosios poniabudės (5) ekstraktas, gautas superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginiu, kurio slopinimo vertė siekė 14,0 mm. Taip pat prieš šią bakteriją visiškai jokio poveikio neparodė juodojo beržo grybo nepoliniai (1, 2) ekstraktai, kurie gauti superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginiu ir tirpikliais padidintame slėgyje metodu, bei etanolinis paprastosios poniabudės (8) ekstraktas. Stipriausią poveikį prieš *Bacillus subtilis* bakterijų rūšį parodė heksaninis poniabudės (6) ekstraktas, kurio vertė lygi 14,7 mm, o visiškai jokio poveikio neparodė arbatos grybo (13) liofilizuotas skystis.
6. Atlikus efektyviąją skysčių chromatografiją 2–4, 6–8, 10–12 ekstraktams, kurie gauti ekstrakcijos tirpikliais padidintame slėgyje metodu, nustatyta, kad didžiausia ergosterolio koncentracija pasižymėjo acetoninis (7) ekstraktas. Be to, ergosterolis nebuvo aptiktas visuose tirtuose arbatos grybo ekstraktuose bei juodojo beržo grybo heksaniniame (4) ekstrakto.
7. Suprojektuota juodojo beržo grybo etanolinio (4) ekstrakto pramoninės gamybos aparatūrinė schema, naudojant „Microsoft Visio“ programą.

Literatūros sąrašas

1. VENTURELLA, G. *et al.* Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22 (2), 634 [žiūrėta 2023-05-20]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/634/htm>.
2. ELKHATEEB, W.A. *et al.* Medicinal mushrooms as a new source of natural therapeutic bioactive compounds. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2019. 18 (2), 88 [žiūrėta 2023-05-20]. Prieiga per: <http://www.epj.eg.net/article.asp?issn=1687-4315;year=2019;volume=18;issue=2;spage=88;epage=101;aulast=Elkhateeb>.
3. ÖZTÜRK, M. *et al.* Mushrooms: A Source of Exciting Bioactive Compounds. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2015. 45 363–456 [žiūrėta 2023-05-20]. Prieiga per: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444634733000101?casa_token=LJF04FLULt0AAAAA:Gnrvv2-DSMq3Z48hZvdld_bWhalZpSi4Yi7Yz496kmKLaeZGciN8kLNNdvJXKYOG0wYC3y3SKQ.
4. GALLEGO, R. *et al.* Sub- and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – An update. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019. 116 198–213 [žiūrėta 2023-05-20]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599361930158X>.
5. MENA-GARCÍA, A. *et al.* Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019. 119, 115612 [žiūrėta 2023-05-21]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599361930158X>.
6. SZYCHOWSKI, K.A. *et al.* Inonotus obliquus - from folk medicine to clinical use. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2020. 11 (4), 293–302 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34195023/>.
7. MA, L. *et al.* Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom Inonotus obliquus. *Food Chemistry*. 2013. 139 (1–4), 503–508 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23561137/>.
8. BAEK, J. *et al.* Bioactivity-based analysis and chemical characterization of cytotoxic constituents from Chaga mushroom (Inonotus obliquus) that induce apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018. 224 63–75 p. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29800742/>.
9. DUAN, Y. *et al.* Genome sequencing of Inonotus obliquus reveals insights into candidate genes involved in secondary metabolite biosynthesis. *BMC Genomics*. 2022. 23 (1), 1–17, [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-022-08511-x>.
10. SOLEK, P. *et al.* Risk of wild fungi treatment failure: Phallus impudicus-induced telomere damage triggers p21/p53 and p16-dependent cell cycle arrest and may contribute to male fertility reduction in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021, 209–221, [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33321417/>.
11. CUI, Y. *et al.* Antioxidant effect of Inonotus obliquus. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 96 (1–2), 79–85 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410400457X>.
12. UPSKA, K. *et al.* Extraction possibilities of lipid fraction and authentication assessment of chaga (Inonotus obliquus). *Biomass Conversion and Biorefinery* [interaktyvus]. 2022, 1–17 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-021-02210-5>.

13. YAKAR, S. *et al.* Contributions to the distribution of Phallales in Turkey. *Anatolian Journal of Botany* [interaktyvus]. 2019, 51–58 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/335798244_Contributions_to_the_distribution_of_Phallales_in_Turkey.
14. VYACHESLAV, B. *et al.* Polysaccharides of Mushroom Phallus impudicus Mycelium: Immunomodulating and Wound Healing Properties Biotechnological principles of intensifying the cultivation of edible and medicinal macromycetes by low-intensity light. 2019, 35 (9), [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/337286626>.
15. ZOU, C. *et al.* Zijuan tea- based kombucha: Physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. *Food Chemistry*. 2021, ISSN 0308-8146 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621013285>.
16. TORÁN-PEREG, P. *et al.* Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2021, 23, ISSN 100314. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878450X21000135>.
17. SOARES, M.G. *et al.* Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends in Food Science & Technology*. 2021, 110, 539–550 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224421001187>.
18. MORALES, D. Biological activities of kombucha beverages: The need of clinical evidence. *Trends in Food Science & Technology*. 2020, 105, 323–333 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224420306154>.
19. LAAVANYA, D. *et al.* Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*. 2021, 295, ISSN 126454 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652621006740>.
20. JAYABALAN, R. *et al.* Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Science and Biotechnology*. 2010, 19 (3), 843–847 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-010-0119-6>.
21. RIJAL, R. *et al.* Biochemical Composition, Nutritional Values and Medicinal Properties of Some Edible Mushrooms : A Review The validation of MicroSnap™ rapid test kit to detect total viable count and Enterobacteriaceae in Egusi melon (*Citrullus lanatus*) seeds. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/355701686>.
22. BACH, F. *et al.* Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017, 52 (11), 2382–2392 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijfs.13522>.
23. ASSEMIE, A., ABAYA, G. The Effect of Edible Mushroom on Health and Their Biochemistry. *International Journal of Microbiology*. 2022 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pmc/articles/PMC8967584/>.
24. KURTZMAN, R.H. Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data. *Mycoscience*. 1997, 38, 247–253 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02460860>.
25. RHEE, S.J. *et al.* A comparative study of analytical methods for alkali-soluble β -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *LWT - Food Science and Technology*. 2008, 41 (3), 545–549 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02460860>.

26. EID, J.I., DAS, B. Molecular insights and cell cycle assessment upon exposure to Chaga (*Inonotus obliquus*) mushroom polysaccharides in zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020, 10 (1), 1–9 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-64157-3>.
27. ZHONG, X.H. *et al.* Progress of research on *Inonotus obliquus*. *Chinese journal of integrative medicine*. 2009, 15 (2), 156–160 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19407959/>.
28. AZUMA, K. *et al.* Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *Journal of functional biomaterials*. 2015, 6 (1), 33–49 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25594943/>.
29. KIM, H. *et al.* Preparation and characterization of various chitin-glucan complexes derived from white button mushroom using a deep eutectic solvent-based ecofriendly method. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 169, 122–129 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25594943/>.
30. HUQ, T. *et al.* Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2022, 7 (2), 85–98 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2369969822000020>.
31. LABAI, M. *et al.* The Effect Of Culture Fluid And Structural Components Of *Micelium Phallus Impudicus* L. *On The Proliferative Activity Of Lymphocytes*. 2019 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/235644/1/the-conference-2019-84.pdf>.
32. HNATIUK O.,O. *et al.* Phyto-Chemical Research Of Mushroom Treatments *Phallus Impudicus*. 2019 [žiūrėta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/19928/1/141.pdf>.
33. BUKO, V. *et al.* Polysaccharides of Mushroom *Phallus impudicus* Mycelium: Immunomodulating and Wound Healing Properties. *Modern Food Science and Technology*. 2019, 35 (9), 30–37 [žiūrėta 2023-05-07]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/337286626_Polysaccharides_of_Mushroom_Phallus_impudicus_Mycelium_Immunomodulating_and_Wound_Healing_Properties.
34. ANTOLAK, H. *et al.* Kombucha Tea-A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021, 10 (10) [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34679676/>.
35. FAHAD AL-DULAIMI K.Y. *et al.* Bioactivity Study of Kombucha Black tea and Kombucha with Skim Milk on Some of Physiological and Biochemical Parameters in Male Albino Rats. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/329130619_Bioactivity_Study_of_Kombucha_Black_tea_and_Kombucha_with_Skim_Milk_on_Some_of_Physiological_and_Biochemical_Parameters_in_Male_Albino_Rats.
36. IBRAHIM N.K. Possible protective effect of Kombucha Tea Ferment on cadmium chloride induced liver and kidney damage in irradiated rats. 2011 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/286361670_Possible_protective_effect_of_Kombucha_Te_a_Ferment_on_cadmium_chloride_induced_liver_and_kidney_damage_in_irradiated_rats.
37. SKNEPNEK, A. *et al.* Fermentation characteristics of novel *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes* kombucha beverages and immunomodulatory potential of their polysaccharide extracts. *Food Chemistry*. 2021, 342, ISSN 128344 [žiūrėta 2023-05-08]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/344863450_Fermentation_characteristics_of_novel_Corio

- lus_versicolor_and_Lentinus_edodes_kombucha_beverages_and_immunomodulatory_potential_of_their_polysaccharide_extracts.
38. XU, X. *et al.* Stimulated production of triterpenoids of *Inonotus obliquus* using methyl jasmonate and fatty acids. *Industrial Crops and Products*. 2016, 85, 49–57 [žiūrēta 2023-05-09]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016300681>.
 39. PENG, H., SHAHIDI, F. Qualitative analysis of secondary metabolites of chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*): phenolics, fatty acids, and terpenoids. *Journal of Food Bioactives*. 2022, 17, 56–72 [žiūrēta 2023-05-09]. Prieiga per: <http://www.isnff-jfb.com/index.php/JFB/article/view/279/450>.
 40. PENG, H., SHAHIDI, F. Qualitative analysis of secondary metabolites of chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*): phenolics, fatty acids, and terpenoids. *Journal of Food Bioactives*. 2022, 17 [žiūrēta 2023-05-09]. Prieiga per: <http://www.isnff-jfb.com/index.php/JFB/article/view/279/450>.
 41. EBRAHIMI PURE, A. *et al.* Chemical composition of garlic fermented in red grape vinegar and kombucha. *Journal of Functional Foods*. 2017, 34, 347–355 [žiūrēta 2023-05-09]. Prieiga per: <https://research.kombuchabrewers.org/wp-content/uploads/kk-research-files/chemical-composition-of-garlic-fermented-in-red-grape-vinegar-and-kombucha.pdf>.
 42. ABU-REIDAH, I.M. *et al.* Effects of pH and temperature on water under pressurized conditions in the extraction of nutraceuticals from chaga (*Inonotus obliquus*) mushroom. *Antioxidants*. 2021, 10 (8), 1322 [žiūrēta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/8/1322/htm>.
 43. UZUN, Y. *et al.* The mineral contents of some wild edible mushrooms. *Ekoloji*. 2011, (80), 6–12 [žiūrēta 2023-05-08]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/278013183_The_Mineral_Contents_of_Some_Wild_Edible_Mushrooms.
 44. JAKUBCZYK, K. *et al.* Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants*. 2020, 9 (5) [žiūrēta 2023-05-08]. Prieiga per: <https://pmc/articles/PMC7278673/>.
 45. BACH, F. *et al.* Bio compounds of edible mushrooms: in vitro antioxidant and antimicrobial activities. *LWT*. 2019, 107, 214–220 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819301987>.
 46. ZHENG, W. *et al.* Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technology*. 2009, 100 (3), 1327–1335 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18824349/>.
 47. LEE, I.K. *et al.* New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007, 17 (24), 6678–668 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17980585/>.
 48. JU, H.K. *et al.* Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Food Chemistry*. 2010, 119 (2), 619–625 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/223393377_Effect_of_steam_treatment_on_soluble_phenolic_content_and_antioxidant_activity_of_the_Chaga_mushroom_Inonotus_obliquus.
 49. BURMASOVA, M.A. *et al.* Melanins of *Inonotus Obliquus*: Bifidogenic and Antioxidant Properties. *Biomolecules*. 2019, 9 (6), 248 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/6/248/htm>.
 50. MITROPOLSKAYA, N.Yu. *et al.* Melanin Complex from Medicinal Mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat (Chaga) (Aphyllphoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2002, 4 (2), 8 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/223393377_Effect_of_steam_treatment_on_soluble_phenolic_content_and_antioxidant_activity_of_the_Chaga_mushroom_Inonotus_obliquus.

- https://www.researchgate.net/publication/269620262_Melanin_Complex_from_Medicinal_Mushroom_Inonotus_obliquus_Pers_Fr_Pilat_Chaga_Aphyllphoromycetideae.
51. WOLD, C.W. *et al.* Bioactive triterpenoids and water-soluble melanin from *Inonotus obliquus* (Chaga) with immunomodulatory activity. *Journal of Functional Foods*. 2020, 71, ISSN 104025 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620302498>.
 52. PAPOUTSIS, K. *et al.* Recovery of ergosterol and vitamin D2 from mushroom waste - Potential valorization by food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology* . 2020, 99, 351–366 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422442030008X> .
 53. SUN, Y. *et al.* In vitro antitumor activity and structure characterization of ethanol extracts from wild and cultivated Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilát (Aphyllphoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2011, 13 (2), 121–130 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/51848142_In_Vitro_Antitumor_Activity_and_Structure_Characterization_of_Ethanol_Extracts_from_Wild_and_Cultivated_Chaga_Medicinal_Mushroom_Inonotus_obliquus_PersFr_Pilat_Aphyllphoromycetideae.
 54. NGUYEN, T.M.N. *et al.* Anti-allergic effect of inotodiol, a lanostane triterpenoid from Chaga mushroom, via selective inhibition of mast cell function. *International Immunopharmacology*. 2020, 81, ISSN 106244 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035309/>.
 55. GÉRY, A. *et al.* Chaga (*Inonotus obliquus*), a Future Potential Medicinal Fungus in Oncology? A Chemical Study and a Comparison of the Cytotoxicity Against Human Lung Adenocarcinoma Cells (A549) and Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Integrative Cancer Therapies*. 2018, 17 (3), 832 [žiūrēta 2023-04-24]. Prieiga per: [/pmc/articles/PMC6142110/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035309/).
 56. STOJKOVIC, D. *et al.* An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*. 2019, 120, 100–103 [žiūrēta 2023-04-24]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629917314205>.
 57. SRIVASTAVA, A., KUMAR, P. Nutraceuticals in anxiety and stress. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. 2021, 63–72 [žiūrēta 2023-05-07]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/348900978_Nutraceuticals_in_anxiety_and_stress.
 58. KUMAR, D., DUBEY, K.K. Hybrid Approach for Transformation for Betulin (an Anti-HIV Molecule). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*. 2019, 193–203 [žiūrēta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473782/>.
 59. KWAK, A.M. *et al.* Oxalic Acid from *Lentinula edodes* Culture Filtrate: Antimicrobial Activity on Phytopathogenic Bacteria and Qualitative and Quantitative Analyses. *Mycobiology*. 2016, 44 (4), 338 [žiūrēta 2023-05-07]. Prieiga per: [/pmc/articles/PMC5287170/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035309/).
 60. JANG, J.Y. *et al.* Biological Control of *Meloidogyne incognita* by *Aspergillus niger* F22 Producing Oxalic Acid. *PLOS ONE*. 2016, 11 (6) [žiūrēta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0156230>.
 61. KIM, J. *et al.* Composition of Triterpenoids in *Inonotus obliquus* and Their Anti-Proliferative Activity on Cancer Cell Lines. 2020, 25 (18), 4066 [žiūrēta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/18/4066/htm>.

62. NGUYEN, T.M.N. *et al.* Anti-allergic effect of inotodiol, a lanostane triterpenoid from Chaga mushroom, via selective inhibition of mast cell function. *International Immunopharmacology*. 2020, 81, ISSN 106244 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035309/>.
63. HUYNH, N. *et al.* Supercritical CO₂ Extraction of Triterpenoids from Chaga Sterile Conk of *Inonotus obliquus*. 2022, 27 (6), 1880 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/6/1880/htm>.
64. ZHAO, F. *et al.* Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities. *Fitoterapia*. 2015, 101, 34–40 [žiūrėta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25542686/>.
65. KWON, O. *et al.* Chaga mushroom-induced oxalate nephropathy that clinically manifested as nephrotic syndrome: A case report. *Medicine*. 2022, 101 (10) [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/368913114/>.
66. ABU-REIDAH, I.M. *et al.* Effects of pH and Temperature on Water under Pressurized Conditions in the Extraction of Nutraceuticals from Chaga (*Inonotus obliquus*) Mushroom. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021, 10 (8), [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34439572/>.
67. EL-RAMADY, H. *et al.* Edible Mushrooms for Sustainable and Healthy Human Food: *Nutritional and Medicinal Attributes*. 2022, 14 (9), 494 [žiūrėta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/9/4941/htm>.
68. BORG-KARLSON, A.K. *et al.* Dimethyl oligosulphides, major volatiles released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus*. *Phytochemistry*. 1994, 35 (2), 321–323 [žiūrėta 2023-05-07]. Prieiga per: https://www.academia.edu/53620688/Dimethyl_oligosulphides_major_volatiles_released_from_Sauromatum_guttatum_and_Phallus_impudicus.
69. CHOI, E. *et al.* Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea(XL) - A Sterol of *Phallus impudicus*. *The Korean Journal of Mycology*. 1983, 11 (2), 97–98 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://koreascience.kr/article/JAKO198303040059958.1ff8page>.
70. BHATTACHARYA, S. *et al.* Ergosterol Synthesis. *Encyclopedia of Mycology*. 2021, 230–238 [žiūrėta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128199909000706>.
71. ARUNACHALAM, K. *et al.* The Antioxidant Properties of Mushroom Polysaccharides can Potentially Mitigate Oxidative Stress, Beta-Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, 13, 1 [žiūrėta 2023-05-07]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3689117613/>.
72. FIEDZIUKIEWICZ, M *et al.* Mushroom Toxins - The Meixner Test. 2013 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://etheses.whiterose.ac.uk/3958/2/Mushroom_Toxins_-_The_Meixner_Test.pdf.
73. SARKER, S.R. *et al.* In Vitro Delivery of Cell Impermeable Phalloxin Using Cationic Liposomes Composed of Lipids Bearing Lysine Headgroup. *ACS Applied Bio Materials*. 2020, 3 (4), 2048–2057 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsabm.9b01167>.
74. GRAMZA-MICHALOWSKA, A. *et al.* Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*. 2016, 15 (4), 447–457 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28071022/>.
75. IVANIŠOVÁ, E. *et al.* Kombucha Tea Beverage: Microbiological Characteristic, Antioxidant Activity, And Phytochemical Composition. *Akadémiai Kiadó, Budapest Acta Alimentaria*. 2019, 48 (3), 324–331 [žiūrėta 2023-04-17].

76. YAHFOUFI, N. *et al.* The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. 2018, 10 (11), 1618 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1618/htm>.
77. BISHOP, P. *et al.* Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances*. 2022 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772753X22000144>.
78. AL-MOHAMMADI, A.R. *et al.* Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. *Molecules*. 2021, 26 (16) [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: [/pmc/articles/PMC8401643/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35401643/).
79. ABACI, N. *et al.* Kombucha – An ancient fermented beverage with desired bioactivities: A narrowed review. 2022, 14, 100302 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590157522001006>.
80. MASSOUD, R. *et al.* All Aspects of Antioxidant Properties of Kombucha Drink. Review. 2022, 12 (3), 4018–4027 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://biointerfaceresearch.com/>.
81. MARTÍNEZ-LEAL, J. *et al.* Recent Evidence of the Beneficial Effects Associated with Glucuronic Acid Contained in Kombucha Beverages. *Current Nutrition Reports*. 2020, 9 (3), 163–170 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13668-020-00312-6>.
82. LAUREYS, D. *et al.* The Science of Beer Kombucha Tea Fermentation: A Review CORE View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk. 2020 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ujbc20>.
83. NGUYEN, N.K. *et al.* Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha. *SpringerPlus*. 2015, 4 (1), 1–6 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s40064-015-0872-3>.
84. KUMAR, V., JOSHI YASHWANT SINGH PARMAR, V. Kombucha: Technology, Microbiology, Production, *Composition and Therapeutic Value*. 2016 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/309632876>.
85. NURIKASARI, M. *et al.* Characterization and Analysis Kombucha Tea Antioxidant Activity Based on Long Fermentation as a Beverage *Functional*. *Journal of Global Research in Public Health*. 2017, 2 (2), 90–96 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.neliti.com/publications/225036/>.
86. ZAKY, A.A. *et al.* Bioactivities, Applications, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From Food and By-Products: A Review. *Frontiers in Nutrition*. 2021, 8, 815640 [žiūrēta 2023-05-08]. Prieiga per: [/pmc/articles/PMC8810531/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35401643/).
87. CUI, Y. *et al.* Antioxidant effect of Inonotus obliquus. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 96 (1–2), 79–85 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15588653/>.
88. DU, X.J. *et al.* Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from Inonotus obliquus sclerotia. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 62, 691–696 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145301/>.
89. DU, X.J. *et al.* Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from Inonotus obliquus sclerotia. *International Journal of Biological Macromolecules* . 2013. 62 691–696 p. [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145301/>.
90. HWANG, B.S. *et al.* Phenolic compounds from the fungus Inonotus obliquus and their antioxidant properties. *The Journal of Antibiotics* 2016 69:2 [interaktyvus]. 2015. 69 (2), 108–110 p. [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.nature.com/articles/ja201583>.

91. BURMASOVA, M.A. *et al.* Melanins of *Inonotus Obliquus*: Bifidogenic and Antioxidant Properties. *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 248 [interaktyvus]. 2019. 9 (6), 248 p. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/6/248/htm>.
92. ZHENG, W. *et al.* Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technology* . 2009. 100 (3), 1327–1335 p. [žiūrėta 2023-04-17]. . .
93. SOLEK, P. *et al.* Wild Medicinal Fungi: *Phallus Impudicus*-induced Telomere Damage Triggers p21/p53 and p16-dependent Cell Cycle Arrest and Drives to Male Fertility Reduction in Vitro. 2020. [žiūrėta 2023-04-17]. . Prieiga per: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-47590/v1>.
94. BUKO, V. *et al.* Polysaccharides of Mushroom *Phallus impudicus* Mycelium: Immunomodulating and Wound Healing Properties. *Modern Food Science and Technology*. 2019. 35 (9), 30–37 p. [žiūrėta 2023-04-17]. . Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/337286626_Polysaccharides_of_Mushroom_Phallus_impudicus_Mycelium_Immunomodulating_and_Wound_Healing_Properties.
95. JAFARI, R. *et al.* Kombucha microbial starter with enhanced production of antioxidant compounds and invertase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* . 2020. 29 101789 p. [žiūrėta 2023-04-17]. . .
96. Orison Lobo, R. *et al.* Kombucha for healthy living: Evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds. [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/317933232_Kombucha_for_healthy_living_Evaluation_of_antioxidant_potential_and_bioactive_compounds.
97. GLAMOČLIJA, J. *et al.* Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom”. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015, 162, 323–332 [žiūrėta 2023-04-19]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25576897/>.
98. BALANDAYKIN, M.E., ZMITROVICH, I. V. Review on chaga medicinal mushroom, *inonotus obliquus* (Higher Basidiomycetes): Realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2015, 17 (2), 95–104 [žiūrėta 2023-04-19]. . Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/273099088_Review_on_Chaga_Medicinal_Mushroom_Inonotus_obliquus_Higher_Basidiomycetes_Realm_of_Medicinal_Applications_and_Approaches_on_Estimating_its_Resource_Potential.
99. Лобатюк, А. Н., Иконникова, Н. В. Электронная библиотека БГУ: Изучение антимикробной активности экстрактов гриба *Phallus impudicus*. [žiūrėta 2023-04-19]. Prieiga per: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/251341>.
100. BHATTACHARYA, D. *et al.* Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. *Current Microbiology*. 2016, 73 (6), 885–896 [žiūrėta 2023-04-19]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-016-1136-3>.
101. AL-MOHAMMADI, A.R. *et al.* Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2021, 26 (16), [žiūrėta 2023-04-19]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34443614/>.
102. PURE, A.E., PURE, M.E. Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. *Applied Food Biotechnology* [interaktyvus]. 2016, 3 (2), 125–130 [žiūrėta 2023-04-19]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/298788857_Antioxidant_and_Antibacterial_Activity_of_Kombucha_Beverages_Prepared_using_Banana_Peel_Common_Nettles_and_Black_Tea_Infusions.

103. VOHRA, B.M. *et al.* Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of Kombucha. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences Special Issue on International Conference on Agriculture*. 2018, 298–302 [žiūrēta 2023-04-19].
Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/334316882_Effects_of_medium_variation_and_fermentation_time_on_the_antioxidant_and_antimicrobial_properties_of_Kombucha.
104. AHMED, Z. Medicinal And Antimicrobial Properties Of Mushrooms. 2013, 19(1,2), 41-48 [žiūrēta 2023-04-19]. Prieiga per: https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:46005387.
105. JAIME, L. *et al.* Extraction of functional ingredients from spinach (*Spinacia oleracea* L.) using liquid solvent and supercritical CO₂ extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, 95 (4), 722–729 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.6788>.
106. WANG, Q. *et al.* Peanut By-Products Utilization Technology. *Peanuts: Processing Technology and Product Development*. 2016, 211–325 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/304108481_Peanut_By-Products_Utilization_Technology.
107. LIZCANO, S.C. *et al.* Fruit Agroindustrial Wastes for Preparing Beverages for Medicinal Purposes by Supercritical Fluid Extraction Technology: Andes Berry (*Rubus glaucus* benth) Case. *Production and Management of Beverages*. 2019, 151–177 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.semanticscholar.org/paper/Fruit-Agroindustrial-Wastes-for-Preparing-Beverages-Lizcano-D%C3%A1vila/11ba33ac04c9fc79ff87c021c1f13722e77b5729>.
108. HERRERO, M. *et al.* Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217 (16), 2495–2511 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/222669010_Supercritical_Fluid_Extraction_Recent_Advances_and_Applications.
109. VIGANÓ, J. *et al.* Exploring the selectivity of supercritical CO₂ to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, 110, 1–10 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089684461530200X>.
110. LUQUE DE CASTRO, M.D., JIMÉNEZ-CARMONA, M.M. Where is supercritical fluid extraction going? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2000, 19 (4), 223–228 [žiūrēta 2023-04-17].
Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/223689818_Where_is_supercritical_fluid_extraction_going.
111. WANG, W. *et al.* Supercritical Carbon Dioxide Applications in Food Processing. *Food Engineering Reviews*. 2021, 13 (3), 570–591 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/346536535_Supercritical_Carbon_Dioxide_Applications_in_Food_Processing.
112. KHAWLI, F. Al *et al.* Innovative green technologies of intensification for valorization of seafood and their by-products. *Marine Drugs*. 2019, 17 (12), [žiūrēta 2023-04-24]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31817754/>.
113. GOUVEIA, L. *et al.* Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry*. 2007, 101 (2), 717–723 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606001439>.
114. YEN, H.W. *et al.* Supercritical fluid extraction of valuable compounds from microalgal biomass. *Bioresource Technology*. 2015, 184, 291–296 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414014424>.

115. BOCEVSKA, M., SOVOVÁ, H. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2007, 40 (3), 360–367 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844606002002>.
116. MARCO, I. DE *et al.* Life cycle assessment of supercritical CO₂ extraction of caffeine from coffee beans. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018, 133, 393–400 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/320986465_Life_cycle_assessment_of_supercritical_CO_2_extraction_of_caffeine_from_coffee_beans.
117. CARDENAS-TORO, F.P. *et al.* Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. *Food and Bioproducts Processing*. 2015, 94, 90–100 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.academia.edu/30265384/Pressurized_liquid_extraction_and_low-pressure_solvent_extraction_of_carotenoids_from_pressed_palm_fiber_Experimental_and_economical_evaluation?auto=download.
118. ALVAREZ-RIVERA, G. *et al.* Pressurized Liquid Extraction. *Liquid-Phase Extraction*. 2020, 375–398 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012816911700013X>.
119. MANDAL, S.C. *et al.* Classification of Extraction Methods. *Essentials of Botanical Extraction*. 2015, 83–136 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/282596453_Chapter_6_Classification_of_Extraction_Methods.
120. SORIA, A.C. *et al.* Sample Preparation for the Determination of Carbohydrates in Food and Beverages. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*. 2012, 213–243 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/286063450_Sample_Preparation_for_the_Determination_of_Carbohydrates_in_Food_and_Beverages.
121. WIANOWSKA, D., GIL, M. Critical approach to PLE technique application in the analysis of secondary metabolites in plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, 114, 314–325 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/332054639_Critical_approach_to_PLE_technique_application_in_the_analysis_of_secondary_metabolites_in_plants.
122. OTERO, P. *et al.* Pressurized Liquid Extraction (PLE) as an Innovative Green Technology for the Effective Enrichment of Galician Algae Extracts with High Quality Fatty Acids and Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Marine Drugs*. 2018, 16 (5), 156 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/1660-3397/16/5/156/htm>.
123. CHAVES, J.O. *et al.* Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. *Frontiers in Chemistry*. 2020, 8, 864 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.507887/full>.
124. TEJEDOR-CALVO, E. *et al.* Application of Pressurized Liquid Extractions to Obtain Bioactive Compounds from *Tuber aestivum* and *Terfezia clavaryi*. *Foods*. 2022, 11 (3), 298 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/3/298/htm>.
125. DAWIDOWICZ, A.L. *et al.* Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta*. 2008, 76 (4), 878–884 [žiūrėta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18656673/>.
126. OTERO, P. *et al.* Application of pressurized liquid extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and phenols from *Laminaria ochroleuca* collected in Galicia (NW Spain). *Journal of*

- Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, 164, 86–92 [žiūrēta 2023-04-17]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708518317655>.
127. ZHANG, H.L. *et al.* Lignocellulose utilization and bacterial communities of millet straw based mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Scientific Reports*. 2019, 9 (1), 1–13 [žiūrēta 2023-05-14]. Prieiga per: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-37681-6>.
128. GOULDING, D.A. *et al.* Milk proteins: An overview. *Milk Proteins: From Expression to Food*. 2020, 21–98 [žiūrēta 2023-04-25]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/338806299_Milk_proteins_An_overview.
129. HEWAVITHARANA, G.G. *et al.* Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020, 13 (8), 6865–6875 [žiūrēta 2023-04-25]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/342805161_Extraction_methods_of_fat_from_food_samples_and_preparation_of_fatty_acid_methyl_esters_for_gas_chromatography_A_Review.
130. ESSIEN, S.O. *et al.* Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. *Trends in Food Science & Technology*. 2020, 97, 156–169 [žiūrēta 2023-05-14]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/342805161_Extraction_methods_of_fat_from_food_samples_and_preparation_of_fatty_acid_methyl_esters_for_gas_chromatography_A_Review.
131. KAYA, M., CAM, M. Eritadenine: Pressurized liquid extraction from *Lentinula edodes* and thermal degradation kinetics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2022, 29, 100809 [žiūrēta 2023-05-31]. Prieiga per: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554122002133?casa_token=hsNc9CheZ7UAAAAA:aB_jz9JJaRjPkRZfO2A9GQbQaZs9yziuYAN2BvUkHidX2FauqCUhiCy3cdzbVjfXyG_BePG_.
132. RUMPF, J. *et al.* Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, 233, 123470 [žiūrēta 2023-04-27]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813023003628>.
133. GHARPURE, S. *et al.* Non-antibacterial as well as non-anticancer activity of flower extract and its biogenous silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2019, 30 (19), 195701 [žiūrēta 2023-05-14]. Prieiga per: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6528/ab011a>.
134. Chiocchio V., M. *et al.* Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. [žiūrēta 2023-05-22]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/267422208_Determination_of_ergosterol_in_cellular_fungi_by_HPLC_A_modified_technique.
135. ULZIJARGAL, E., MAU, J.L. Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia. *International journal of medicinal mushrooms*. 2011, 13 (4), 343–349 [žiūrēta 2023-05-16]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22164764/>.
136. UPSKA, K. *et al.* Extraction possibilities of lipid fraction and authentication assessment of chaga (*Inonotus obliquus*). *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022, 1, 1–17 [žiūrēta 2023-05-16]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-021-02210-5>.
137. SUN, Y.J. *et al.* Dysosmaflavonoid A–F, new flavonols with potent DPPH radical scavenging activity from *Dysosma versipellis*. *Fitoterapia*. 2023, 166, 105440 [žiūrēta 2023-04-27]. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36736596/>.
138. MFOTIE NJOYA, E. Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. 2021, 349–357 [žiūrēta 2023-04-27]. Prieiga per:

- https://www.researchgate.net/publication/348904899_Medicinal_plants_antioxidant_potential_and_cancer.
139. 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*. 2017, 107–115 [žiūrēta 2023-04-27]. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781119135388.ch6>.
 140. SINGH, K. *et al.* Antiviral and Antimicrobial Potentiality of Nano Drugs. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*. 2019, 343–356 [žiūrēta 2023-05-05]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/330049653_Antiviral_and_Antimicrobial_Potentiality_of_Nano_Drugs.
 141. LONG, N. *et al.* Inflammatory and pathological changes in Escherichia coli infected mice. *Heliyon*. 2022, 8 (12), e12533 [žiūrēta 2023-05-05]. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9834738/>.
 142. MARTINEZ, R.M. Bacillus subtilis. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. 2013, 246–248 [žiūrēta 2023-05-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012374984000125X>.
 143. KU, Y.S. *et al.* Soybean secondary metabolites and flavors: The art of compromise among climate, natural enemies, and human culture. *Advances in Botanical Research*. 2022, 102, 295–347 [žiūrēta 2023-05-05]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065229622000349>.
 144. SUN, Y. *et al.* Conversion of ergosterol into vitamin D2 and other photoisomers in Agaricus bisporus mushrooms under UV-C irradiation. *Food Bioscience*. 2022, 50, 102143 [žiūrēta 2023-05-22]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/364969045_Conversion_of_ergosterol_into_vitamin_D2_and_other_photoisomers_in_Agaricus_bisporus_mushrooms_under_UV-C_irradiation.
 145. Maeda S., S. *et al.* Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. [žiūrēta 2023-05-30]. Prieiga per: https://www.researchgate.net/publication/265135981_Recommendations_of_the_Brazilian_Society_of_Endocrinology_and_Metabology_SBEM_for_the_diagnosis_and_treatment_of_hypovitaminosis_D.