



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Fitochemikalų ir bioaktyvumo įvertinimas brokolių (lot.
Brassica oleracea var. *italica*) kaliaus kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Paulina Lukošūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2025



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Fitochemikalų ir bioaktyvumo įvertinimas brokolių (lot.
Brassica oleracea var. *italica*) kaliaus kultūrose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Paulina Lukošiuūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Birutė Grybaitė

Recenzentė

Kaunas, 2025



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Paulina Lukošiuūtė

Fitochemikalų ir bioaktyvumo įvertinimas brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) kaliaus kultūrose *in vitro*

Akademino sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

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

Paulina Lukošiuūtė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Lukošiūtė, Paulina. Fitochemikalų ir bioaktyvumo įvertinimas brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) kaliaus kultūrose *in vitro*. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: brokoliai, *Brassica oleracea* var. *italica*, kryžmažiedžiai augalai, metioninas, triptofanas, bioaktyvieji junginiai, gliukozinolatai, kaliaus kultūros, *in vitro*.

Kaunas, 2025. 56 p.

Santrauka

Brokoliai (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) yra viena iš labiausiai paplitusių kryžmažiedžių daržovių pasaulyje, pasižyminti antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis, antimikrobinėmis ir neuroprotektinėmis savybėmis. Dėl maistinio ir sveikatai puikaus potencialo, maistui yra įprasta naudoti brokolių žiedynus ir daigus, o stiebai ir lapai, nuimant derlių, yra atliekos. Tačiau šios nepakankamai išnaudojamos daržovių dalys taip pat gali būti panaudojamos kaip funkciniai maisto šaltiniai, prisidedantys prie tam tikrų lėtinių sutrikimų prevencijos ir gydymo. Siekiant pagerinti ir užtikrinti pageidaujamas brokolių sintetinas antrinių metabolitų koncentracijas laboratoriniais metodais, naudojami fitohormonai, reguliuojantys augalų augimą, vystymąsi bei ląstelių diferenciaciją ir dalijimąsi.

Tyrimo metu buvo formuojamos brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) kaliaus kultūros *in vitro*, kurios tarpusavyje skyrėsi mitybinių terpių sudėtimi. Mitybinių terpių papildymui naudoti auksinai (2,4-D) ir citokininai (BAP) bei aminorūgštys (L-metioninas ir L-triptofanas). Suformavus brokolių kaliaus kultūras *in vitro*, buvo vertinamas jų antioksidacinis aktyvumas skirtingais metodais. DPPH, ABTS bei FRAP metodais nustatyta, jog brokolių lapų, šaknų ir stiebų MS mitybinės terpės papildymas su BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) bei L-metioninu (100 µM) labiausiai paskatino antioksidacines savybes. Atlikus superoksido dismutazės įvertinimą, reikšmingiausią šio fermento aktyvumą lapų ir stiebų kaliaus kultūrose lėmė MS terpės papildymas BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo hormonais. Atlikus pigmentų įvertinimo metodą, nustatyta, jog brokoliai daugiausiai kaupia karotinoidus, o didžiausias jų koncentracijas, ypač lapų kaliaus kultūroje, lėmė mitybinių terpių papildymas aminorūgštimis. Didžiausią įtaką gliukozinolatų sintetinimui diferencijuotuose brokolių audiniuose turėjo MS terpės papildymas L-metioninu. Taip pat šio tyrimo metu buvo įvertintas ekstraktų malondialdehido, fenolinių junginių ir rūgščių, baltymų, flavonoidų, L-prolino ir redukuoto glutatono koncentracijos. Pasiūlyta gliukozinolatų ekstrakcijos iš brokolių kaliaus kultūrų technologinė schema.

Lukošiūtė, Paulina. Evaluation of Phytochemicals and Bioactivity in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Callus Cultures in Vitro / Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: broccoli, *Brassica oleracea* var. *italica*, cruciferous plants, methionine, tryptophan, bioactive compounds, glucosinolates, callus cultures, *in vitro*.

Kaunas, 2025. 56.

Summary

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) is one of the most common cruciferous vegetables in the use worldwide, with antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and neuroprotective properties. Due to its nutritional and health potential, it is common to use broccoli florets and sprouts for food, while the stems and leaves are waste at harvest. However, these under-utilised parts of the vegetable can also be used as functional food sources contributing to the prevention and treatment of certain chronic disorders. Phytohormones that regulate plant growth, development and cell differentiation and division are used to improve and ensure the desired concentrations of secondary metabolites synthesised by broccoli in laboratory methods.

In this study, broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) callus cultures were established *in vitro*, which differed in the composition of the nutrient media. Auxins (2,4-D) and cytokinins (BAP) together with amino acids (L-methionine and L-tryptophan) were used to supplement the nutrient media. After *in vitro* broccoli callus cultures were established, their antioxidant activity was assessed by different methods. The DPPH, ABTS and FRAP methods showed that supplementation of broccoli leaf, root and stem MS nutrient media with BAP (2 mg/l) and 2,4-D (0.2 mg/l) and L-methionine (100 µM) was the most effective in promoting the antioxidant properties. The evaluation of superoxide dismutase showed that the most significant activity of this enzyme in leaf and stem callus cultures was due to the addition of growth hormones BAP (2 mg/l) and 2,4-D (0.2 mg/l) to MS medium. The method for the evaluation of pigments showed that broccoli accumulates mainly carotenoids, and that the highest concentrations of carotenoids, especially in leaf callus culture, were due to the addition of amino acids to the nutrient media. The greatest effect on glucosinolate synthesis in differentiated broccoli tissues was due to the addition of L-methionine to MS medium. The concentrations of malondialdehyde, phenolic compounds and acids, proteins, flavonoids, L-proline and reduced glutathione were also evaluated in this study. A technological scheme for the extraction of glucosinolates from broccoli callus cultures was proposed.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Brokolių (lot. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>) charakteristika	10
1.2. Brokolių kaliaus kultūros	11
1.3. Brokoliuose randami bioaktyvieji junginiai	12
1.4. Gliukozinolatai ir jų kaupimosi dėsniniai.....	13
1.5. Augimą reguliuojančios medžiagos	15
1.5.1. Citokininai	16
1.5.2. Auksinai.....	16
1.6. Brokolių antibakterinis poveikis.....	17
1.7. Brokolių antioksidacinis poveikis	17
1.8. Brokolių pritaikymo galimybės	18
1.9. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	19
2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	20
2.1. Tyrimų metu naudotos įrangos sąrašas.....	20
2.2. Tyrimų metu naudoti reagentai.....	20
2.3. Sėklų sterilinimas	21
2.4. Terpių ruošimas	21
2.5. Brokolių (lot. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	22
2.5.1. Brokolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu.....	22
2.5.2. Brokolių redukcinį (antioksidacinį) savybių įvertinimas	23
2.5.3. Brokolių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną	23
2.5.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	24
2.6. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas	24
2.7. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų įvertinimas.....	26
2.8. Baltymų išskyrimas iš brokolių augalinės masės	26
2.9. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu	27
2.10. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas.....	28
2.11. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas.....	28
2.12. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas	29
2.13. Redukuoto glutationo (GSH) koncentracijos įvertinimas	30
2.14. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas	30

2.15. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas.....	31
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	32
3.1. Brokolių (lot. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>) kaliaus kultūros <i>in vitro</i>	32
3.2. Brokolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	32
3.2.1. Brokolių ekstraktų antioksidacinių aktyvumo įvertinimas DPPH metodu.....	32
3.2.2. Brokolių ekstraktų redukcinių savybių įvertinimas.....	33
3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas brokolių ekstraktuose pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ.....	34
3.2.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	35
3.3. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas	36
3.4. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas	37
3.5. Baltymų išskyrimas iš brokolių augalinės masės	39
3.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu	40
3.7. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas brokolių ekstraktuose	41
3.8. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas.....	42
3.9. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas.....	43
3.10. Redukuoto glutationo koncentracijos įvertinimas	44
3.11. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas	45
3.12. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas.....	46
4. Rekomendacijų dalis	48
Išvados	51
Literatūros sąrašas	52
Publikacijų sąrašas	56
Priedai.....	57
1 priedas. Maitinamosios Murashige & Skoog (MS) terpės sudėtis	57

Santrumpų ir terminų sąrašas

BAP – 6-benzilaminopurinas;

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

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

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinės jėgos metodas;

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfonrūgšties) radikalas;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;

MS – *Murashige-Skoog*;

ROS – reaktyviosios deguonies rūšys;

SOD – superoksido dismutazė;

MDA – malondialdehidas;

NAR – 1-naftilacto rūgštis;

IBR – 3-indolilbutano rūgštis;

IAR – 3-indolilacto rūgštis.

Įvadas

Pastaruoju metu ryškėja tendencija – produktų, kurie yra ekologiški bei nekenksmingi aplinkai, didėjanti paklausa. Augant visuomenės sąmoningumui vis labiau atsižvelgiama į ekonominę ir maistinę tiek naujų, tiek nepakankamai išnaudojamų daržovių svarbą. Kiekviena daržovių šeima pasižymi išskirtiniu fitocheminių medžiagų deriniu, išskiriančių jas iš kitų šeimų ar tos pačios šeimos daržovių. Brokoliai (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) yra vienos svarbiausių daržovių pasaulyje, kurių paklausa rinkoje didėja dėl aukštos maistinės vertės, vartotojų siekio rinktis daugiau funkcinių maisto produktų. Tačiau šiuo metu brokolių auginimas susiduria su iššūkiais, tokiais kaip poreikis užtikrinti pelningą gamybą ištisus metus, klimato kaitos pokyčiai, galimybės juos auginti įvairiose klimato zonose [1, 2].

Brokoliai pasižymi įvairiomis sveikatai naudingomis savybėmis, kurias suteikia fitocheminės medžiagos, tokios kaip vitaminai, fenoliai, karotinoidai, glutationas, mineralai. Jų sudėtyje esantys fenoliniai junginiai, žinomi kaip stiprūs antioksidantai, bei gliukozinolatai yra vienos veiksmingiausių bioaktyviųjų molekulių, kurios apsaugo nuo lėtinių ir degeneracinių ligų [2].

Nustatyta, jog veikiant abiotiniams stresams (t. y. sužeidimams, ultravioletiniams spinduliams, egzogeniniams fitohormonams), augaluose kaupiasi sveikatą stiprinantys junginiai. Todėl augalams, patyrusiems abiotinio streso sąlygas, gali būti išnaudojamas jų genetinis potencialas gaminti antrinius metabolitus, skatinančius didelės bioaktyviųjų molekulių koncentracijos kaupimąsi. Konkrečiu brokolių atveju, tam tikros abiotinio streso sąlygos gali būti naudojamos kaip vienas iš būdų paskatinant fenolinių junginių ir gliukozinolatus biosintezės procesų aktyvinimą ir taip pagerinant maistinių medžiagų kiekį. Tai tampa itin aktualu, kuomet reikia taikyti alternatyvias sodininkystės ir daržininkystės kultūrų panaudojimo galimybes, ypač šviežių produktų, neatitinkančių kokybės standartų, skirtų vartoti žmonėms [2, 3]. Todėl *in vitro* strategijos taikymas kartu panaudojant augalų augimo hormonus ir baltymines kilmės medžiagas suteikia galimybę pagerinti jų augimą, savybes ir padidinti bioaktyviųjų medžiagų koncentracijas.

Darbo tikslas - kiekybiškai išanalizuoti ir palyginti bioaktyvius fitocheminius junginius, esančius brokolių (lot. *Brassica oleraceae* var. *italica*) kaliaus kultūrų ekstraktuose.

Darbo uždaviniai:

1. paruošti maitinamąsias terpes, papildytas skirtingais fitohormonais ir suformuoti tiriamojo augalo kaliaus kultūras *in vitro*;
2. įvertinti brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą taikant DPPH, redukcinį, FRAP bei ABTS metodus;
3. išanalizuoti brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų SOD aktyvumą, *L*-prolino, baltymų, pigmentų, fenolinių junginių bei flavonoidų koncentracijas;
4. nustatyti gliukozinolatus brokolių kaliaus kultūrų ekstraktuose.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) charakteristika

Brokoliai (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) – valgomieji kryžmažiedžių šeimos augalai, kurių pagrindinę galvutę sudaro visiškai išsivysčiusios žiedinių pumpurų kekės, kurios yra laisviau išsidėsčiusios ant pailgų stiebų. Tai yra vienmetis žolinis augalas, vegetacijos metu užaugantis iki 400 mm, o žydėjimo pabaigoje siekia 1-2 metrus [4]. Subrendusio šviežio brokolio svoris gali siekti apie 776 g. Didžiausią subrendusio augalo dalį sudaro lapai (47 %), toliau sudaro stiebai (21 %), šaknys (17 %) ir žiedynai (15 %) (1.1 pav.). Brokolių sėklų svoris svyruoja nuo 0,33 iki 0,84 g/100 sėklų, o 7 dienų brokolių daigų svoris įprastai siekia 3,06 - 6,00 g/100 augalų. Šios daržovės turi daug botaninių dalių priklausomai nuo jų brandos stadijos (žr. 1.1 pav.). Paprastai mitybos tikslams naudojami brokolių daigai bei brokolių žiedynai su trumpais minkštais koteliais, o lapai ir stambūs stiebai yra šalutiniai produktai ir (ar) komerciškai nepakankamai išnaudojamos dalys [5].



1.1 pav. Brokolių (*Brassica oleracea* var. *italica*) botaninės dalys [6]

Egzistuoja skirtingos brokolių veislės. Plačiai pripažinti „Calabrese“ veislės brokoliai – dideli, žaliomis galvutėmis ir storais stiebais, vienmečiai bei auginami vėsiuoju metų laiku augalai. Kita brokolių veislė, vadinama žiediniais brokoliais, arba dar kitu pavadinimu - galvutiniiais brokoliais, turi baltas galvutes. Brokoliniai arba mažieji brokoliai turi smulkius kotelius, yra pailgi ir su mažomis galvutėmis. Violetiniai brokoliai labai panašūs į paprastuosius brokolius, tačiau yra violetinės spalvos ir mažesni [7].

Brokoliai yra labiausiai ištirta ir vartojama kryžmažiedžių šeimos daržovė, nes juose gausu geležies, kalcio, mineralinių medžiagų ir vitaminų A, C, E ir K, taip pat juose yra 3,3 % baltymų, daug riboflavino, niacino ir tiamino, vyrauja didelė karotinoidų koncentracija [8]. Kadangi brokoliai taip pat pasižymi fitocheminių medžiagų gausa, tokių kaip gliukozinolatai ir fenoliniai junginiai, mityba, kurioje gausu brokolių, turi daug privalumų žmogaus sveikatai. Daugybė tyrimų susiejo bioaktyviųjų

junginių gausą su priešūždegiminėmis, priešvėžinėmis, antioksidacinėmis, antibakterinėmis ir antihipertenzinėmis brokolių savybėmis. Dėl savo naudingųjų savybių brokoliai gali būti pritaikomi sveikatos problemoms, pavyzdžiui, diabetui, hipercholesterolemijai, širdies ir kraujagyslių ligoms bei jautrumo šviesai sutrikimams, gydyti [9].

1.2. Brokolių kaliaus kultūros

Augalų ląstelių ir audinių kultūrų biotechnologijos srityje sėkmingai regeneruojamos ląstelių ar audinių kultūros iš įvairių dalių: stiebų, lapų, šaknų. Augalų audinių kultūros remiasi tuo, kad daugelis augalų ląstelių turi gebėjimą regeneruoti visą augalą, vadinamą totipotentiškumu. Iš vienos ląstelės, augalo ląstelių be ląstelių sienelių (protoplastų), lapų gabalėlių ar, kiek rečiau šaknų, dažnai galima išauginti naują augalą kultūrinėje (mitybinėje) terpėje, jei yra reikiamų maistinių medžiagų ir augalinių hormonų [10].

Augalų dauginimas *in vitro* gali būti atliekamas naudojant vien tik BAP arba derinant jį su kitais hormonais, tokiais kaip 1-naftilacto rūgštis (NAR), 3-indolilbutano rūgštis (IBR), 3-indolilacto rūgštis (IAR) ir 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D). Taip pat, BAP galima naudoti kartu su dviem auksiniais, įskaitant NAR ir IAR, IAR ir IBR arba tik IBR. Nustatyta, jog vien tik BAP taikymas yra ekonomiškai efektyvus ir gali būti netgi naudingesnis nei kelių hormonų derinys. Atlikti tyrimai daigams daiginti rekomenduoja naudoti BAP koncentracijas nuo 1,0 iki 4,0 mg/l (1,0, 2,0, 2,5, 3,0 ir 4,0 mg/l) [10].

Grybelinė ir bakterinė *in vitro* tarša vis dar yra vienas iš svarbiausių ribojančių veiksnių auginant sumedėjusius augalus. Siekiant pašalinti grybelinį ir bakterinį užterštumą dezinfekcijos etapo metu, laboratorijose įprastai naudojami įvairūs paviršiaus sterilizavimo agentai, tokie kaip natrio ir kalcio hipochloritai (NaClO), etanolis, gyvsidabrio chloridas, sidabro nitratas, antibiotikai ir fungicidai [8].

Augalų audinių kultūroje kaip itin veiksminga paviršiaus sterilizavimo priemonė naudojamos sidabro nanodalelės. Tyrimai parodė, kad jos neturi neigiamo poveikio sėkloms dygti ir augalų daigams augti *in vitro*. Sidabro nitratas (AgNO_3) ir sidabro nanodalelės plačiai naudojami augalų audinių kultūroje mikrobiologinių teršalų kontrolei, kaliaus formavimuisi skatinti, organogenezei, somatinei embriogenezei ir antrinių metabolitų gamybai. Sidabro nanodalelės pasitvirtino kaip vertinga priemonė sterilizavimo procese ir augalų audinių kultūrų vystymui. Nanodalelių taikymas pasirodė perspektyvi priemonė, didinanti sterilizacijos efektyvumą bei kaip gerinanti eksplantų kultūros sėkmės rodiklius [8].

Atliktame brokolių kaliaus ląstelių ir eksplantų regeneracijos *in vitro* tyrime buvo nustatyta, jog lapų pjūvio eksplantas parodė didžiausią bendrų antioksidantų, flavonoidų, chlorofilo ir maistinių medžiagų kiekį (koncentraciją), palyginti su kitais eksplantais, kuomet taikyta 1,5 mg/l IBR + 1 mg/l BAP koncentracija. Ši koncentracija parodė geresnius rezultatus lyginant su IBR (1,0 mg/l) ir BAP (1,0 mg/l) koncentracija. Rezultatus galima sieti su tuo, jog skirtingos augalo dalys dėl nevienodos genų raiškos gamina skirtingus junginius arba jų kiekius. Šie įvardinti skirtumai turi įtakos įvairių augalo dalių antioksidaciniam potencialui. Antioksidantų kiekį taip pat gali lemti ir kiti veiksniai, tokie kaip mėginio būklė ir ekstrakcijos tirpiklių poliškumas. Be to, gerai žinoma, kad raudonos ir tamsiai žalios spalvos lapinės daržovės yra gausesnės maistinėmis medžiagomis nei šviesesnės spalvos daržovės. Natūraliai augaluose esantys pigmentai, atsakingi už lapų spalvą, tokie kaip chlorofilas, antocianinai, betalainai (betacianinas ir betaksantinas) bei karotinoidai, pasižymi

antioksidaciniu poveikiu. Atliktas tyrimas patvirtino, kad žalia lapų spalva gali turėti įtakos lapų ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui arba jį padidinti [10].

1.3. Brokoliuose randami bioaktyvieji junginiai

Brokoliai apibūdinami kaip didelę maistinę vertę turinčios daržovės, kuriose gausu vitaminų, antioksidantų ir antikancerogeninių junginių, taip pat biologiškai aktyvių junginių kaip polifenoliai, flavonoidai, karotinoidai, sulforafanas, gliukozinolatai. Brokoliuose yra vitaminų A, B₆, B₁₂, C, D, E, K, tiamino, riboflavino, niacino, folio rūgšties, taip pat nedideli kiekiai pantoteno rūgšties, cholino ir betaino. Dėl bioaktyviųjų junginių gausos brokoliai laikomi vienomis maistingiausiomis daržovėmis [7]. Tiek brokoliuose, tiek ir kituose augaluose randami antriniai metabolitai apsaugo augalus nuo biotinio ir abiotinio streso, o jų teigiamas poveikis naudojamas farmacijos ir pramonės tikslais [11].

Flavonoliai, priklausantys flavonoidų grupei, pasižymi įvairia chemine struktūra ir savybėmis. Flavonolių, taip pat ir kitų bioaktyviųjų junginių biologiniam prieinamumui didžiausią įtaką turi augalo rūšis ir augimo laikotarpis, šviesa, brandumas. Brokolių žiedynų flavonoidiniai komponentai mokslininkų buvo ištirti naudojant analitinių metodų derinį LC/UV-DAD/ESI-MS (skysčių chromatografija / ultravioletinių spindulių diodų masų detektorius / elektro-purškimo jonizacijos masių spektrometrija), kuriuo nustatyti keli hidroksicinamono rūgšties kaempferolio ir kvercetino gliukozidų esteriai [7]. Didesnė flavonoidinių junginių koncentracija nustatyta brokolių lapuose, t.y. iki 9,93 mg/g sausos masės, o lapuose nustatyta iki 6,33 mg/g sausos masės. Kaempferolio ir kvercetino, pagrindinių brokoliuose nustatytų flavonoidų, koncentracijos lapuose didesnės (atitinkamai iki 274,30 ir 87,70 µg/g šviežio svorio) nei žiedynuose [6]. Teigiama, kad brokolių sudėtyje esantys flavonoidai pasižymi priešuždegiminiu ir priešvėžiniu aktyvumu bei slopina įvairias navikų formavimosi stadijas. Nustatyta, kad kai kurie flavonoidai, slopindami fermentus, reikalingus neuromediatorių apykaitai, užkerta kelią neuromediatorių perdavimui, todėl jie gali atlikti svarbų vaidmenį neurodegeneracinių sutrikimų, pavyzdžiui, Alzheimerio ligos, prevencijoje [7].

Brokoliai taip pat yra vitaminų A, C ir E šaltinis. Sulforafano (fitocheminės medžiagos gliukorafanino metabolito) [12] sąveika su šiais vitaminais atlieka svarbų gynybinį vaidmenį oksidacinio streso metu. Tai ypač reikšminga, kai ląstelės redokso balansas pereina iš redukcinės į oksidacinę būseną. Tai turi įtakos redoksui reguliuoti, nes keičiasi nuo antioksidacinio atsako elemento priklausomų genų produktų indukcija per II fazės detoksikaciją ir antioksidacinius fermentus, kurie prisideda prie vitaminų A, C ir E perdirbimo ir išsaugo juos, palaikydami ląstelių redokso pusiausvyrą [7]. Atlikti klinikiniai tyrimai su žmonėmis parodė, jog sulforafanas pasižymi saugumu ir neturi šalutinio poveikio vartojant mažas dozes, o vartojant didesnes preparato dozes – mažai kenksmingas. Kadangi Maisto ir vaistų administracija kai kuriuos klinikinius tyrimus leidžia atlikti tik su 200 µmol sulforafano koncentracija, didesnių dozių poveikis nėra testuojamas. Shapir'o ir kitų mokslininkų [12] atliktas tyrimas parodė, kad nuoseklus 100 µmol brokolių daigų ekstrakto arba 25 µmol sulforafano dozavimas kas 8 val. 7 dienų laikotarpiu, žmonėms neturėjo nepageidaujamo poveikio [12].

Karotinoidai yra svarbūs antioksidantai, kurių, ypač β-karotino ir liuteino, gausu brokoliuose. Žmogus šiuos antioksidantus turi gauti su maistu ar maisto papildais, nes žmogaus organizmas jų sintetinti negali. Nustatyta, jog karotinoidai vyrauja visose brokolių botaninėse dalyse, ypač didelė koncentracija pasižymi lapai – 1095,0 µg/g sausos masės, o stiebuose koncentracija yra mažesnė (15,6 µg/g sausos masės). Karotinoidų svarba grindžiama tuo, jog jie gali sumažinti vėžio išsivystymo riziką, nes neutralizuoja kancerogenus prieš jiems pakeičiant ląstelės DNR. Vitamino A pirmtakas

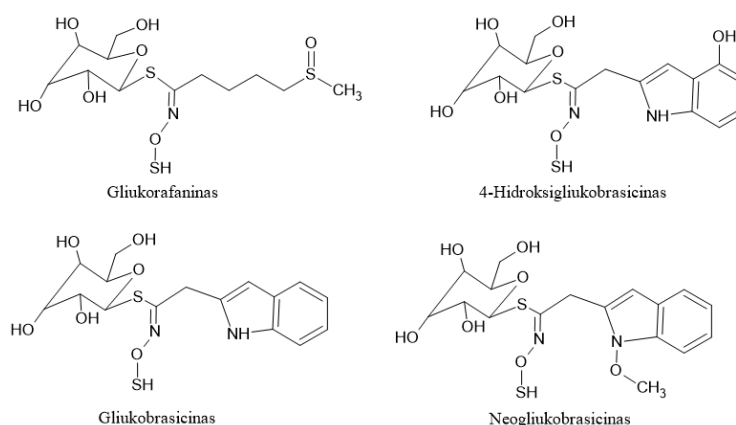
β -karotinas padeda palaikyti kaulų formavimąsi, normalų regėjimą ir sveiką odą, taip pat pasižymi senėjimą lėtinančiomis savybėmis [6, 7].

Gliukozinolatai, kartu su fenoliniais junginiais yra pagrindiniai *Brassicaceae* šeimos antriniai metabolitai, atliekantys svarbų vaidmenį apsaugant augalus nuo įvairaus patiriamo streso. Šios metabolitų grupės, pasižyminčios antioksidacinėmis savybėmis, gali pristabdyti oksidacinių grandinių reakcijų plitimą ir taip sumažinti neigiamą įvairių patiriamų stresų poveikį augalams. Taip pat jos padeda reguliuoti viduląstelinis signalinius kelius, kurie turi įtakos pagrindiniams biologiniams procesams, pavyzdžiui, žiotelinėms angoms reguliuoti, kuriam tarpininkauja hormonai, tokie kaip abscizo rūgštis (ABR) ir auksinai. Žiotelinių angų reguliavimas, kuriuo reguliuojama transpiracija, yra vandens homeostazės, susijusios su vandens ir maistinių medžiagų srautu kraujagyslių sistemoje, nuo kurios priklauso augalų augimas, centras. Nors ir yra plačiai žinoma, jog *Brassicaceae* šeimos augalai geba kaupti fenolinius junginius ir gliukozinolatus, kurie yra jų apsaugos nuo streso veiksnių mechanizmų dalis, tikslus ir konkretus šių junginių poveikis pirminei medžiagų apykaitai ir specifiskam augalų augimui iš esmės iki šiol nėra ištirtas [13].

Brokoliuose taip pat yra mikroelementų, būtinų žmogaus organizmo tinkamam funkcionavimui palaikyti. Vienas iš reikšmingų mikroelementų – selenas, yra svarbus padedant išvengti širdies ir kraujagyslių ligų bei vėžio rizikos. Jo vartojimas padeda stiprinti imunitetą, apsaugoti nuo krešulių susidarymo arterijose. Selenocisteino forma jis apsaugo ląsteles nuo oksidacinės žalos, didindamas fermentų, tokių kaip glutathiono peroksidazė, aktyvumą. Kadangi brokoliuose yra reikšmingas kiekis kalcio, tai yra puikus maistas žmonėms, kurie linkę sirgti osteoporoze. Brokoliuose esantys nedideli kiekiai kalio, fosforo, cinko, mangano ir magnio taip pat atlieka svarbų vaidmenį kaip fermentų kofaktoriai ir reguliuojant tarpląstelinę sąveiką [7].

1.4. Gliukozinolatai ir jų kaupimosi dėsningumai

Tarp įvairių biologiškai aktyvių junginių gliukozinolatai yra unikalūs funkciniai junginiai, randami tik *Brassicaceae* šeimos augaluose [14]. Tai – sieros ir azoto turinčių glikozidų grupė. Gliukozinolatai (β -tiogliukozido-N-hidroksisulfatai) sudaryti iš β -tiogliukozės dalies, sulfonintos oksimo dalies ir kintamos šoninės grandinės, dėl kurios jie yra nelakūs ir hidrofiliniai junginiai [15]. Yra pateikiamos (žr. 1.2 pav.) atskirų identifikuotų gliukozinolatų cheminės struktūros, apimančios vieną alifatinį gliukozinolatą (gliukorafaniną) bei tris indolinius gliukozinolatus (4-hidroksigliukobrasiciną, gliukobrasiciną ir neogliukobrasiciną) [2].



1.2 pav. Pagrindinės gliukozinolatų cheminės struktūros [2]

Priklausomai nuo gliukozinolatų pirmtakų aminorūgščių ir šoninės grandinės (R grupės) modifikacijos tipų, gliukozinolatai skirstomi į tris pagrindines grupes [15]:

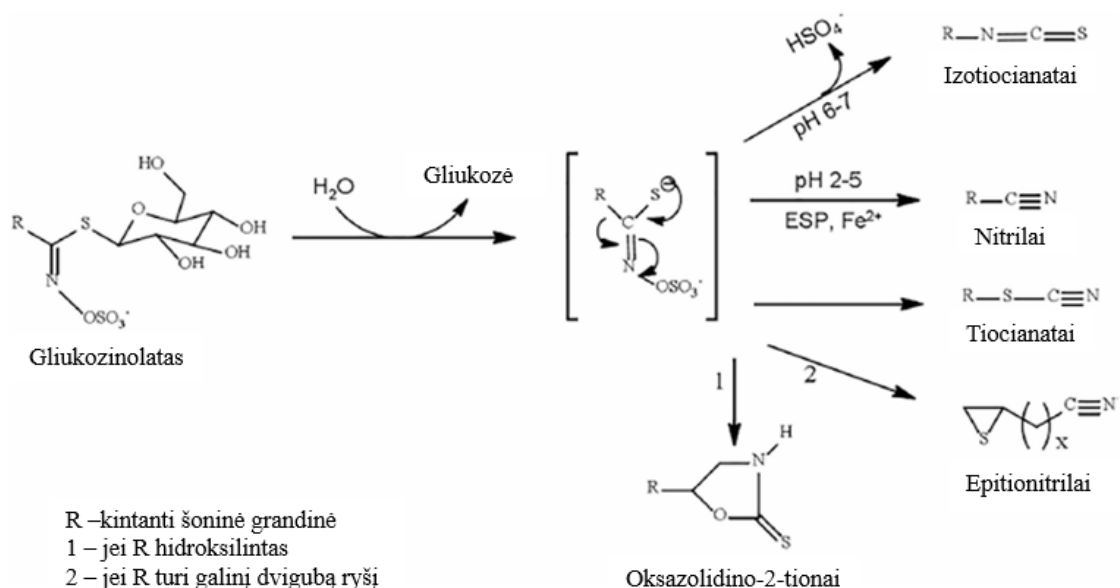
- alifatinius (junginiai, gauti iš alanino, leucino, izoleucino, metionino ar valino);
- aromatinius arba benzeninius (junginiai, gauti iš fenilalanino ar tirozino);
- indolinius gliukozinolatus (gauti iš triptofano).

Teigiama, kad metionino kilmės gliukozinolatai yra svarbiausia gliukozinolatų klasė *Brassica* daržovėse [15]. Anksčiau buvo teikiama pirmenybė *Brassicaceae* daržovėms su mažesniu gliukozinolatų kiekiu dėl jų teikiamo kartaus ir aštraus skonio. Tačiau pastaruoju metu, vis labiau įsitikinant įvairiomis sveikatą stiprinančiomis gliukozinolatų funkcijomis, *Brassicaceae* daržovėmis, turinčiomis didesnę gliukozinolatų kiekį, susidomėjimas išaugo [14].

Gliukozinolatai yra sintetinami augalų citoplazmoje, o vėliau kaupiami įvairių rūšių ląstelių vakuolėse. Šių biologiškai aktyvių junginių koncentracija skiriasi priklausomai nuo rūšies, augalo dalių, agronominių bei klimato sąlygų. Gliukozinolatų sintezė yra trijų etapų procesas, apimantis aminorūgščių grandinės prailginimą, po kurio iš aminorūgščių sintetinamas gliukonas ir grandinės pakeitimas (gliukono pridėjimas). Daugelis gliukozinolatų biosintetinami atliekant didelius aglikono šoninių grandinių pakeitimus, apimančius įvairias chemines modifikacijas, kurios apima ne tik glikozilinimą, oksidaciją ir acilinimą, bet ir ilginimą, hidroksilinimą, o-metilinimą ir denatūraciją [15].

Brassicaceae augaluose gliukozinolatų sudėčiai ir koncentracijai įtakos turi įvairūs veiksniai, tokie kaip genotipas, augalo audiniai, augimas, derliaus nuėmimo laikas, klimatas ir auginimo sąlygos. Genotipas paprastai yra įvardijamas kaip pagrindinis veiksnys, turintis įtakos gliukozinolatų sudėčiai bei koncentracijai. H.Lin'as kartu su kitais mokslininkais [16] atliko tyrimą su devyniomis brokolių veislėmis gliukozinolatų sudėčiai ir koncentracijai įvertinti keturiuose ankstyvuosiuose etapuose (sėklose, 3 dienų daigų, 11 dienų ir 17 dienų brokolių daigų). Tyrimo metu devyniose brokolių veislėse buvo identifikuota 12 skirtingų gliukozinolatų, įskaitant devynis alifatinius ir tris indolinius gliukozinolatus. Ultraefektyvios skysčių chromatografijos (UPLC) metodo rezultatai leido daryti išvadą, jog daugumos veislių brokolių daigams bei šiems daigams augant, alifatinių gliukozinolatų koncentracija buvo linkusi mažėti. Nustatyta, jog indolinių gliukozinolatų koncentracijos padidėjo po sudygimo ir didžiausią koncentraciją pasiekė 3-jų arba 11-os dienų daigų metu, o 17-os dienų daigų metu koncentracijos stipriai sumažėjo [16].

Mirozinazė (β -tiogliukozidazės gliukohidrolazė) – tai glikoproteinas, atsakingas už gliukozinolatų, kurie sudaro *Brassicaceae* šeimos augalų sėros turinčių antrinių metabolitų grupę, hidrolizę [17]. Dėl įvairių išorinių veiksnių, pvz., paveikus kenkėjams, pjaunant ar smulkinant, audiniai yra pažeidžiami, todėl mirozinazė patenka į glaudų kontaktą su gliukozinolatais ir hidrolizuoja gliukozinolato struktūroje esančią tiogliukozidinę jungtį. Dėl to suskyla D-gliukozė ir išsiskiria nestabilus aglikono tiohidroksimato-O-sulfatas. Priklausomai nuo pradinio gliukozinolato, hidrolizės sąlygų (pH, temperatūros), kofaktorių (pvz., Fe^{2+}) ir papildomų baltyminių elementų (pvz., epitospecifikacinis baltymas (ESP) ir tiocianatą formuojantis baltymas (TFP)), aglikonas persitvarko ir susidaro skirtingų klasių skilimo produktai: izotiocianatai (ITC), tiocianatai, nitrilai, epitionitrilai (EPT) ir oksazolidino-2-tionai (1.3 pav.) [15].



1.3 pav. Gliukozinolatų hidrolizės produktai [15]

Brassicaceae šeimos augaluose yra gliukozinolatų-mirozinazės sistema, kuri padeda efektyviai apsisaugoti nuo vabzdžių. Reaktyviausi ir funkcionaliausi metabolitai iš gliukozinolatų hidrolizės produktų, lyginant su kitais hidrolizės produktais yra izotiocianatai. Šių metabolitų toksiškumo mechanizmas yra susijęs su baltymų aminogrupių suardymu. Kadangi izotiocianatai turi lipofilinių savybių, jie gali lengvai ir pasyviai difunduoti į vabzdžių ląsteles per ląstelių membranas, o tuomet reaguodami su baltymais jie suardo disulfidinį ryšį ir dėl to sutrikdomas jų katalitinis aktyvumas. Gliukozinolatų toksiškumas skiriasi priklausomai nuo jų klasės (alifatiniai, indoliniai ar aromatiniai gliukozinolatai) bei nuo konkretaus kenkėjiško vabzdžio. Paminėtina, jog gamtoje egzistuoja vabzdžiai, kurie yra prisitaikę neutralizuoti ir (arba) detoksikuoti augalų toksiškus junginius ir todėl jie gali maitintis gliukozinolatų turinčių augalų audiniais ar kitaip naudoti juos savo naudai [15].

1.5. Augimą reguliuojančios medžiagos

Augalų augimo reguliatoriai – tai cheminės medžiagos, kurios naudojamos siekiant reguliuoti augalų augimą bei vystymąsi. Jie naudojami turint tikslą didinti augalų šakojimąsi, slopinti ūglių augimą, spartinti žydėjimą, reguliuoti vaisių brandą [18].

Augalų augimo reguliatoriai apima natūraliai nustatomas hormonines medžiagas (fitohormonus) ir jų sintetinius atitikmenis [19].

Yra išskiriamos penkios fitohormonų klasės, veikiančios augalų augimą bei vystymąsi [18]:

- auksinai;
- giberelinai;
- citokininai;
- abscizo rūgštis;
- etilenas.

Sintetiniai augalų augimo reguliatoriai yra svarbios priemonės augalų fiziologinėms reakcijoms arba biocheminiams kontrolės mechanizmomams tirti. Augalų augimo reguliatoriai kontroliuoja ne tik

antioksidacinį potencialą, pagrindinius augimo ir vystymosi procesus, bet taip pat dalyvauja augalų audinių kultūrose antrinių metabolitų gamyboje [19].

1.5.1. Citokininai

Tai – ląstelių dalijimąsi skatinantys fitohormonai, kurių sudėtingos funkcijos priklauso kartu nuo sąveikos su kitais augalų hormonais. Citokininai atlieka svarbų vaidmenį – perneša ir kaupia fotosintezės produktus bei veikia kitų fermentų aktyvumą, reikšmingai keičia fiziologinius ir biocheminius procesus. Taip pat tai yra pagrindiniai junginiai, reguliuojantys chloroplastų vystymąsi. Citokininai stabdo arba lėtina augalų senėjimo procesą, stabdydami chlorofilo nykimą ir dėl to išlaikydami žalią lapų spalvą. Taip pat įrodyta, kad citokininai daro didelę įtaką gyvybinėms augalo funkcijoms ir yra bene nepakeičiamas jo elementas [20]. Esant citokinino stygiui, ūgliai būna negausūs, o viršūninė meristema mažesnė [21].

Reguliuodami šaknų diferenciaciją, citokininai ir auksinai gali turėti antagonistinį poveikį, pavyzdžiui, auksinas skatina šoninių šaknų vystymąsi, o citokinai priešingai – jį slopina [20].

Didžiausia citokininų koncentracija užfiksuota pradiniam lapų vystymosi etape, kuris siejamas su citokinezės stimuliavimu, membranų formavimusi, plastidžių dalijimusi ir tuo metu vykstančia intensyvia baltymų sinteze. Taigi, citokininų koncentracija augale priklauso nuo esamos ląstelių, audinių bei viso augalo vystymosi stadijos. Koncentracijos įtakai taip pat turi aplinkos veiksniai: šviesos kiekis ir intensyvumas, streso pasireiškimas, maisto medžiagų prieinamumas. Šie fitohormonai daugiausia sintetinami šaknų viršūninėse meristemose, tačiau taip pat sintetinami vaisiuose ir jaunuose lapuose. Jų kiekį kontroliuoja kiti fitohormonai, kurie daro svarbią įtaką ne tik jų biosintzei, bet ir skilimui [20].

1.5.2. Auksinai

Auksinai – tai organiniai junginiai, galintys kontroliuoti ląstelių tęstamąjį augimo fazę. Pagrindinė medžiaga, priskiriama auksinams, yra 3-indolilacto rūgštis (IAR). Po ilgamečių trukusių tyrimų, yra žinoma, jog be IAR, natūralūs auksinai taip pat apima ir 3-indolilbutano rūgštį (IBR) bei tik ankštiniuose augaluose aptinkamą 4-chloroindol-3-acto rūgštį (4-CL-IAR), turinčio papildomą chloro atomą. Šių medžiagų molekulėse yra indolo žiedas. IBR, lyginant su IAR, laikoma veiksmingesne, nes skatina augalų šoninių šaknų formavimąsi, daug greičiau stimuliuoja stiebo ilgėjimo augimą. Mokslininkų atrasti dar du neindoliniai junginiai, t. y. fenilacto rūgštis ir p-hidroksifenilacto rūgštis, turi auksinams būdingų savybių. Auksinai gali būti dviejų formų - laisvi ir surišti. Laisvoji forma sudaro nedidelę dalį viso augaluose esančio auksinų kiekio ir yra biologiškai aktyvi. Didžioji dalis augaluose randamų auksinų yra surištoje formoje [20].

Auksinų sintezė vyksta jaunose, besivystančiose augalų dalyse, pavyzdžiui, ūglių galuose, besiformuojančiuose lapuose ar sėklose. Šie fitohormonai taip pat sintetinami šaknyse, t. y. pagrindinės šaknies meristemoje ir besivystančiose šoninėse šaknyse. Nepaisant palyginti paprastos savo struktūros, auksinas kontroliuoja daugelį procesų, vykstančių augalo gyvavimo laikotarpiu. Hormonas per augalo organus iš jo sintezės vietos patenka į specifinius audinius bei ląsteles. Jo pernašos mechanizmų tyrinėjimai mokslininkams leido nustatyti du fiziologiškai ir erdviškai skirtingus pernašos kelius. Pirmasis kelias – tai spartus pernešimas per karnienos elementus, o antrasis

– polinis pernešimas iš ląstelės į ląstelę, apimantis įvairius audinius. Būtent nuo polinio pernašos būdo priklauso auksinų kaupimasis konkrečiuose augalo audiniuose [20].

1.6. Brokolių antibakterinis poveikis

Brokoliai pasižymi antibakteriniu poveikiu, kuris svarbus bendrai žmogaus sveikatai ir bakterinių infekcijų prevencijai. Antibakteriniu poveikiu labiausiai pasižymi brokoliuose esantys gliukozinolatai ir izotiocianatai. Sulforafanas, sieros turintis junginys, pasižymi antibakteriniu poveikiu *Helicobacter pylori* bakterijai, kuri siejama su skrandžio opomis bei virškinamojo trakto infekcijomis. Atlikti tyrimai su kitais brokoliuose esančiais junginiais, t.y. indol-3-karbinoliu ir fenoliniais junginiais, įrodė, jog jie taip pat pasižymi tam tikru antimikrobiniu poveikiu. Nustatytas jų slopinamasis poveikis *Escherichia coli* ir *Staphylococcus aureus* bakterijų padermėms [4].

Bioplėvelės – tai mikroorganizmų (pvz., bakterijų, pirmuonių, dumblių, grybų) bendrijos, prisitvirtinančios prie įvairių paviršių [22]. Dėl biologinių plėvelių bakterijos gali tapti patvarios ir atsparios, todėl jas tampa sunkiau gydyti antibiotikais. Slopinant bioplėvelių formavimąsi, bakterijų kiekis sumažėja. Atsižvelgiant į tai, biologiškai aktyvus brokolių komponentas – 3,3'-diindolilmetanas (DIM), gali veikti kaip bioplėvelės formavimosi inhibitorius ir sumažinti bakterijų kiekį. Bakterijų užterštumas maiste yra dažna per suvartojamą maistą plintančių ligų priežastis. Brokolių antibakterinės savybės, ypač jų gebėjimas slopinti tokius patogenus kaip *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* ir *Listeria monocytogenes*, gali padėti sumažinti per maistą plintančių infekcijų riziką. Sveikatos priežiūros sektoriuje vis didesnį susirūpinimą kelia atsparumas antibiotikams, kadangi dėl bakterijų atsparumo infekcijas tampa vis sudėtingiau gydyti. Brokolių pasižymėjimas antibakterinėmis savybėmis, o ypač jų gebėjimas slopinti antibiotikams atsparių padermių augimą, lemia susidomėjimą jais kaip potencialia natūralia alternatyva įprastiniams antibiotikams arba kaip jų priedu. Tačiau tam įgyvendinti reikiami tolimesni detalūs moksliniai tyrimai [4].

1.7. Brokolių antioksidacinis poveikis

Augalai nuolatos susiduria su nepalankiomis aplinkos sąlygomis tokiomis kaip sausra, druskingumas, sunkieji metalai, maistinių medžiagų trūkumas. Šie streso veiksniai dėl reaktyvių deguonies rūšių (ROS) augalams sukelia oksidacinį stresą. Todėl augalai yra išvystę specifinius atsakus į kiekvieną iš šių streso veiksnių, o taip pat ir kryžminius atsakus į juos. Oksidacinis stresas apibūdinamas kaip didelis disbalansas tarp ROS gamybos ir antioksidacinės apsaugos, kuris gali sukelti ląstelių makromolekulių, įskaitant baltymus, lipidus, angliavandenius ir DNR, pažeidimus. Esant stabiliai būklei, ROS pašalina tiek fermentinės antioksidacinės (superoksido dismutazė, katalazė, askorbato peroksidazė, glutathiono reduktazė, glutathiono peroksidazė), tiek ir nefermentinės (askorbatas, glutathionas, karotinoidai, fenoliniai junginiai, prolinas, glicino betainas, poliaminai) antioksidacinės apsaugos sistemos [23]. Šios, fermentinės ir nefermentinės antioksidacinės apsaugos priemonės prisideda išsaugant organizmo redokso pusiausvyrą [24].

ROS apima tokius deguonies radikalus, kaip superoksido anijonas (O_2^-), hidroksilo radikalas ($OH^\cdot$), perhidroksilo radikalas ($HO_2^\cdot$) bei vandenilio peroksidas (H_2O_2). Kita ROS forma – singletinis deguonis (1O_2), susidaro dėl sužadinto chlorofilo susiformavimo II fotosistemos reakcijos centre ir fotosistemų antenų sistemose. Ši ROS forma turi itin neigiamą poveikį visam fotosintezės mechanizmui, kuris apima chloroplastų membranų lipidus, baltymus bei nukleino rūgštis.

Karotinoidai ir α -tokoferolis, esantys tilakoidų membranose yra pagrindinės chloroplastų apsaugos priemonės [23].

Antioksidantai ir priešuždegimiškai veikiantys junginiai, tarpusavyje yra glaudžiai susiję ir dažnai veikia kartu, turėdami teigiamą poveikį sveikatai ir saugodami organizmą nuo įvairių ligų. Brokoliai yra gerai žinomi dėl savo antioksidacinio potencialo. Jų sudėtyje esantis stiprus vitamino C antioksidantas ardo laisvuosius radikalus bei padeda atsinaujinti kitiems organizmo antioksidantams, pavyzdžiui, vitaminui E, atliekančio ląstelių ir audinių apsaugos nuo oksidacinės pažeidimo funkciją. Flavonoidai ir fenoliniai junginiai, tokie kaip kaempferolis ir kvercetas, neutralizuoja laisvuosius radikalus ir mažina patiriamą oksidacinį stresą organizme bei prisideda prie uždegimą sukeliančių medžiagų gamybos slopinimo. Brokoliuose esantis sulforafanas, dėl gebėjimo slopinti tam tikrų fermentų, kurie skatina organizmo uždegiminių procesus, prisideda prie šių procesų mažinimo, o taip pat stimuliuoja antioksidacinių fermentų, apsaugančių ląsteles nuo su uždegimu susijusios žalos, gamybą. Karotinoidai, tokie kaip β -karotinas ir liuteinas, veiksmingai gali apsaugoti ląsteles ir ypač audinius, tokius kaip akis ir odą nuo laisvųjų radikalų daromos žalos. Brokolių sudėtyje esantis selenas yra esminis antioksidacinių fermentų, įskaitant glutathiono peroksidazę, šaltinis, todėl šios ir kitų antioksidantais turtingų daržovių vartojimas esant subalansuotai mitybai, gali sumažinti oksidacinį stresą ir lėtinių ligų, susijusių su oksidacine žala, tokių kaip kraujagyslių ir širdies ligos, riziką [4].

Antioksidaciniam aktyvumui įvertinti gali būti naudojami DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas), FRAP (geležies jonų redukcijos antioksidacinė galia) bei ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonrūgšties radikalas) metodai. Šiais metodais įvertinamas antioksidanto potencialas dalyvaui elektronų pernašos procesuose. DPPH metodu įvertinamas medžiagų, galinčių perduoti vandenilio atomus, antioksidacinis aktyvumas. Tai – radikalų šalinimo metodas, kuomet stabilus DPPH[•] radikalas, esant antioksidantui, virsta redukuota forma ir tirpalo spalva pasikeičia iš violetinės į šviesiai geltoną. FRAP metodu yra įvertinamas antioksidanto redukcinis potencialas reaguojant su geležies 2,4,6-tripiridil-s-triazino (Fe^{3+} - TPTZ) kompleksu ir susidarant spalvotam geležies 2,4,6-tripiridil-s-triazino kompleksui (Fe^{2+} - TPTZ). Taikant spektrofotometrinį ABTS metodą ir kaip oksiduojančią medžiagą naudojant kalio persulfatą, ABTS paverčiamas į radikalinį katijoną $\text{ABTS}^{•+}$, o po to, mėlynai žalios spalvos $\text{ABTS}^{•+}$ yra redukuojamas. Tarp šių antioksidacinių aktyvumo įvertinimo metodų yra nustatyta vyraujanti teigiama koreliacija [24].

1.8. Brokolių pritaikymo galimybės

Brokoliai yra natūralus ir ekonomiškai naudingas funkcinio maisto šaltinis. Ši daržovė, dėl savo sudėtyje esančių fitocheminių medžiagų, tokių kaip gliukozinolatų, fenolių ir kitų antioksidantų, vitaminų (A, B, C, K), taip pat mineralinių medžiagų (Cu, P, S, K, Fe, I), įgyja įvairias pritaikymo galimybes [25]. Prognozuojama, kad didėjantis brokolių sėklų ir daigų ekstraktų pritaikymas maisto, kosmetikos ir farmacijos pramonėje sudarys didelę pasaulinės rinkos pajamų dalį, ypač Azijos ir Ramiojo vandenyno regiono besivystančiose ekonomiose [26].

Brokolių pagrindu gali būti gaminami maisto papildai. Paprastai šių papildų sudėtyje yra džiovintų brokolių miltelių, sėklų ar daigų ekstraktų arba koncentratų, kuriuose yra aukšta gliukozinolatų ar izotiocianatų koncentracija [27]. Mokslinėje literatūroje aprašomi įvairūs gliukozinolatų išskyrimo metodai iš kryžmažiedžių augalų – ekstrakcija tirpikliais, ultragarsu ar mikrobangų krosnelėmis. T. Doheny - Adams'o [28] ir kitų bendraautorių tyrimo metu įrodyta, kad 80 % metanolio tirpalas gali

veiksmingai inaktyvuoti mirozinazę – fermentą, atsakingą už gliukozinolatų skilimą, ir taip išsaugant jų koncentraciją ekstrakcijos metu. Taip pat šis mokslininkas [28] įrodė ekstrakcijos šaltuoju metanolio veiksmingumą, kadangi šis metodas ne tik išsaugo gliukozinolatų kiekį, bet ir sušvelnina nesklandumus, susijusius su pakilusia temperatūra, kuri gali sukelti naudingų junginių skilimą [28, 29].

Magistro baigiamajame projekte rekomendacijų dalyje pateikiama rekomenduojama principinė aparatūrinė schema, kaip išskirti gliukozinolatus iš brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* (žr. 4 skyrių).

Siekiant padidinti bioaktyviųjų junginių kiekį augaluose, elicitorių panaudojimas yra ekonomiškai ir tvarus metodas. Mokslinių tyrimų duomenimis, brokoliai, patyrę abiotinį stresą pasižymi gebėjimu kaupti didesnius gliukozinolatų kiekius [30].

Tekstilės pramonėje plėtojant tvarius cheminius procesus, tekstilės dažymui vis svarbesni tampa iš augalų išgaunami natūralūs dažikliai. M. K. Sadannavar'as ir bendraautoriai [31] iš brokolių naudojant ultragarso ekstrakcijos būdą, išgavo naują natūralų dažiklį, kurį panaudojo medvilniniams audiniams. Šio tyrimo rezultatai parodė ryškius žalios spalvos atspalvius, kurių spalvinės charakteristikos (K/S) vertės svyravo nuo 0,55 iki 2,71, o apdorotos medvilnės mėginių spalvos išliekamumas svyravo nuo vidutiniškai gero iki puikaus. Šis naujai išgautas dažiklis medvilnės audiniuose taip pat parodė sumažėjusį *S. aureus* ir *E. coli* bakterijų kiekį. Taigi, bendri šio tyrimo rezultatai įrodo, kad iš brokolių išgautas natūralus dažiklis turi puikias dažymo galimybes naudojant jį su celiuliozinėmis medžiagomis [31].

1.9. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Brokoliai (lot. *Brassica oleraceae* var. *italica*) yra plačiai vartojama daržovė dėl savo sudėtyje esančių vitaminų A, C, E bei K ir mineralų gausos. Taip pat juose esantys tokie antriniai metabolitai kaip gliukozinolatai, fenoliniai junginiai yra svarbūs ne tik augalo gynybiniais mechanizmais siekiant prisitaikyti prie nepalankių aplinkos sąlygų, bet tuo pačiu yra naudingi ir žmogaus sveikatai. Šiuose augaluose kaupiami bioaktyvieji junginiai pritaikomi farmacijos, kosmetikos, dažiklių, agrochemijos pramonės srityse.

Vyraujantis sezoniškumas, klimato kaita yra veiksniai, lemiantys nepalankias sąlygas auginant brokolius. Dėl klimato kaitos kylanti temperatūra ir ekstremalesni oro reiškiniai turi įtakos auginamų augalų produktyvumui, jų augimo greičiui. Šie kylantys nepageidaujantys veiksniai lemia bioaktyviųjų junginių kitimus ir ribotą jų prieinamumą. Tuo tarpu su brokoliais atliekami *in vitro* ir *in vivo* tyrimai leidžia kontroliuoti aplinkos veiksnius ir optimalias sąlygas, todėl ateityje tai gali būti vis reikšmingesnis būdas siekiant užtikrinti greitesnį augalų augimą ir vystymąsi.

Todėl šis projektas yra skirtas suformuoti brokolių kaliaus kultūras *in vitro*, jas praturtinti augalų augimo hormonais ir baltyminėmis medžiagomis. Tiriamosios augalų kaliaus kultūros, taikant biotechnologinę strategiją, kultivuotos maitinamosiose terpėse, papildytomis BAP ir 2,4-D augimo reguliatoriais, bei L-metioninu ir L-triptofanu.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimų metu naudotos įrangos sąrašas

1. Spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“;
2. Inkubatorius „Mettler“;
3. Centrifuga „Universal 320 R“;
4. pH-metras „Winlab“;
5. Termostatuojama vandens vonelė „Biosan“;
6. Termostatuojama vandens vonelė „Mettler“;
7. Autoklavas „Cetoclav“;
8. Laminaras „Telstar BV-100“;
9. Laminaras „Holtel“;
10. Termostatas „Binder“;
11. Termostatuojamas kratytuvas „Biosan ES-20“;
12. Svarstyklės „Shimadzu“;
13. Purtyklė „Velp Scientifica“;
14. Minicentrifuga „neoLab“;
15. Vandens gryninimo sistema „Elix“;
16. Distiliatorius „GFL“
17. Traukos spinta „Labochema“.

2.2. Tyrimų metu naudoti reagentai

1. C_2H_5OH (70 %);
2. $HgCl_2$ (0,1 %);
3. $NaOH$ (0,1 M);
4. H_2SO_4 (0,1 M);
5. CH_3OH ;
6. DPPH etaloninis tirpalas;
7. Fosfatinis buferis (20 mM, 0,2 M);
8. $K_3[Fe(CN)_6]$ (1 %);
9. Trichloracto rūgštis (10 %);
10. $FeCl_3$ (0,1 %);
11. Acetatinis buferis (300 mM, pH=3,6),
12. TPTZ (2,4,6-tripiridil-s triazinas) (10 mM);
13. HCl (40 mmol/l);
14. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mmol/l);
15. $K_2S_2O_8$ tirpalas;
16. ABTS tirpalas (2 mM);
17. Ditiotritolis (DTT) (1 mM);
18. Fenilmetilsufonilfluoridas (0,5 mM);
19. DMSO;
20. Polivinilpirolidonas;
21. Bradfordo reagentas;
22. Albumino tirpalas;

23. Tris-HCl buferis (200 mM; pH=7,8);
24. L-metioninas (100 mM);
25. Nitromėlynasis tetrazolis (540 µM);
26. Tritonas X-100 (0,1 %);
27. Riboflavinas (540 µM);
28. Tanino rūgšties tirpalas (0,25 mg/ml);
29. Folino-Kiokalto reagentas;
30. Natrio karbonatas (7,5 %);
31. Acetonas (70 %);
32. Arnovo reagentas
33. Aliuminio chloridas (2 %);
34. Natrio tetrachlorpaladatas (2 mM);
35. Trichloracto rūgštis (5 %);
36. Elmano reagentas;
37. Redukuotas glutationas;
38. Ninhidrinai.

2.3. Sėklų sterilinimas

Brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) sėklos sterilintos 70 % C₂H₅OH – 1 min, 0,1 % HgCl₂ – 5 min ir 3 kartus plautos steriliu distiliuotu vandeniu.

Sėklų sodinimas į *Petri* lėkštes vykdomas steriliomis sąlygomis laminare. Laminaras sterilinamas ultravioletiniais spinduliais bei etanolu (70 %).

2.4. Terpių ruošimas

Augalų ląstelių kultūroms kultivuoti būtina maitinamoji terpė ir išoriniai aplinkos faktoriai (šviesa, temperatūra). Atlikus literatūros analizę, brokolių sėklų kultivavimui pasirinkta Murashige & Skoog (MS) terpė, kurios sudėtis nurodoma 1 priede. Ši terpė pasižymi didele nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracija. 2.1 lentelėje nurodyti reagentai ir jų kiekis, kurie buvo naudojami MS terpės paruošimui.

2.1 lentelė. MS terpės reagentų kiekis, paimamas iš pradinių tirpalų

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

Maitinamoji terpė sterilinama autoklave 120 °C temperatūroje 15 min, esant 0,75-1 atm slėgiui. Tiriamųjų augalų kultivavimas vykdomas 20-22 °C temperatūroje, fotoperiodo trukmė – 24 val. Optimali MS terpės pH yra 5,7, kuri reguliuojama su 0,1 M NaOH ir 0,1 M H₂SO₄. Siekiant užtikrinti pastovų maistinių medžiagų kiekį, reikalingą augalams, eksplantai reguliariai perkeliama į šviežią maitinamąją terpę. Tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų terpės papildomos skirtingų rūšių ir kiekių augimo reguliatoriais [32].

Fitohormonų pradinis tirpalas paruošiamas 0,1 mg/ml koncentracijos. Pirmiausia pasveriamas 10 mg tiriamojo junginio ir užpilama 2-5 ml tirpiklio, kad ištirtų milteliai. Visiškai ištirpdžius tiriamą junginį, įpilamas dvigubas kiekis distiliuoto vandens. Tirpalą išmaišius, pripilama distiliuoto vandens iki 100 ml. Reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris iš pradinio tirpalo apskaičiuojamas pagal formulę (2.1):

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

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

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija (mg/ml).

Šis tūris praskiedžiamas iki 100 ml, kad gauti reikiamą koncentraciją (mg/l) (žr. 2.2 formulę):

$$\frac{\text{norima fitohormono koncentracija, mg/l}}{\text{turima fitohormono koncentracija, mg/ml}} \cdot \text{terpės tūris, l} = \text{reikalingas fitohormono kiekis, ml} \quad (2.2)$$

Tyrimui paruoštos 2 terpės, tarpusavyje besiskiriančios augimo hormonų sudėtimi (žr. 2.2 lentelę). Šios terpės naudojamos tiriamųjų augalų kaliaus kultūrų *in vitro* kultivavimui.

2.2 lentelė. Kaliaus kultūroms formuoti MS terpėse naudojami fitohormonai ir jų koncentracijos

Terpė, Eil.nr.	Sudėtis
1	MS + BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l) + L-triptofanas 100 μM
2	MS + BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l) + L-metioninas 100 μM

2.5. Brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

2.5.1. Brokolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai.

Fenoliniams junginiams būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu antioksidantas atiduodamas vandenilį išaktyvina laisvuosius radikalus, kurie tampa stabiliais DPPH – H tipo junginiais.

0,2 g susmulkintos žaliavos užpilama 2 ml metanolio ir homogenizuojama 10 min. Homogenatas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių ir tuomet surenkamas supernatantas.

Tiriamojo tirpalo paruošimas: į mėgintuvėlį įpilama 0,077 ml paruošto ekstrakto, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir po 15 minučių laikymo tamsoje pamatuojamas tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje.

Palyginamojo tirpalo paruošimas: į mėgintuvėlį įpilama 0,077 ml metanolio, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

Etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje [32].

Antioksidacinės mėginių savybės apskaičiuojamos pagal (2.3) formulę:

$$\% \text{ slopinimas} = \frac{A_{\text{palyginamasis}} - A_{\text{tiriamasis}}}{A_{\text{palyginamasis}}} \cdot 100 \% ; \quad (2.3)$$

čia $A_{\text{palyginamasis}}$ – palyginamojo tirpalo šviesos sugertis;

$A_{\text{tiriamasis}}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.5.2. Brokolių redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas

Ekstrakto paruošimas: pasveriamas 0,1 g išdžiovintos medžiagos ir sumaišoma su 5 ml metanolio ir ekstrahuojama 45 °C 30 minučių. Ekstraktas centrifuguojamas ir naudojamas tyrimams.

Paruošiami keli skirtingų koncentracijų ekstraktų mėginiai, kurių bendras kiekis turi būti 0,5 ml. Į juos įpilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,25 ml $K_3[Fe(CN)_6]$. Mėginiai sumaišomi ir inkubuojami 50 °C temperatūroje 20 min. Vėliau pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Centrifuguojama 9000 aps/min 10 min.

1,25 ml nucentrifuguoto tirpalo sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % $FeCl_3$. Mėginių sugertys išmatuojamos spektrofotometru 700 nm bangos ilgio diapazone. Didesnės šviesos sugerties reikšmės atitinkamai reiškia stipresnes tiriamųjų mėginių redukcines savybes.

Kontrolinis mėginys: 1 ml 1 % $K_3[Fe(CN)_6]$ + 1 ml natrio fosfatinio buferio 0,2 M (pH 6,6).

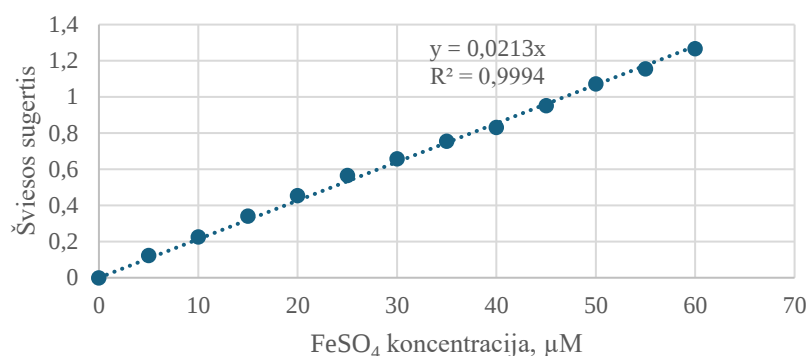
2.5.3. Brokolių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Šio metodo esmė yra nustatyti augalo redukuojančias savybes pagal Fe^{3+} - TPTZ pavirtimą į Fe^{2+} - TPTZ (mėlyna spalva) 593 nm bangos ilgyje.

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama 5 ml metanolyje 45 °C, 30 min. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min. ir naudojamas tyrimams.

Ruošiami šie reagentai: 300 mM acetato buferis (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). FRAP reagentas ruošiamas iš 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ ir 2,5 ml $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mmol/l). Mėginiai (20 µl mėginio ir 80 µl metanolio) yra sumaišomi su 3 ml FRAP reagentu. Tuščias mėginys yra 100 µl metanolio ir 3 ml FRAP reagentas [33].

Reakcijos mišinys matuojamas esant 593 nm bangos ilgiui. Kalibracinė kreivė ruošiamas $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5, 10, 15, 20, 25 µmol/l). Brokolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo reikšmės apskaičiuojamos pagal kalibracinę kreivę µmol/l $Fe(II)$ /l (žr. 2.1 pav.). Tuščias kalibracinės kreivės mėginys yra 3 ml FRAP ir 7 ml H_2O .



2.1 pav. FeSO₄ x 7 H₂O kalibracinė kreivė

2.5.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

ABTS metodas paremtas radikalo anijono slopinimu. ABTS gaunamas pridodant į jį kalio persulfato tirpalą. Radikalo anijonas turi mėlynai-žalią spalvą ir šviesos sugertis matuojama 734 nm bangos ilgyje. ABTS tirpalas skiedžiamas fosfatiniu buferiu (20 mM; pH=7,4), kad tirpalo šviesos sugertis būtų lygi 0,9-1.

Ekstrakto paruošimas: 0,1 g išdžiovintos augalinės medžiagos ekstrahuojama 5 ml metanolyje 45 °C, 0,5 h. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams. Į 0,5 ml ekstraktą įpilama 1,7 ml fosfato buferio (20 mM) ir 0,3 ml praskiesto ABTS tirpalo. ABTS šviesos sugertis nustatoma 734 nm bangos ilgyje. Palyginamasis tirpalas – praskiestas ABTS tirpalas, o tuščias bandinys – fosfato buferis (20 mM).

Paruoštų tirpalų šviesos sugertys matuojamos 734 nm bangos ilgyje. Pagal (2.4) formulę apskaičiuojamas ABTS radikalo slopinimas (%) [34]:

$$\% \text{ slopinimas} = \frac{A_{\text{palyginamasis}} - A_{\text{tiriamasis}}}{A_{\text{palyginamasis}}} \cdot 100 ; \quad (2.4)$$

čia $A_{\text{palyginamasis}}$ – palyginamajo tirpalo šviesos sugertis;

$A_{\text{tiriamasis}}$ – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.6. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas

0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos sumaišoma su 4 ml 0,066 M K/Na fosfatiniu buferiu (pH=7,4), kuris turi 1 mM ditionitritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsufonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono. Tirpių baltymų ekstrakcija atliekama mėginį maišant kratytuve 10 min 25 °C, tuomet centrifuguojama 9000 aps/min 10 min. Supernatantas dar kartą centrifuguojamas *Eppendorf* mėgintuvėliuose.

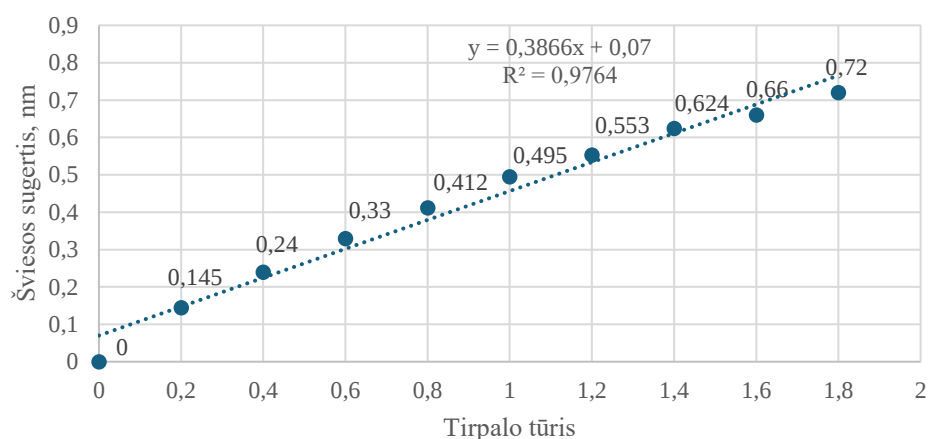
Baltymams nustatyti paimama 200 μl mėginio (supernatanto) ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento bei išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje. Paruošiama baltymų kalibravimo kreivė pagal albuminą (2.2 pav).

Kalibracinei kreivei sudaryti pagal albuminą reikia ištirpinti 25 mg albumino 25 ml vandens. Iš pradinio tirpalo imami žinomo tūrio mėginiai ir skiedžiami iki 10 ml distiliuotu vandeniu (žr. 2.3 lentelę).

2.3 lentelė. Kalibracinės kreivės sudarymas

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

Kalibracinei kreivei sudaryti į kontrolinį mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml distiliuoto vandens, o į kitus likusius mėgintuvėlius po 0,2 ml skiesto albumino tirpalo. Į visus mėgintuvėlius įpilama 2 ml Bradfordo regento. Mėginiai sumaišomi ir išmatuojamos mėginių šviesos sugertys spektrofotometru 595 nm bangos ilgyje. Pagal gautus rezultatus braižoma kalibravimo kreivė (žr. 2.2 pav.).



2.2 pav. Kalibracinė kreivė pagal albuminą

Reakcijos mišinys 2 ml tūrio turi 40 µl fermentinio preparato, 400 µl 200 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200 µl 100 mM L-metionino; 200 µl 540 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,1 % Tritono X-100 ir 20 µl 300 µM riboflavino ir 620 µl distiliuoto vandens. Kontrolinis mėginys paruošiamas be fermentinio preparato.

Reakcija atiekama apšviečiant liuminescentinėmis lempomis 30 min. Kaip kontrolė naudojamas mišinys be fermentinio preparato. Šviesos sugertis matuojama 560 nm bangos ilgyje. Naudojama baltymų koncentracijos nustatymo kalibracinė kreivė pagal albuminą (2.2 pav.). Fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.5) formulę:

$$A = \frac{\log \left(\frac{E_K}{E_T} \right)}{\log 2 \cdot m}; \quad (2.5)$$

čia A – SOD aktyvumas vnt/mg;

E_K – kontrolinio bandinio šviesos sugertis;

E_T – tiriamojo bandinio šviesos sugertis;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (baltymų koncentracija apskaičiuojama pagal Bradfordo metodą).

2.7. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų įvertinimas

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas augalų audiniuose paremtas šviesos sugerties nustatymu esant atitinkamiems bangos ilgiams.

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijoms įvertinti 0,05 g augalinės medžiagos susmulkinama ir į mėgintuvėlį įpilama 5 ml 96 % C₂H₅OH. Mėginys homogenizuojamas 15 min termostatuojame kratytuve 25 °C. Tuomet mėginys centrifuguojamas 10 min 9000 aps.min. Nucentrifuguotas ekstraktas nupilamas į kitą mėgintuvėlį ir mėginio tūris išmatuojamas. Šviesos sugerties matavimai atliekami spektrofotometru 662 nm (chlorofilui *a*), 644 nm (chlorofilui *b*) ir 441 nm (karotinoidams) bangų ilgiuose. Kontrolinis mėginys - C₂H₅OH [35].

Pigmentų koncentracijos apskaičiuojamos pagal (2.6), (2.7), (2.8) formules:

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg} \cdot \text{l}^{-1}) = 9,784 \cdot D_{662} - 0,99 \cdot D_{644}; \quad (2.6)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg} \cdot \text{l}^{-1}) = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662}; \quad (2.7)$$

$$C_a + C_b = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644}. \quad (2.8)$$

Karotinoidų koncentracija (mg l⁻¹) apskaičiuojama pagal (2.9) formulę:

$$C_{\text{karotinoidai}} = 4,695 \cdot D_{441} - 0,268 \cdot (C_a + C_b). \quad (2.9)$$

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracija mg/100 g apskaičiuojama pagal (2.10) formulę:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000} \quad (2.10)$$

čia C – pigmentų koncentracija, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris;

n – augalinė masė, g.

2.8. Baltymų išskyrimas iš brokolių augalinės masės

Į atskirus mėgintuvėlius sveriami po 0,05 g išdžiovintos augalinės medžiagos ir užpilama atskirais buferiais (1-4) po 1 ml. Mišiniai maišomi termostatuojamame kratytuve vieną valandą ir po to centrifuguojami 4 °C temperatūroje 9000 aps/min greičiu 20 min. Po centrifugavimo paimama 200 µl ekstrakto, pridedama 2 ml Bradfordo reagento. Po 2 minučių matuojamos tiriamųjų mėginių šviesos sugertys 595 nm bangos ilgyje.

Baltymų ekstrakcijai naudojami buferiai:

- 1) 0,1 M Natrio acetatas (pH 4,0):
0,1 M CH₃COOH;
0,1 M natrio acetatas;
- 2) 0,1 M Natrio acetatas (pH 6,0):
0,1 M CH₃COOH;
0,1 M natrio acetatas;

- 3) 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0);
- 4) 0,1 M Natrio boratas (pH 10,0).

Visi buferiniai tirpalai turi 0,15 M NaCl.

Bendroji baltymų koncentracija X (mg/100 mg) apskaičiuojama pagal (2.11) formulę:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n}; \quad (2.11)$$

čia a – baltymo koncentracija iš albumino kalibracinės kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, mg.

2.9. Bendros fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Kalibravimo kreivės paruošimas: paimta 0; 10; 20; 30; 40; 60; 80; 100; 120 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo. Tuomet įpilama distiliuoto vandens, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų iki 500 µl. Į šį tirpalą pilama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Viskas yra sumaišoma ir laikoma tamsoje 40 min kambario temperatūroje. Šviesos sugertis matuojama prieš tuščią mėginį 725 nm bangoje (žr. 2.3 pav.).

Ektrakto paruošimas: Pirmiausia 0,05 g augalinės žaliavos sumaišoma su 10 ml 70 % acetono tirpalu ir maišoma termostatiname kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Tuomet mišinys centrifuguojamas 10 min 4 °C 9000 aps/min. Mėginys dar kartą centrifuguojamas 2 min *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose. Supernatantas surenkamas ir naudojamas tyrimams.

Paimtas paruošto ekstrakto kiekis (30 µl) praskiedžiamas vandeniu iki 500 µl. Į jį pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir įpilama 1,25 ml 7,5 % ml natrio karbonato tirpalo. Viskas sumaišoma ir po išlaikymo kambario temperatūroje tamsoje 40 min. yra matuojama absorbcija esant 725 nm bangos ilgiui [36].

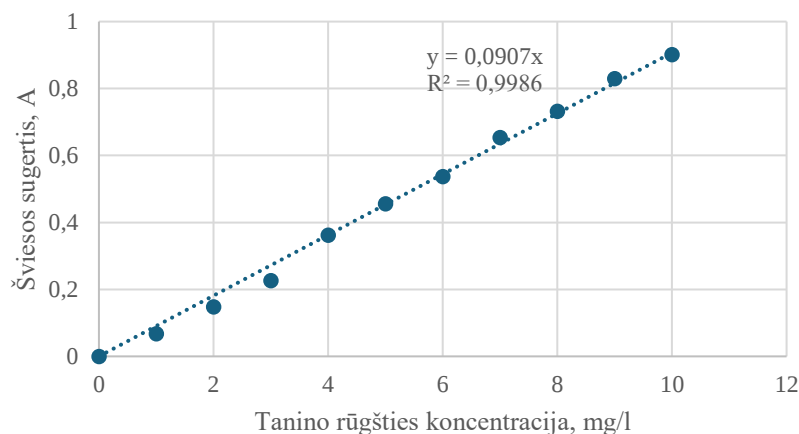
Bendra fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (mg/100 g) apskaičiuojama pagal (2.12) formulę:

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n}; \quad (2.12)$$

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

V – pradinis ekstrakto tūris, l;

n – augalinė masė, g



2.3 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

2.10. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas

Arnovo reagentas paruošiamas sumaišant 10 g natrio molibdato ir 10 g natrio nitrito su 100 ml metanolio.

Ekstraktas ruošiamas 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos homogenizuojant su 2,5 ml distiliuoto vandens. Ekstrakcija vykdoma termostatuojame kratytuve 30 min 25 °C temperatūroje. Tuomet centrifuguojama 9000 aps/min greičiu 10 min. Po centrifugavimo ekstraktas (1-1,5 ml) praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 5 ml. 1 ml praskiesto ekstrakto sumaišoma su 1 ml HCl (18 g/l), 1 ml Arnovo reagentu, 1 ml natrio šarmu (40 g/l) ir praskiedžiama iki 10 ml distiliuotu vandeniu.

Tuščias bandinys ruošiamas į mėgintuvėlę įpilant 1 ml HCl (18 g/l), 1 ml Arnovo reagentu, 1 ml natrio šarmo (40 g/l) ir praskiedžiama iki 10 ml distiliuotu vandeniu.

Tuščio bandinio ir tiriamųjų tirpalų šviesos sugertys matuojamos spektrofotometru 490 nm bangos ilgyje.

Fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį (%) apskaičiuojama naudojantis (2.13) formule:

$$\text{Fenolinių rūgščių koncentracija (\%)} = \frac{A \cdot 1,7544}{m}; \quad (2.13)$$

čia A – šviesos sugerties reikšmė;

m – augalinė masė, g.

2.11. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Ekstrakto paruošimas: 0,5 g susmulkintos augalinės žaliavos sumaišoma su 5 ml 80 % metanolio. Mišinys laikomas 1 parą 150 rpm kratyklėje. Homogenatas nucentrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir surinktas supernatantas naudojamas tyrimams.

Tiriamąjį mėginį paruošimas: bendrai flavonoidų koncentracijai įvertinti naudojamas aliuminio chloridas. Į 0,1 ml tiriamąjį mėginį įpilama iki 1 ml 80 % metanolio ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliekamas stovėti 30 min. Tuomet matuojama šviesos sugertis esant 415 nm bangos ilgiui. Flavonoidai apskaičiuojami pagal kvercetiną mg/g sausos masės [37].

Flavonoidų koncentracija mg/g pagal kvercetiną apskaičiuojama naudojantis (2.14) formulę:

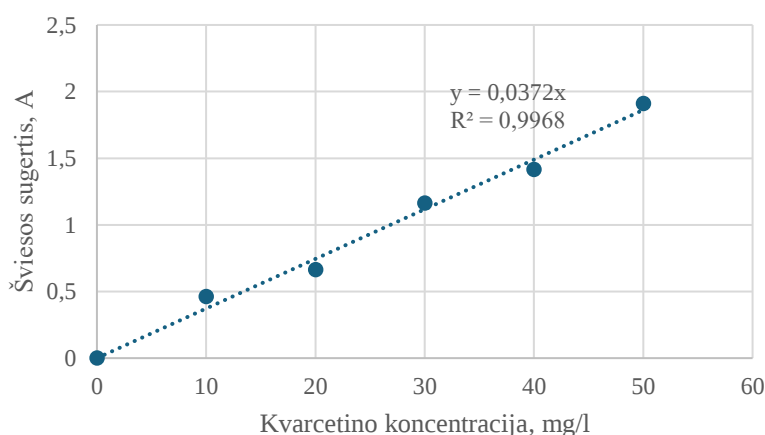
$$C = \frac{C_1 \cdot V}{g}; \quad (2.14)$$

čia C_1 – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibracinę kreivę;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

g – augalinė masė, g.

Kalibracinės kreivės paruošimas: kvercetas (1 mg/ml) tirpinamas metanolyje. 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2 ml kvercetino sumaišomi su 0,15 ml 2 % aliuminio chloridu ir atliekamas praskiedimas iki 10 ml su 80 % metanoliu. Šviesos sugertis matuojama 415 nm bangos ilgyje. Pagal gautus rezultatus sudaroma kvercetino kalibracinė kreivė (žr. 2.4 pav.).



2.4 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

2.12. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas

Ekstraktas paruošiamas 0,1 g išdžiovintos ir susmulkintos augalinės medžiagos sumaišant su 2 ml 80 % metanolio. Šis homogenatas laikomas per naktį kambario temperatūroje. Po išlaikymo homogenatas centrifuguojamas 9000 aps/min greičiu 10 min. Tuomet dar kartą centrifuguojama *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose 5 min.

Ruošiant tiriamąjį tirpalą, surinktas supernatantas (0,5-1 ml) iki 2 ml praskiedžiamas 80 % metanoliu. Gliukozinolatams nustatyti naudojama 100 µl šio ekstrakto, į jį pridedama 0,2 ml distiliuoto vandens ir 2 ml 2 mM natrio tetrachlorpaladato. Po inkubacijos kambario temperatūroje 30 min., tirpalo šviesos sugertis matuojama 425 nm bangos ilgyje. Tuščias mėginys ruošiamas pagal tą pačią metodiką be ekstrakto [38].

Bendra gliukozinolatų koncentracija (µmol/g) apskaičiuotas pagal (2.15) formulę:

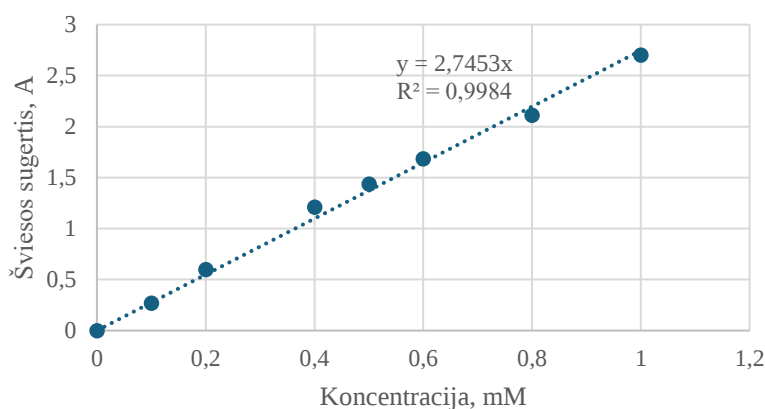
$$x = 1,40 + 118,86 \cdot A_{425}; \quad (2.15)$$

čia A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis.

2.13. Redukuoto glutationo (GSH) koncentracijos įvertinimas

Ekstraktas ruošiamas 0,1 g augalinės žaliavos homogenizuojant su 5 ml 100 mM natrio fosfatinio buferiu (pH 7,4) 10 min termostatuojamame kratytuve 25 °C. Tuomet centrifuguojami 9000 aps/min 10 min 4 °C ir dar kartą centrifuguojami *Eppendorf* mėgintuvėliuose 10 min. Vėliau į 1 ml supernatantą pilama 0,5 ml 5 % trichloracto rūgšties ir 0,5 ml Elmano reagento. Šviesos sugertis matuojama 412 nm bangos ilgyje. Tuščias mėginys – 1 ml natrio fosfatinis buferis (pH 7,4), 0,5 ml 5 % trichloracto rūgštis ir 0,5 ml Elmano reagentas. Redukuoto glutationo koncentracija apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę (žr. 2.5 pav.).

Kalibracinė kreivė ruošiamą ištirpinant 3,07 mg redukuoto glutationo su 10 ml distiliuoto vandens. Redukuoto glutationo 1 mmol/l standartinis tirpalas praskiedžiamas su distiliuotu vandeniu tokiomis koncentracijomis: 0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,5 mM; 0,6 mM; 0,8 mM; 1 mM. Papildomai įpilama 0,5 ml 5 % trichloracto rūgšties ir 0,5 ml Elmano reagento.



2.5 pav. Glutationo kalibracinė kreivė

2.14. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

100 mg augalinės žaliavos homogenizuojama su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi 10 min, o tuomet centrifuguojama 9000 aps/min, 10 min, 4 °C. Mėginiai dar kartą centrifuguojami *Eppendorf* mėgintuvėliuose. 0,3 ml supernatanto sumaišoma su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrines rūgštimi (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) ir inkubuojama 95 °C temperatūroje 30 min, atšaldoma ir centrifuguojama 10 min., 9000 aps/min. Šviesos sugertis matuojama 532 ir 600 nm bangos ilgiuose [39].

MDA koncentracija apskaičiuojama pagal (2.16) formulę:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \cdot V_e \cdot 2}{k \cdot m \cdot V_a}; \quad (2.16)$$

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

E – tirpalo šviesos sugertis;

V_e – ekstrakto tūris, ml;

V_a – ekstrakto tūris analizei, ml;

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

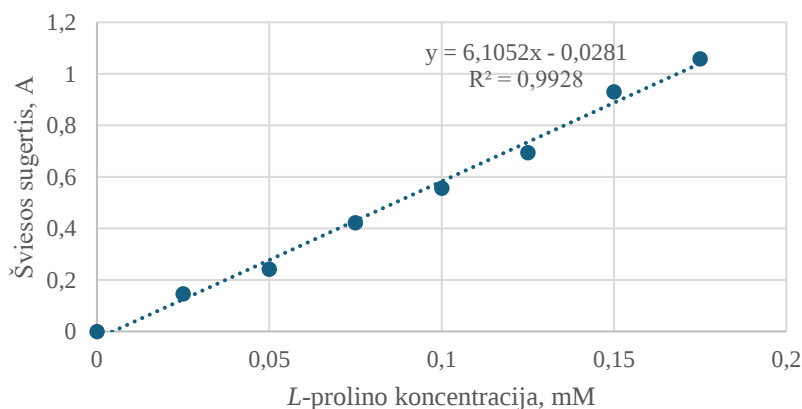
m – bandinio masė, ekstrakcijai, g.

2.15. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas

Ekstraktas paruošiamas 100 mg išdžiovintos ir susmulkintos augalinės žaliavos užpilant 4 ml distiliuotu vandeniu. Mėgintuvėlis su augaline žaliava 3 min kaitinamas 95 °C temperatūroje ir atšaldomas. Procedūra kartojama dar du kartus. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje.

Tiriamasis tirpalas paruošiamas gautą ekstraktą nupilant į kitą mėgintuvėlį ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu iki 6 ml. 1 ml praskiesto ekstrakto sumaišoma su 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir kaitinama 45 min vandens vonelėje. Į kontrolinį mėginį vietoj ekstrakto pilama 1 ml distiliuoto vandens, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento bei kaitinama 45 min vandens vonelėje. Tiriamųjų tirpalų šviesos sugertys matuojamos spektrofotometru 520 nm bangos ilgyje.

Kalibravimo kreivė ruošiamą *L*-prolino 0,0011 g ištirpinant 10 ml distiliuoto vandens. 0,0; 0,025; 0,050; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 ml *L*-prolino kiekiai iš pradinio tirpalo atitinkamai skiedžiami su 1 ml distiliuotu vandeniu, įpilama po 1 ml acto rūgšties ir po 1 ml ninhidrininio reagento. Mėgintuvėliai kaitinami 45 min 95 °C vandens vonelėje ir atšaldžius matuojamos šviesos sugertys 520 nm bangos ilgyje. Pagal gautus rezultatus sudaroma kalibravimo kreivė (žr. 2.6 pav.).



2.6 pav. *L*-prolino kalibracinė kreivė

L-prolino koncentracija apskaičiuojama pagal (2.17) formulę naudojantis aukščiau pateikta *L*-prolino kalibracine kreive.

$$C_x = \frac{E \cdot k \cdot V_{\text{bendras}}}{V_{\text{paimta}} \cdot n}; \quad (2.17)$$

čia C_x – *L*-prolino koncentracija $\mu\text{mol/g}$;

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – *L*-prolino koncentracija, gauta pagal kalibracinę kreivę (μmol);

V_{bendras} – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

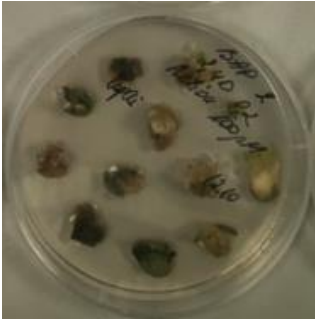
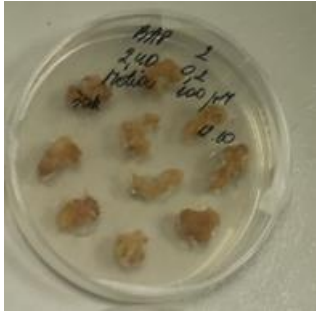
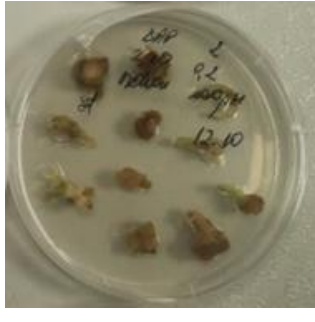
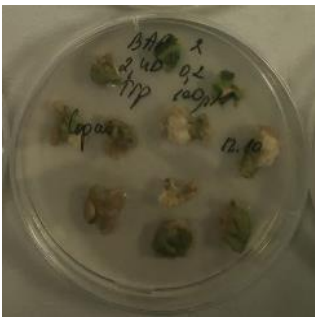
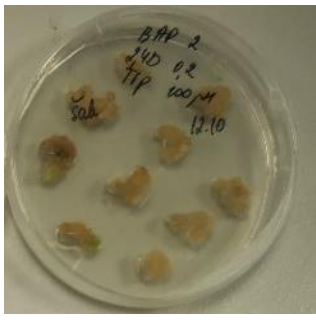
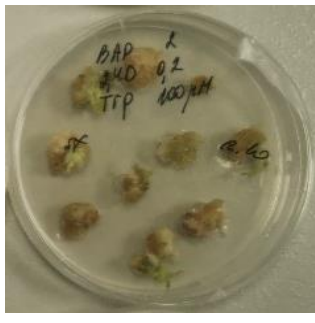
n – augalinės žaliavos kiekis, g.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) kaliaus kultūros *in vitro*

Tiriamąojo projekto metu suformuotos brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) kaliaus kultūros *in vitro*. Šiam tikslui įgyvendinti, sudaiginti brokoliai *in vitro* buvo išskaidyti į atskirus audinius – lapus, šaknis ir stiebus, bei formuotos kaliaus kultūros atitinkamose terpėse (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Brokolių lapų, šaknų ir stiebų kaliaus kultūrų formavimas *in vitro*

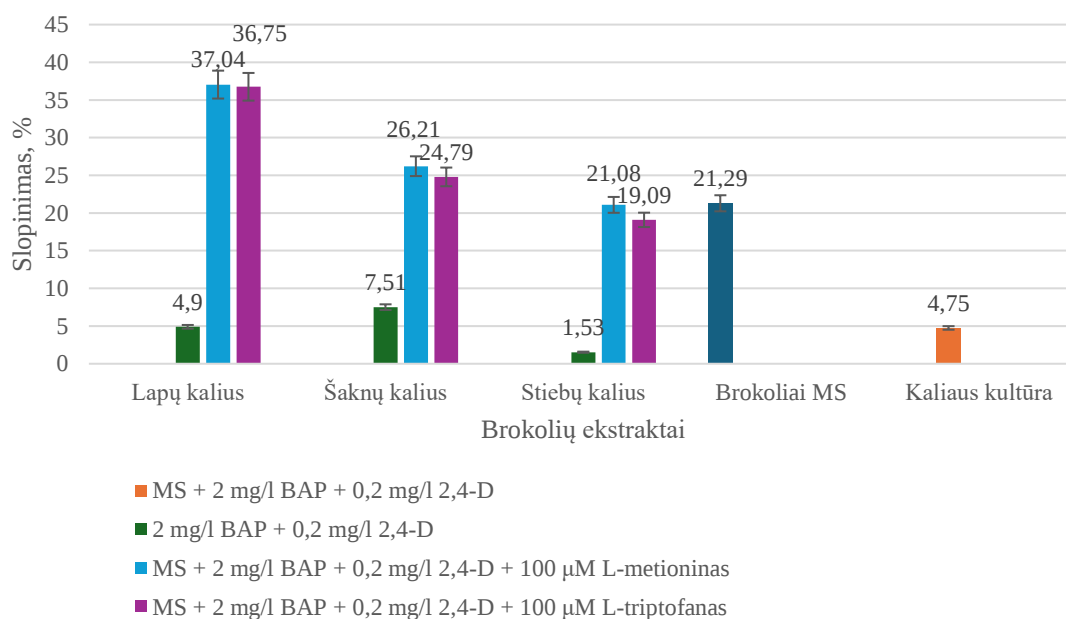
Terpė	Augalo audinys		
	Lapai	Šaknys	Stiebai
MS + BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l) + L-metioninas (100 µM)			
MS + BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l) + L-triptofanas (100 µM)			

3.2. Brokolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Tiriamąojo projekto metu siekiant įvertinti brokolių ekstraktų gebėjimą kaupti antioksidacinius bioaktyvius junginius buvo atlikti DPPH, redukcinių savybių, ABTS, FRAP bei SOD aktyvumo spektrofotometrinės analizės metodai. Rezultatų atsikartojamumui užtikrinti, kiekvienas tiriamasis mėginys tirtas po tris kartus.

3.2.1. Brokolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimo DPPH metodu gauti rezultatai pateikiami 3.1 pav.



3.1 pav. DPPH radikalo slopinimo priklausomybė nuo augalo dalies ir terpės, kuriose augintos brokolių kaliaus kultūros

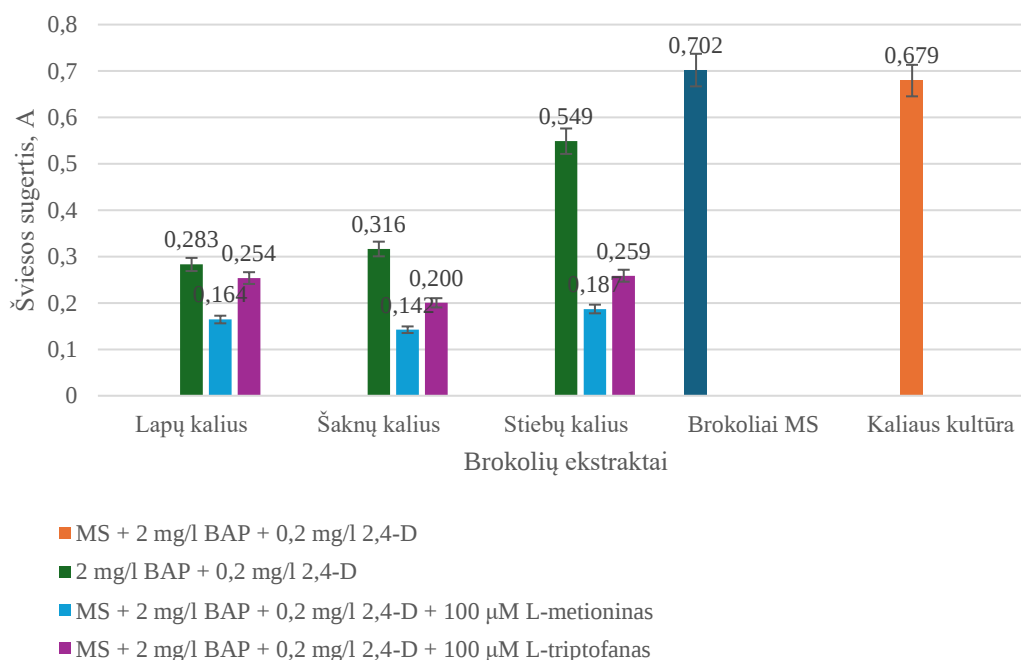
Iš pateiktų rezultatų galima matyti (žr. 3.1 pav.), jog stipriu DPPH[•] radikalo slopinimu pasižymėjo brokolių kaliaus kultūros, augintos terpėje su MS + BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l) + L-metioninu (100 µM), iš kurios stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo lapų kaliaus ekstraktas (37,04 %). Taip pat žymus antioksidacinis aktyvumas nustatytas terpėse, papildytomis su L-triptofanu – lapų kaliaus ekstrakto DPPH[•] radikalo slopinimas siekė 36,75 %. Tai parodo, jog šios abi aminorūgštys lapų audiniuose turėjo svarbią įtaką aktyvuoti antioksidacinį atsaką.

Brokoliai, augę MS terpėje taip pat pasižymėjo gana dideliu slopinimu (21,29 %) ir tai parodo, jog šioje terpėje augę brokoliai gali skatinti antioksidacinių junginių sintezę net be papildomų priedų. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas brokoliuose, augusiuose terpėse be aminorūgščių ir hormonų, t.y., kaliaus kultūroje (4,75 %) ir terpėse su BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l) – pavyzdžiui, stiebų kaliaus kultūroje DPPH slopinimas siekė tik 1,53 %.

3.2.2. Brokolių ekstraktų redukcinių savybių įvertinimas

Pagal pateiktus rezultatus, 3.2 pav. matoma, jog intensyviausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo brokolių MS ekstraktas (o.v. – 0,702). Įvertinta, jog papildžius mitybinę terpę augalų augimo hormonais brokolių kaliaus kultūrų ekstraktų redukcinės savybės pagerintos nebuvo, įvyko atvirkščiai – jos buvo netgi sumažintos.

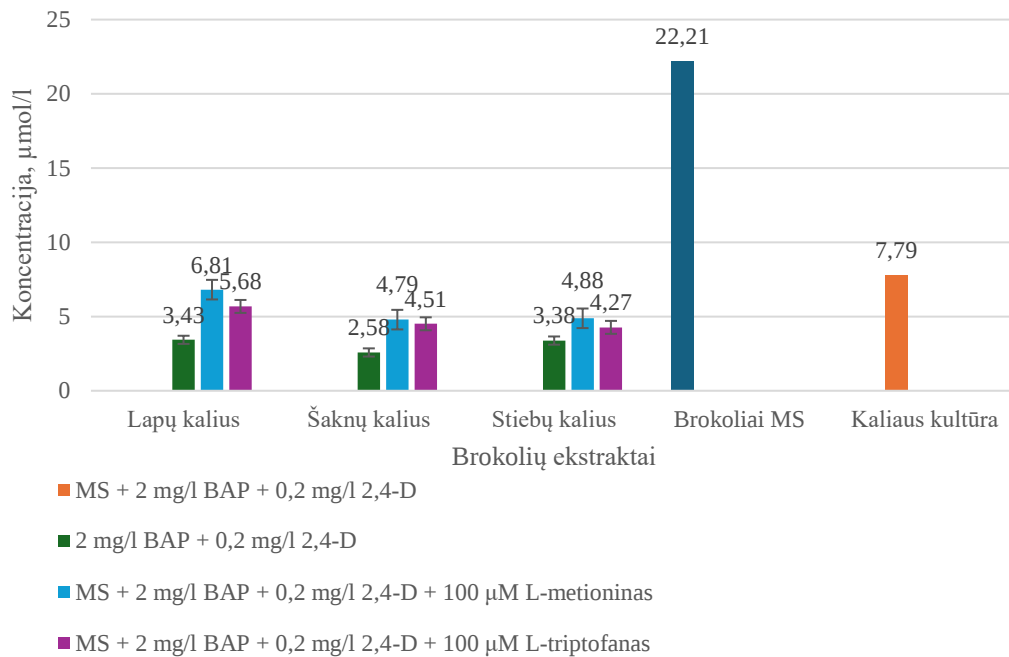
Žymesnės redukcinės savybės nustatytos lapų (o.v. – 0,283), šaknų (o.v. – 0,316) ir stiebų (o.v. – 0,549) kaliaus kultūrose, augintose MS terpėse su BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l). Mitybinės terpės sudėties papildymas aminorūgštimis leidžia daryti išvadą, jog jos gali slopinti redukuojančių junginių susidarymą ar skatinti kitus metabolinius procesus.



3.2 pav. Redukcinių savybių rezultatai tiriant brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus

3.2.3. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas brokolių ekstraktuose pagal FRAP metodą, naudojant TPTZ

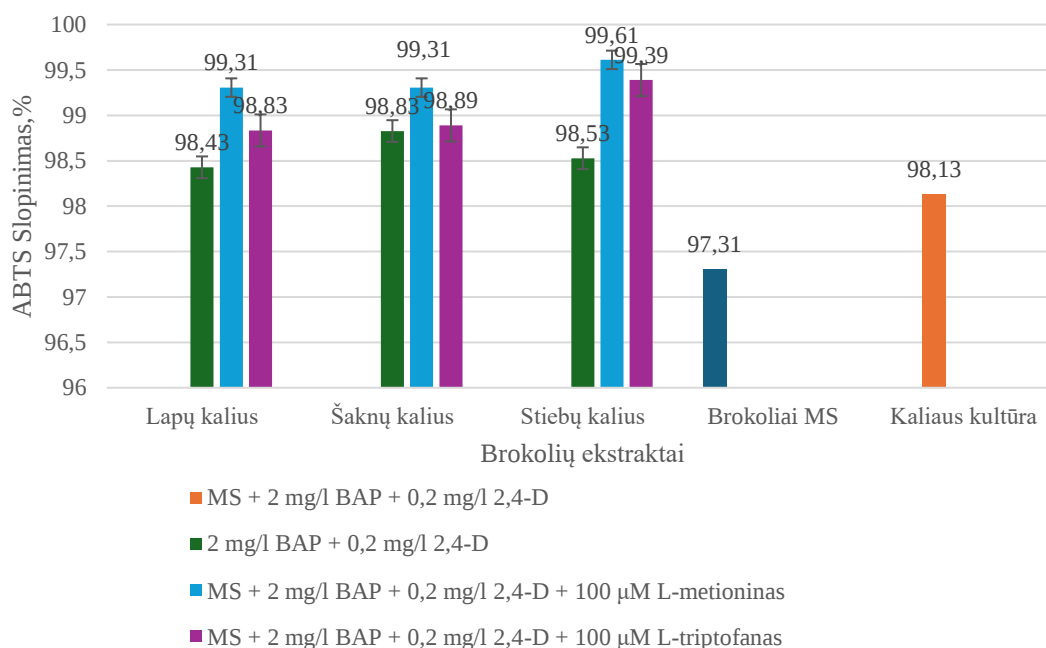
Išanalizavus gautus duomenis, kurie pateikiami 3.3 pav. matyti, jog brokolių MS ir kaliaus kultūrų ekstraktų rezultatai turėjo panašius rezultatus, kurie buvo gauti tiriant redukcines savybes. Kaip matoma, geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo brokoliai, augę MS terpėje – jų koncentracija siekė – 22,21 µmol/l. Žymesnę įtaką lapų, šaknų ir stiebų ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui, lyginant su L-triptofanu ar BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo reguliatoriais, turėjo jų mitybinės terpės papildymas L-metioninu (lapų kalius – 6,81 µmol/l, šaknų – 4,79 µmol/l, stiebų – 4,88 µmol/l). Gauti rezultatai rodo, jog mitybinės terpės papildymas augalų augimo hormonais brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių itin reikšmingai nepagerino.



3.3 pav. Antioksidacinio aktyvumo pagal FRAP metodą rezultatai tiriant brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus

3.2.4. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

Atlikus brokolių antioksidacinio aktyvumo įvertinimą ABTS metodu nustatyta, jog brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktai pasižymėjo ABTS radikalo slopinimu. Kaip matoma iš 3.4 pav. pateiktų rezultatų, stipriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo brokolių kaliaus kultūros, praturtintos aminorūgštimis – L-metioninu (lapų ir šaknų kalius – 99,31 %, stiebų – 99,61 %) ir L-triptofanu. Mažiausiu ABTS radikalo slopinimu pasižymėjo brokolių, augusių MS terpėje, ekstraktas (97,31 %). Bendru atveju, šis metodas leido įvertinti, jog mitybinės terpės, papildytos aminorūgštimis, turėjo įtakos diferencijuotų augalo audinių antioksidacinėms savybėms padidinti.



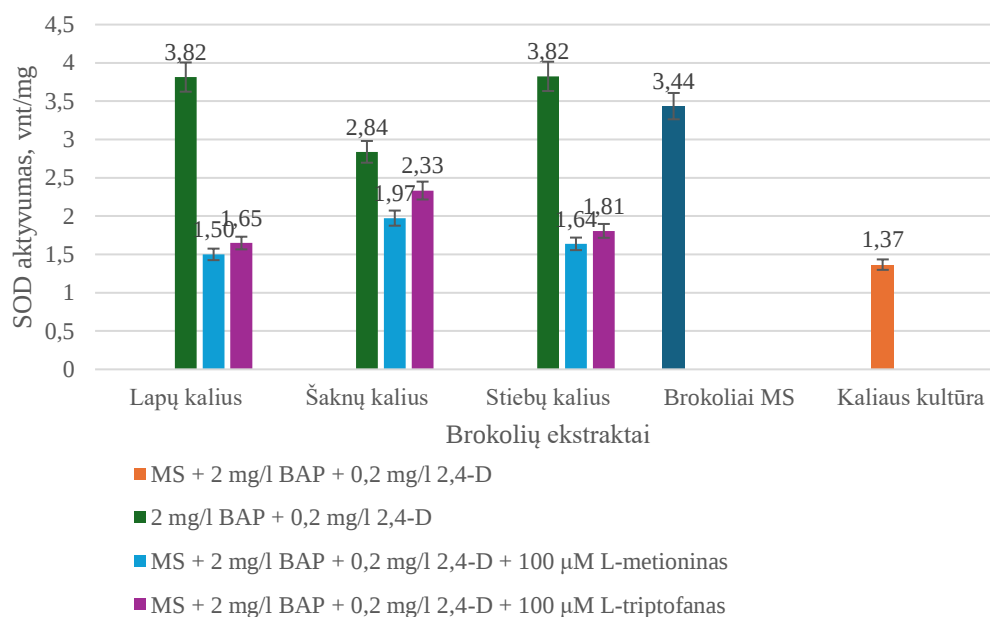
3.4 pav. Brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų antioksidacinių savybių įvertinimo ABTS metodu rezultatai

3.3. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas

Tiriant superoksido dismutazės aktyvumą (3.5 pav.) brokolių ekstraktuose, matyti, jog SOD aktyvumo skirtumai pasireiškia tarp skirtingų brokolių audinių ir auginimo sąlygų. Didžiausias šio fermento aktyvumas nustatytas auginimui naudojant terpes su BAP (2 mg/l) + 2,4-D (0,2 mg/l) – lapų ir stiebų ekstraktuose SOD aktyvumas siekė 3,82 vnt/mg, šaknų – 2,84 vnt/mg. Tai parodo, jog šios terpės sudėtis be aminorūgščių, labiausiai paskatino antioksidacinės sistemos veiklą brokolių audiniuose.

Brokolių audiniai, auginti terpėse, papildytomis su 100 µM L-metioninu ir L-triptofanu parodė mažesnę fermento aktyvumą, lyginant su 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l 2,4-D terpe. Žymesnis SOD koncentracijos sumažėjimas nustatytas L-metionino turinčiose terpėse, pavyzdžiui, lapų ekstrakto aktyvumas siekė tik 1,50 vnt/mg, o L-triptofano sukeltas poveikis buvo švelnesnis – šaknų ekstrakto superoksido dismutazės aktyvumas siekė 2,33 vnt/mg. Gautus rezultatų skirtumus tarp šių aminorūgščių galima aiškinti jų skirtingu poveikiu priklausomai nuo biocheminių funkcijų.

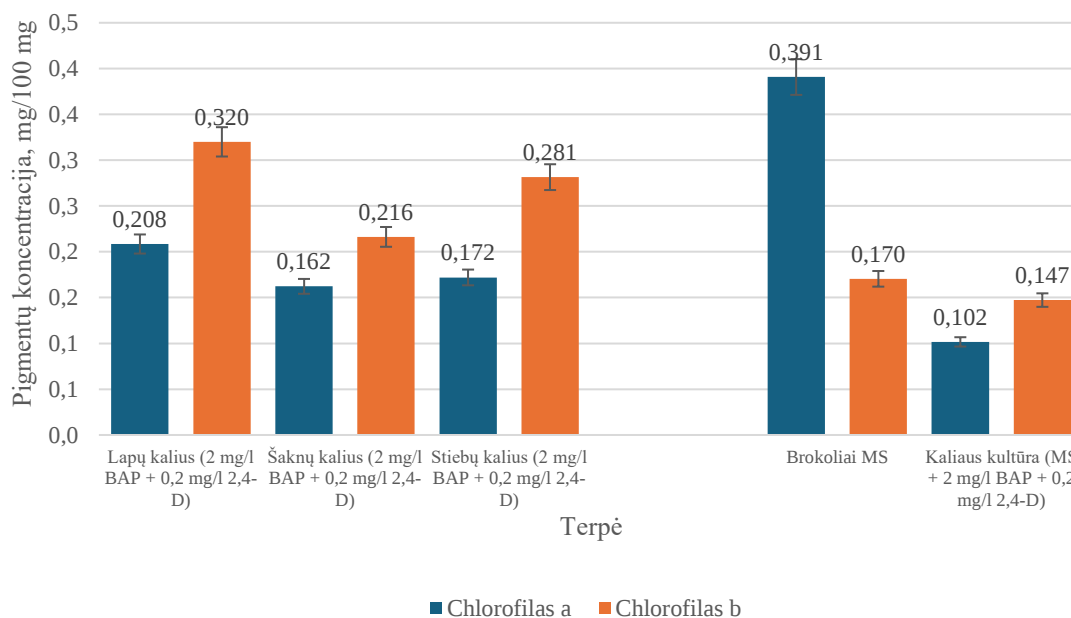
Brokoliai, auginti standartinėje MS terpėje, taip pat parodė aukštą natūralų antioksidacinės sistemos aktyvumą (3,44 vnt/mg). Mažiausiu SOD aktyvumu pasižymėjo kaliaus kultūra (1,37 vnt/mg), kuri, dėl nespecializuoto audinio pobūdžio parodė ribotą antioksidacinį atsaką.



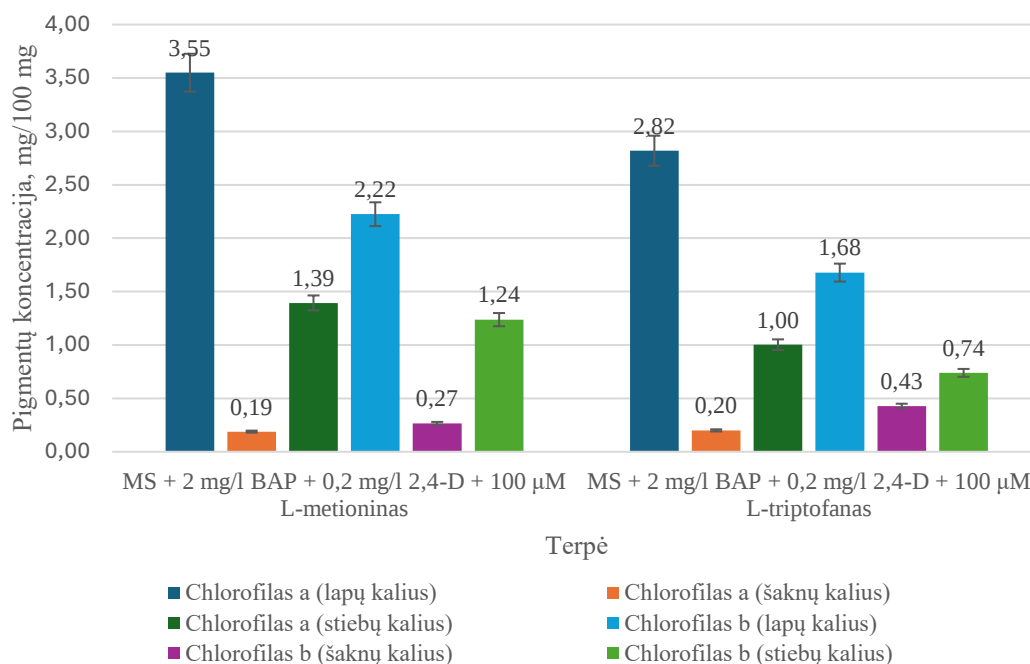
3.5 pav. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimo rezultatai tiriant brokolių ekstraktus

3.4. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas

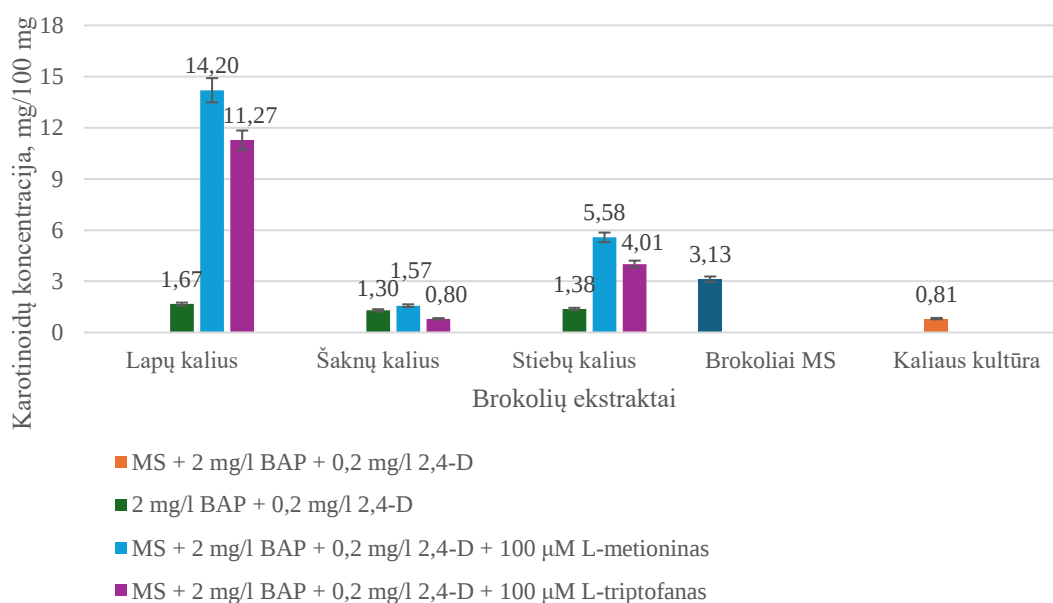
Augimui naudojant skirtingas mitybines terpes ir kaliaus kultūras, išaugintas iš skirtingų audinių, buvo įvertintos brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos. Gauti rezultatai pateikiami 3.6 pav., 3.7 pav. ir 3.8 pav.



3.6 pav. Chlorofilo *a* ir *b* įvertinimo brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai



3.7 pav. Chlorofilo *a* ir *b* įvertinimo brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai



3.8 pav. Karotinoidų koncentracijos įvertinimo brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

Pagal pateiktus rezultatus 3.6 pav. ir 3.7 pav. bei palyginus juose nurodytus duomenis, matoma, jog mitybinių terpių papildymas aminorūgštimis turėjo reikšmingos įtakos pigmentų koncentracijos padidėjimui. Didžiausios chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* koncentracijos nustatytos lapų kaliaus kultūrose, praturtintose L-metioninu (chlorofilo *a* koncentracija – 3,55 mg/100 mg, chlorofilo *b* – 2,22 mg/100 mg). Šiek tiek mažesnės chlorofilo *a* (2,82 mg/100 mg) ir chlorofilo *b* (1,68 mg/100 mg) koncentracijos nustatytos brokolių lapų kaliaus kultūrose, papildytose L-triptofanu. Kaip pateikta 3.7 pav., lyginant su stiebų ir lapų kaliaus kultūromis, nedidelėmis pigmentų koncentracijomis pasižymėjo šaknų kaliaus kultūros, iš šios kultūros kiek didesnė pigmentų koncentracija, t.y. chlorofilo *b* – 0,43 mg/100 mg, buvo nustatyta mitybinėje terpėje, papildytoje L-triptofanu.

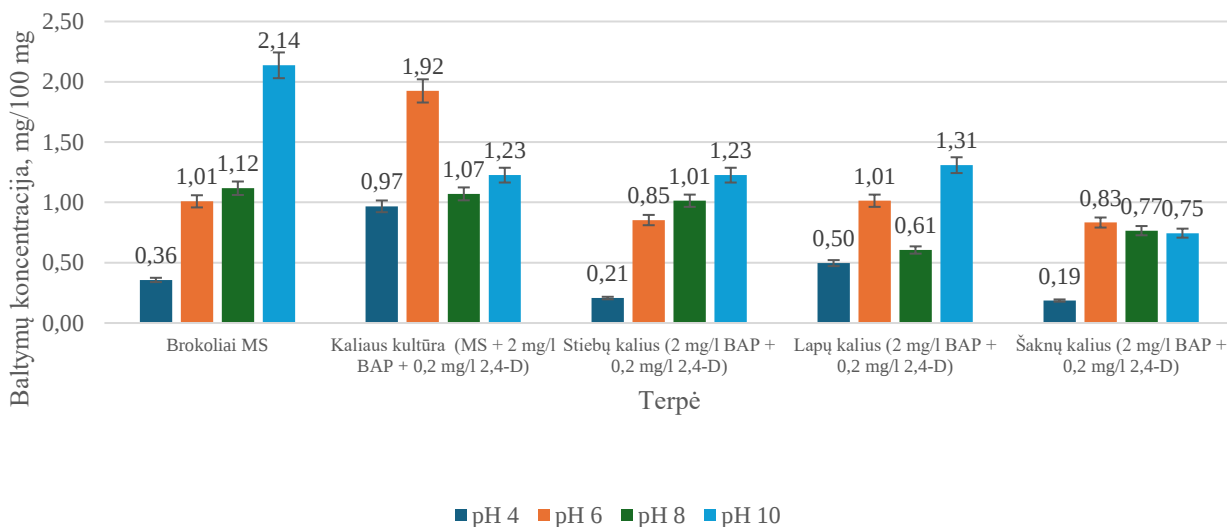
Kaip matoma 3.6 pav., brokoliai, auginti terpėse be aminorūgščių, nepasižymėjo aukštesnėmis pigmentų koncentracijomis, lyginant su rezultatais, gautais mitybines terpes praturtintus jomis. Tačiau kaip matoma, didžiausia chlorofilo *a* koncentracija nustatyta brokoliuose, kurie augo MS terpėje be papildomų priedų – 0,391 mg/100 mg. Audinių kultūrų auginimui panaudoti BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo hormonai lėmė didesnes chlorofilo *b* koncentracijas (lapų kaliaus kultūroje – 0,320 mg/100 mg, šaknų – 0,216 mg/100 mg ir stiebų – 0,281 mg/100 mg). Chlorofilo *a* koncentracijos atitinkamai buvo nustatytos šiek tiek mažesnės (lapų kaliaus kultūroje – 0,208 mg/100 mg, šaknų – 0,162 mg/100 mg ir stiebų – 0,172 mg/100 mg).

Pagal pateiktus 3.8 pav. karotinoidų koncentracijų rezultatus matoma, jog didžiausia karotinoidų koncentracija nustatyta lapų kaliaus kultūroje, papildytoje L-metioninu (14,20 mg/100 mg), bei L-triptofanu – 11,27 mg/100 mg. Mažomis karotinoidų koncentracijomis, lyginant su lapų ir stiebų kaliaus kultūromis, pasižymėjo šaknų kaliaus kultūros: su L-metioninu – 1,57 mg/100 mg, o su L-triptofanu – 0,80 mg/100 mg.

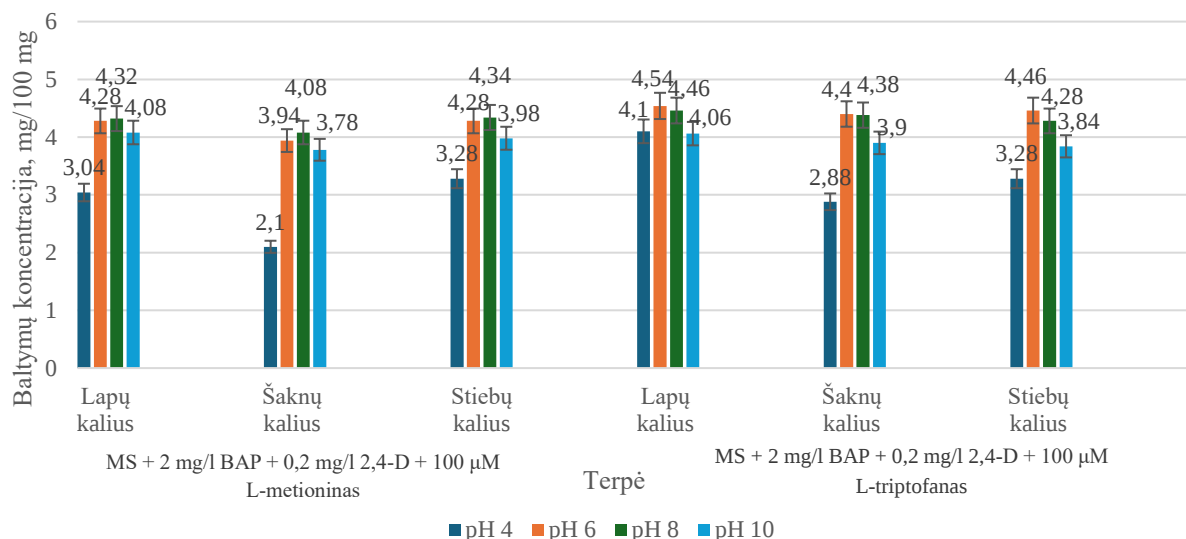
Aukščiau pateiktuose rezultatuose (žr. 3.6 pav., 3.7 pav. ir 3.8 pav.) matoma, jog brokoliai daugiausia kaupia karotinoideis. Taip pat, lyginant gautus rezultatus su kontroline kaliaus kultūros terpe, mitybinių terpių papildymas BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo hormonais, o ypač aminorūgštimis, turėjo teigiamos įtakos brokoliams kaupiant chlorofilą *a* ir *b* bei karotinoideis.

3.5. Baltymų išskyrimas iš brokolių augalinės masės

Atlikus baltymų koncentracijos įvertinimo priklausomybę nuo terpės ir pH, gauti rezultatai grafiškai pavaizduoti 3.9 pav. ir 3.10 pav.



3.9 pav. Baltymų koncentracijos priklausomybė nuo skirtingų mitybinių terpių ir pH



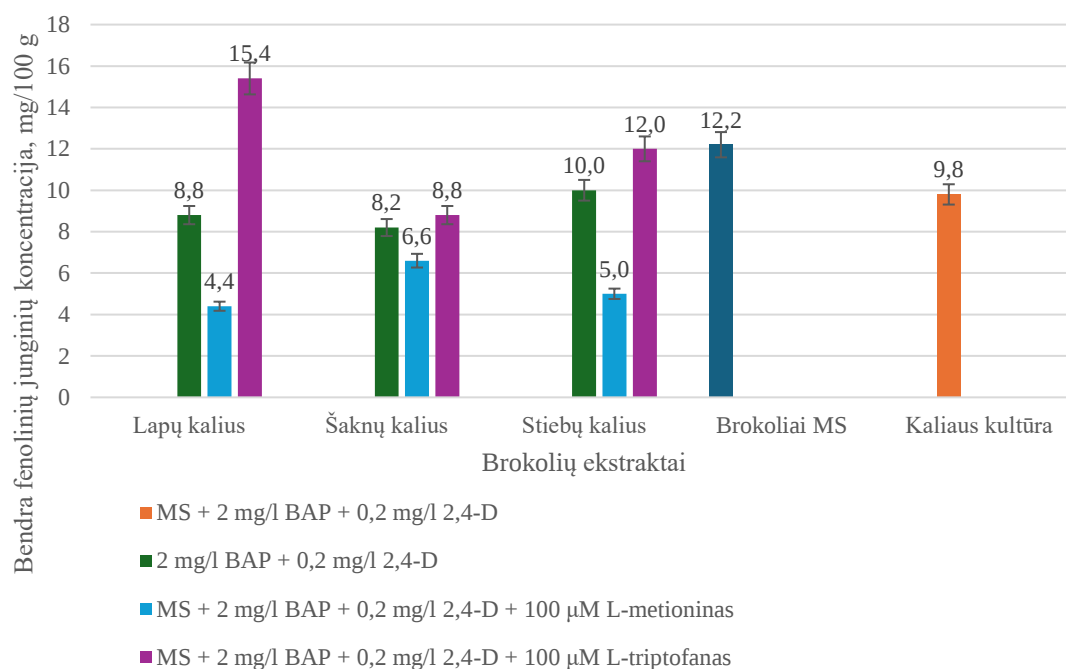
3.10 pav. Baltymų koncentracijos priklausomybė nuo mitybinės terpės bei augalo dalies, iš kurios augintos kaliaus kultūros ir pH

Iš gautų rezultatų 3.9 pav. ir 3.10 pav., matoma, jog mažiausios baltymų koncentracijos buvo nustatytos esant stipriai rūgštinei pH 4 vertei. Mažiausia koncentracija esant šiai pH vertei nustatyta šaknų kaliaus kultūroje (0,19 mg/100 mg), augintoje BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo hormonų terpėje (žr. 3.9 pav.), o didžiausia – lapų kaliaus kultūroje (4,1 mg/100 mg), papildytoje L-triptofanu (žr. 3.10 pav.). Kaip pateikta 3.9 pav., didžiausia baltymų koncentracija buvo nustatyta brokolių, augintų MS terpėje, esant stipriai bazinei pH 10 vertei – 2,14 mg/100 mg.

Kaip pateikta 3.10 pav., galima teigti, jog mitybinių terpių papildymas aminorūgštimis turėjo teigiamos įtakos baltymų išsiskyrimui, o optimalios pH vertės baltymams išsiskirti buvo pH 6 ir 8. Bendru atveju, šiose įvardintose pH vertėse, kiek didesnėmis išsiskyrusių baltymų koncentracijomis pasižymėjo audinių kultūros, kurios buvo augintos terpėse, papildytomis L-triptofanu.

3.6. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto metodu

Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimo brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose gauti rezultatai pateikiami 3.11 pav.



3.11 pav. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimo brokolių kaliaus kultūros *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

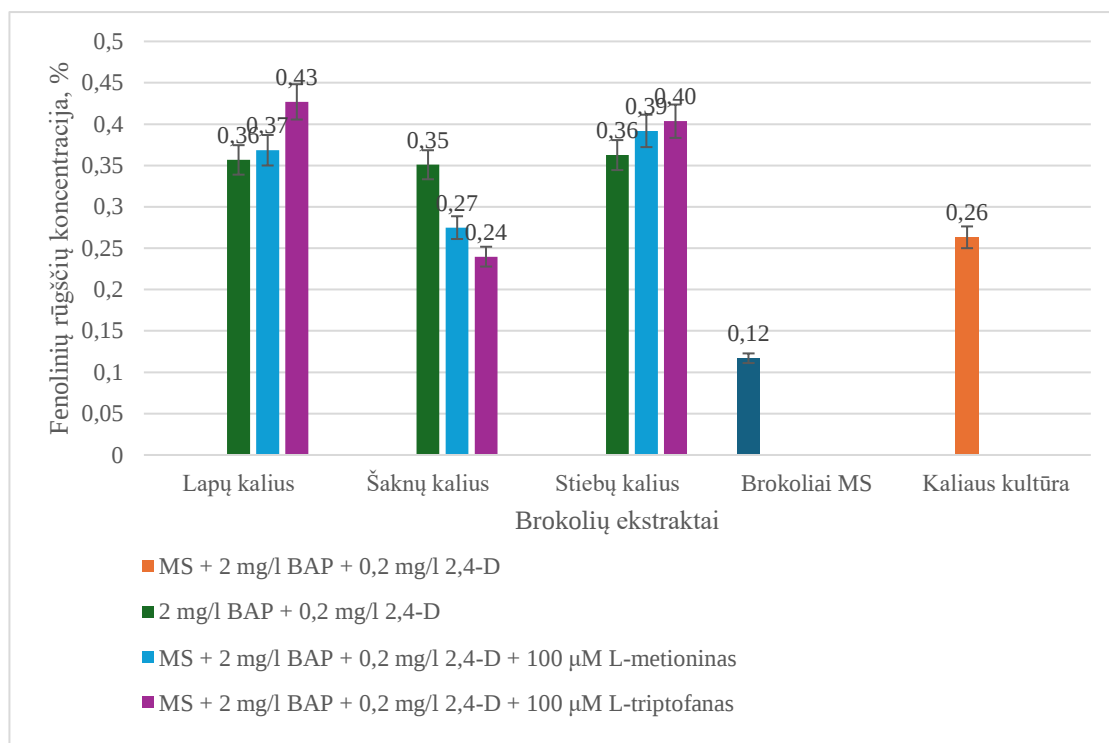
Iš pateiktų rezultatų (žr. 3.11 pav.) matyti, jog didžiausia fenolinių junginių koncentracija diferencijuotuose augalų audiniuose buvo nustatyta brokolių lapų kaliaus kultūrose, praturtintose L-triptofanu (15,4 mg/100 g). Šios mitybinės terpės sudėtis lėmė didesnes fenolinių junginių koncentracijas diferencijuotuose augalų audiniuose, lyginant su gautais rezultatais, kuomet mitybinė terpė buvo papildyta L-metioninu ar BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo reguliatoriais. Brokolių, augusių MS terpėje, ekstraktas taip pat pasižymėjo reikšminga fenolinių junginių koncentracija – 12,2 mg/100 g.

Atsižvelgiant į fenolinių junginių koncentracijas, gautas mitybines terpes papildžius L-metioninu (lapų kaliaus kultūroje nustatyta fenolinių junginių koncentracija – 4,4 mg/100 g, šaknų – 6,6 mg/100 g, stiebų – 5,0 mg/100 g), bei gautas didesnes fenolinių junginių koncentracijas auginimui naudojusi L-triptofaną ar BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) reguliatorius, galima teigti, jog L-metioninas prislopino fenolinių junginių sintezę augalų audiniuose.

3.7. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas brokolių ekstraktuose

Atlikus bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimą, gauti rezultatai pateikiami 3.12 pav. Matoma, jog didžiausios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatytos brokolių lapų ir stiebų kaliaus kultūrų ekstraktuose. Mitybinės terpės papildymas L-triptofanu skatino fenolinių rūgščių sintezę lapuose (0,43 %) ir stiebuose (0,40 %), tačiau šaknyse (0,24 %) sintezė galimai buvo slopinama. Šaknų kaliaus kultūroje fenolinių rūgščių sintezę labiausiai paskatino BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo reguliatoriai, jų nustatyta koncentracija siekė – 0,35 %.

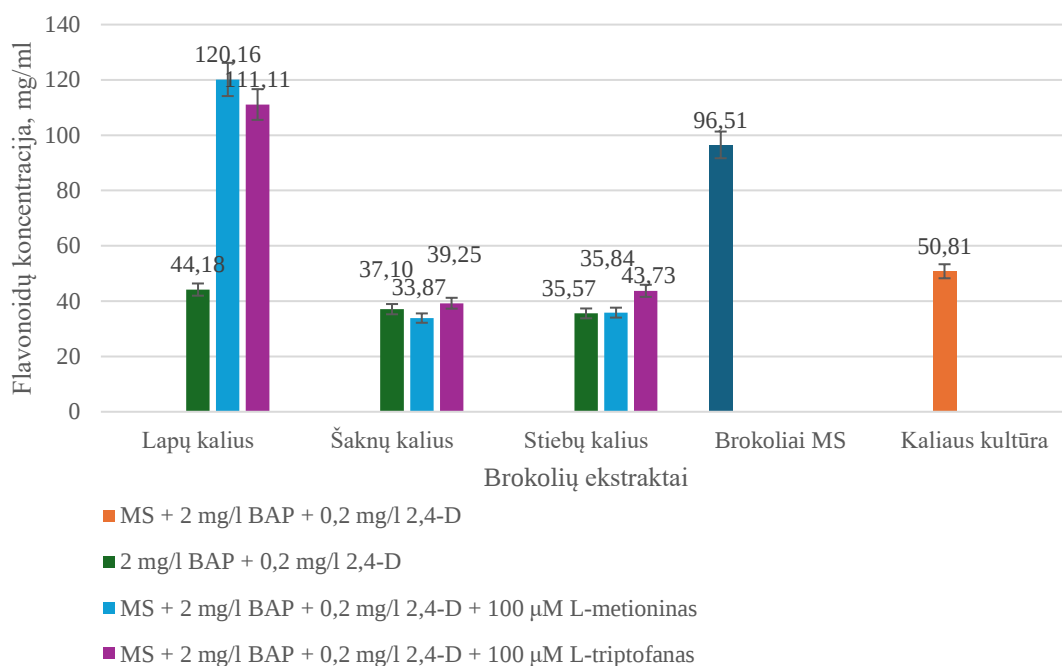
Nors ir bendru atveju fenolinių rūgščių koncentracijos nepasižymėjo itin aukštomis vertėmis, tačiau nustatyta mažiausia fenolinių rūgščių koncentracija brokoliuose MS (0,12 %) leidžia daryti prielaidą, jog šių rūgščių sintezė vis dėlto daugiausia vyko diferencijuotuose audiniuose.



3.12 pav. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimo, brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose, rezultatai

3.8. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

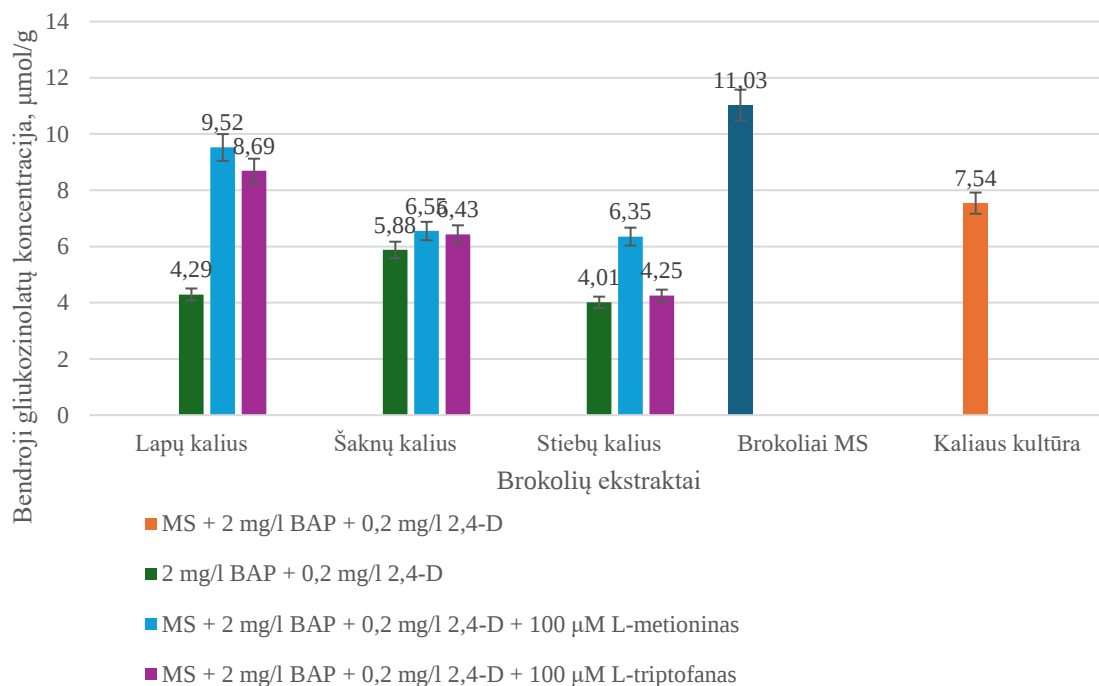
3.13 pav. pateikiami rezultatai, gauti ištyrus brokolių ekstraktus, siekiant įvertinti flavonoidų koncentracijas. Gauti rezultatai rodo, jog didžiausia flavonoidų koncentracija nustatyta lapų kaliaus kultūroje, papildytoje L-metioninu (120,16 mg/ml). Taip pat didelė flavonoidų koncentracija pasižymėjo lapų kaliaus kultūra praturtinta L-triptofanu – 111,11 mg/ml. Įvertinta, jog šaknų ir stiebų kaliaus kultūrose, papildytomis aminorūgštimis, žymios įtakos, lyginant su BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo reguliatoriais, flavonoidų koncentracijos didėjimui žymios įtakos neturėjo. Tačiau kiek geresnę gebėjimą kaupti flavonoidus šaknų ir stiebų brokolių kaliaus kultūrose parodė jų auginimui mitybines terpes papildžius L-triptofanu (šaknų kaliaus kultūroje nustatyta koncentracija – 39,25 mg/ml, stiebų – 43,73 mg/ml). Brokoliai, auginti standartinėje MS terpėje taip pat rodo gebėjimą kaupti flavonoidus, tyrimo metu šių junginių koncentracija siekė 96,51 mg/ml.



3.13 pav. Flavonoidų koncentracijos įvertinimo rezultatai brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose

3.9. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas

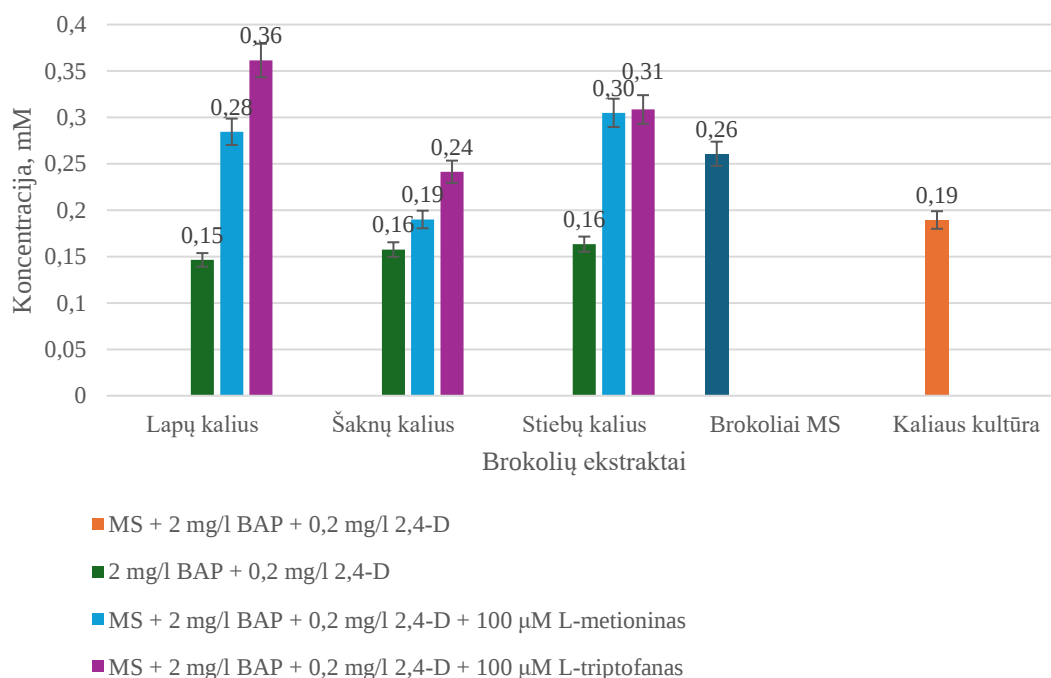
Atlikus brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų gliukozinolatų koncentracijos įvertinimo tyrimą, nustatyta, jog didžiausia šių bioaktyviųjų junginių koncentracija pasižymėjo brokoliai, auginti standartinėje MS terpėje – 11,03 µmol/g (žr. 3.14 pav.). Lyginant lapų, šaknų ir stiebų kaliaus kultūras, žymesnės įtakos gliukozinolatų koncentracijai turėjo mitybinės terpės papildymas L-metioninu (nustatyta koncentracija lapų kaliaus kultūroje – 9,52 µmol/g, šaknų – 6,55 µmol/g, stiebų – 6,35 µmol/g). Mažiausia sintetinių gliukozinolatų koncentracija nustatyta stiebų kaliaus kultūroje (4,01 µmol/g), kuomet terpė buvo papildyta BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augalų augimo reguliatoriais.



3.14 pav. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimo rezultatai brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktuose

3.10. Redukuoto glutationo koncentracijos įvertinimas

Pateiktame 3.15 pav. matoma, jog didžiausios redukuoto glutationo koncentracijos nustatytos diferencijuotuose augalų audiniuose, kurių mitybinės terpės buvo papildytos L-triptofanu (lapų kaliaus kultūroje – 0,36 mM, šaknų – 0,19 mM, stiebų – 0,31 mM). Šiek tiek mažesnės glutationo koncentracijos nustatytos augalų augimui naudojant L-metioniną (lapų kaliaus kultūroje – 0,28 mM, šaknų – 0,19 mM, o stiebų – 0,30 mM). Matoma, jog mitybinės terpės be aminorūgščių visuose audiniuose pasižymėjo mažesne glutationo koncentracija. Taigi, sumažėjusi redukuoto glutationo koncentracija nustatyta diferencijuotuose augalų audiniuose, kuomet augimui naudoti BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) regulatoriai. Taip pat nustatyta, jog redukuotą glutationą, kiek mažesne koncentracija nei lapų ar stiebų kaliaus kultūros, gali kaupti ir brokoliai, auginti MS terpėje (0,26 mM), o nustatyta 0,19 mM koncentracija kaliaus kultūroje buvo mažesnė nei bet kuriame augalo audinyje, kuomet augimui naudotos aminorūgštys.



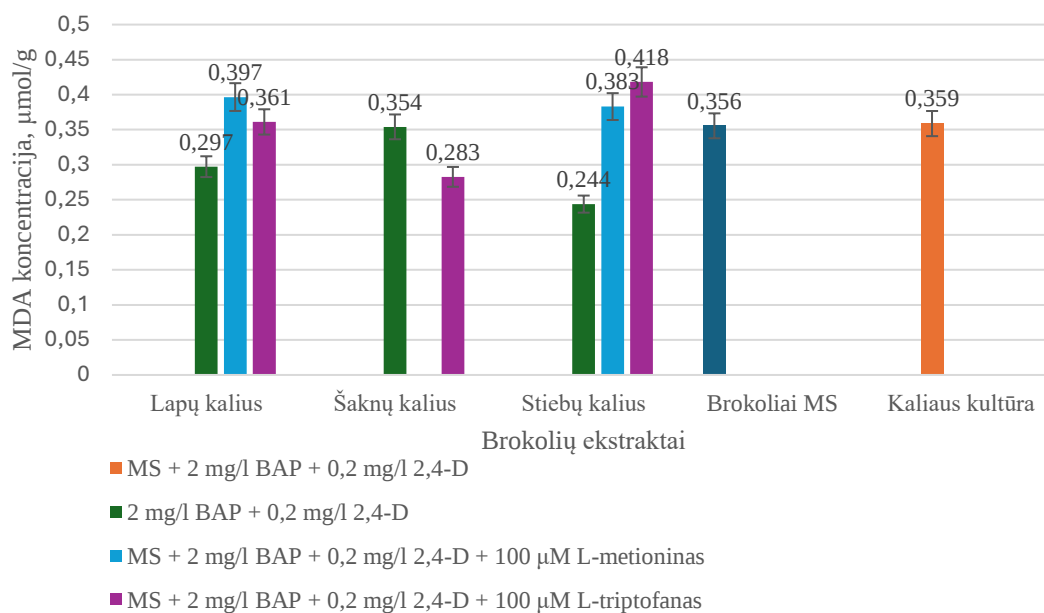
3.15 pav. Redukuoto glutationo koncentracijos įvertinimo rezultatai, gauti ištyrus brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus

3.11. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

Pagal pateiktus rezultatus (3.16 pav.) matyti, jog padidėjusios MDA koncentracijos nustatytos lapų kaliaus kultūros ekstraktuose, kurių mitybinės terpės buvo papildytos L-metioninu (0,397 µmol/g) bei L-triptofanu (0,361 µmol/g), augimui naudojant BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) reguliatorius, nustatyta MDA koncentracija buvo mažesnė – 0,297 µmol/g.

Šaknų kaliaus kultūrų ekstraktuose didžiausia MDA koncentracija buvo nustatyta jų augimui naudojant BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo reguliatorius (0,354 µmol/g). Su L-triptofanu koncentracija buvo mažesnė – 0,283 µmol/g. Todėl galima daryti prielaidą, jog šaknų kaliaus kultūroje L-triptofanas sumažina patiriamą oksidacinį stresą. Šaknų kaliaus MDA koncentracijos įvertinimas, kuomet augimui papildomai naudotas L-metioninas, įvertinimas nebuvo atliktas dėl tiriamosios medžiagos trūkumo.

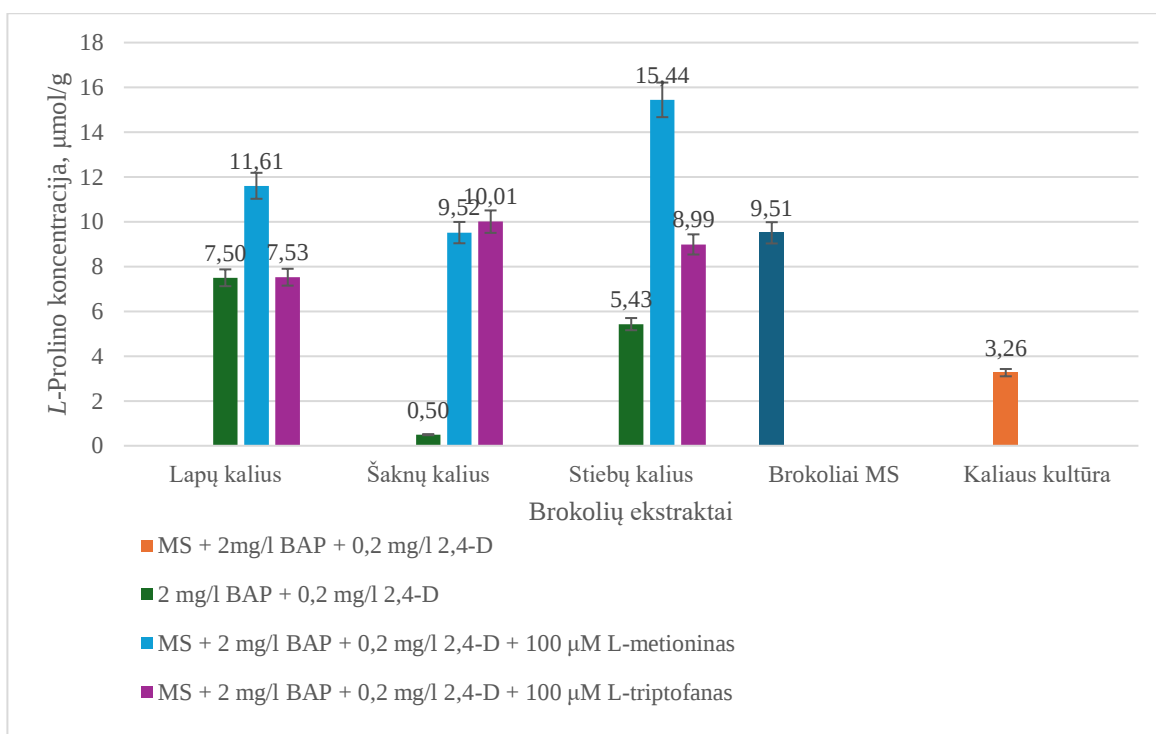
Padidėjusios MDA koncentracijos stiebų kaliaus kultūrų ekstraktuose nustatytos panaudojus L-triptofaną (0,418 µmol/g) bei L-metioniną (0,383 µmol/g), tuo tarpu aminorūgščių nenaudojus – 0,244 µmol/g. Tai leidžia daryti išvadą, jog stiebuose ir lapuose aminorūgštys gali turėti įtakos skatinant oksidacinius procesus. Nustatyta koncentracija kaliaus kultūroje (0,359 µmol/g) taip pat parodo, jog net ir be papildomų priedų oksidacinis stresas brokolių audiniuose yra gana aukštas.



3.16 pav. Malondialdehido koncentracijos įvertinimo rezultatai, gauti tiriant brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktus

3.12. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas

Atlikus *L*-prolino koncentracijos įvertinimą, iš gautų duomenų tiriant brokolius (3.17 pav.) matoma, kad didžiausia *L*-prolino koncentracija nustatyta stiebų kaliaus kultūroje (15,44 μmol/g), jų mitybinę terpę papildžius *L*-metioninu. Ši aminorūgštis taip pat turėjo žymios įtakos *L*-prolino koncentracijos padidėjimui lapų kaliaus kultūroje – 11,61 μmol/g. Šaknų kaliaus kultūrose padidėjusios *L*-prolino koncentracijos taip pat nustatytos, kuomet buvo naudojamos aminorūgštys: su *L*-metioninu – 9,52 μmol/g, su *L*-triptofanu – 10,01 μmol/g. Aminorūgščių nenaudojant, t.y. augimui naudojant BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) priedus, *L*-prolino koncentracija šaknų kaliaus kultūroje buvo ženkliai nuslopinta, jo koncentracija siek tik 0,50 μmol/g. Tad aminorūgščių papildymas ženkliai paskatino *L*-prolino biosintezę šaknų kaliaus kultūrose.



3.17 pav. Brokolių kaliaus kultūrų *in vitro* ekstraktų *L*-proolino koncentracijos įvertinimo rezultatai

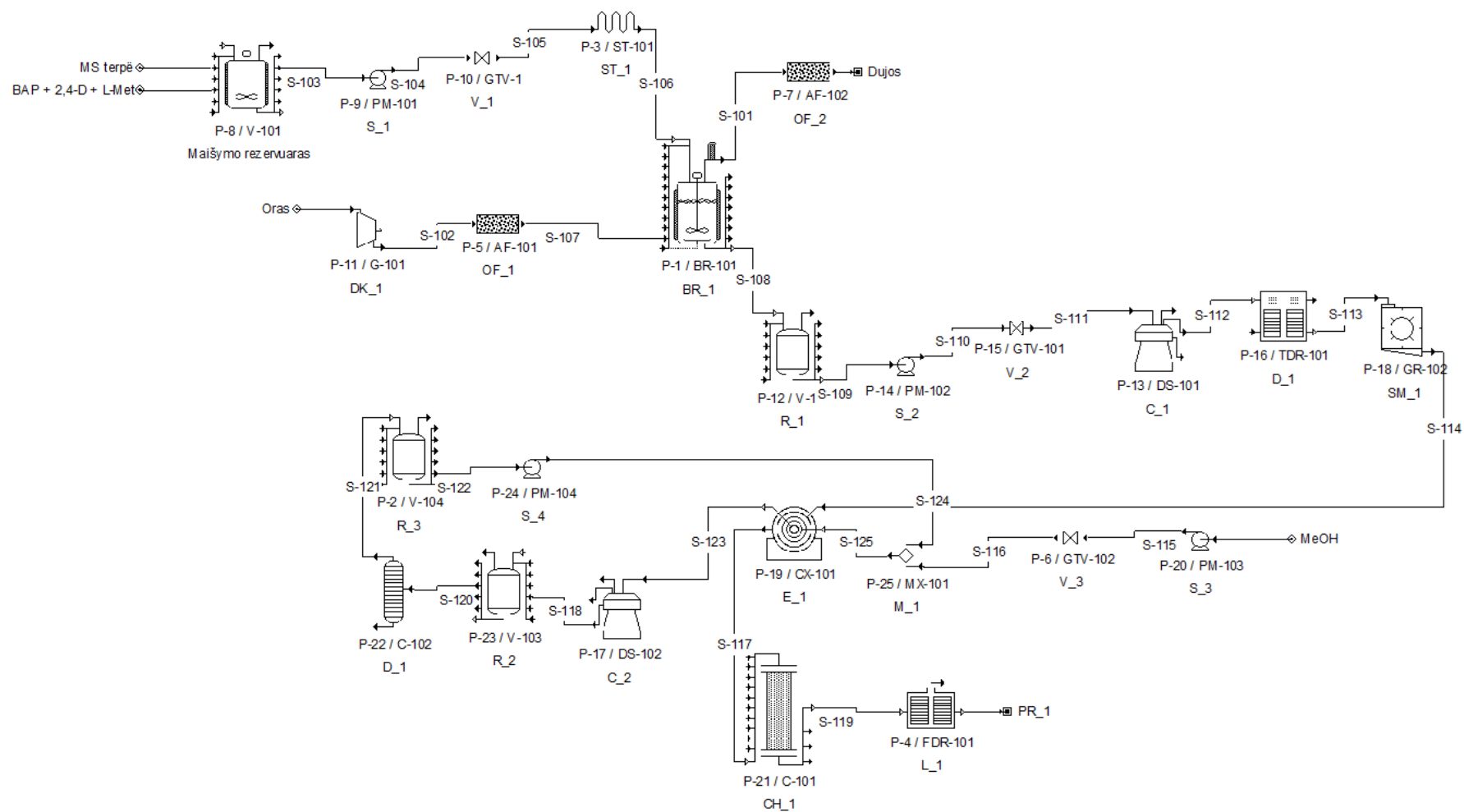
4. Rekomendacijų dalis

Gliukozinolatus galima išskirti iš brokolių (lot. *Brassica oleracea* var. *italica*) kaliaus kultūrų, užaugintų MS terpėje kartu su fitohormonais BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) bei L-metioninu (200 µM). Gliukozinolatus iš brokolių kaliaus kultūrų išskirti yra pateikiama principinė aparatūrinė schema (4.1 pav.).

Siekiant užauginti biomasę, į maišymo rezervuarą tiekama MS terpė su fitohormonais BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) bei L-metioninu (200 µM), taip skatinant fitocheminių medžiagų sintezę brokolių kultūrose. Tuomet išcentrinis siurbliu (S_1) brokolių kultūra pumpuojama į nepertraukiamo veikimo sterilizatorių (ST_1) iš kurio patenka į bioreaktorių (BR_1). Brokolių ląstelių suspensijos kultūra patalpinama į rezervuarą (R_1) iš kurio išcentrinis siurbliu perduodama į centrifugą (C_1), o džiovinimo kameroje (D_1) išdžiovinama biomasė. Prieš tiekimą į ekstraktorių (E_1), išdžiovinta biomasė dar patenka į smulkintuvą (SM_1). Ekstrahavimo metu galimas ląstelių suirimas, todėl yra svarbu fermentą mirozinazę inaktyvuoti siekiant išlaikyti nepakitusį gliukozinolatus kiekį proceso metu. Tai galima padaryti ekstrakciją vykdant 70 °C temperatūroje [40]. Į ekstraktorių išcentrinis siurbliu (S_3) ir atidarius vožtuvą (V_3) papildomai tiekiamas metanolis.

Iš ekstraktoriaus viršutinė frakcija tiekama į centrifugą (C_2) siekiant gauti alkoholinį ekstraktą ir tuomet iš centrifugos, po surinkimo į rezervuarą (R_2), tiekama į distiliatorių (D_1). Tokiu būdu, surinkus metanolį į rezervuarą (R_3), jis yra pakartotinai perduodamas į ekstraktorių.

Surinkta apatinė frakcija yra tiekama į chromatografijos kolonėlę (CH_1) ir išdžiovinus liofilizatoriuje (L_1) gauti kieti milteliai surenkami produkto (PR_1) laikymo talpoje.



4.1 pav. Principinė aparatinė gliukozinolatų ekstrakcijos iš brokolių (*Brassica oleraceae* var. *italica*) kaliaus kultūrų *in vitro* schema

4.1 lentelė. Technologinėje schemoje pavaizduotų žymėjimų reikšmės

Žymėjimas	Reikšmė
S 1 – S 4	Siurblys
V 1 – V 3	Vožtuvas
ST 1	Sterilizatorius
DK 1	Dujų kompresorius
OF 1 – OF 2	Oro filtras
BR 1	Bioreaktorius
C 1 – C 2	Centrifuga
D 1	Džiovinimo kamera
SM 1	Smulkintuvas
M 1	Maišyklė
E 1	Estraktorius
D 1	Distiliatorius
CH 1	Chromatografinė kolonėlė
L 1	Liofilizatorius
PR 1	Produktas

Išvados

1. Atlikus antioksidacinius tyrimus DPPH, FRAP bei ABTS metodais, nustatyta, jog brokolių lapų, šaknų ir stiebų kaliaus kultūrų MS mitybinės terpės papildymas BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) bei L-metioninu (100 μ M) labiausiai paskatino antioksidacines savybes. DPPH ir FRAP metodais nustatyta, jog nediferencijuotuose brokolių audiniuose didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo MS terpėje su BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) bei L-metioninu (100 μ M) augintose kaliaus kultūrų ekstraktuose iš lapų, o ABTS metodu didžiausiu slopinimu pasižymėjo lapų ir šaknų kaliaus ekstraktai (99,31 %). Atlikus įvertinimą redukciniu metodu, intensyviausią antioksidacinį aktyvumą parodė augalų audinių kultūros, augusios MS terpėje su BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) fitohormonais.
2. Atlikus superoksido dismutazės įvertinimą, reikšmingiausią šio fermento aktyvumą lapų ir stiebų kaliaus kultūrose lėmė MS terpės papildymas BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo hormonais (3,82 vnt/mg). *L*-prolino sintezę labiausiai skatino mitybinės terpės papildymas L-metioninu bei didžiausia jo koncentracija nustatyta brokolių stiebų kaliaus ekstrakto (15,44 μ mol/g).
3. Nustatyta, jog mitybinių terpių papildymas BAP (2 mg/l) ir 2,4-D (0,2 mg/l) augimo hormonais, o ypač aminorūgštimis L-metioninu ir L-triptofanu, turėjo teigiamos įtakos brokolių kaliaus kultūroms kaupti chlorofilą *a* ir *b* bei karotinoidus, iš jų brokoliai daugiausia kaupė karotinoidus. Atlikus baltymų koncentracijos įvertinimą skirtingose pH vertėse, nustatyta, jog optimalios pH vertės baltymams išsiskirti buvo pH 6 ir 8. Didesnėmis išsiskyrusių baltymų koncentracijomis pasižymėjo brokolių audinių kultūros, kurios buvo augintos terpėse, papildytomis aminorūgštimis.
4. Nustatyta, jog didžiausią įtaką gliukozinolatams sintetinti brokolių kaliaus kultūrose turėjo MS terpės papildymas L-metioninu (9,52 μ mol/g). Didžiausios flavonoidų koncentracijos nustatytos lapų kaliaus kultūrose, augintose MS terpėse su L-metioninu (120,16 mg/ml) ir L-triptofanu (111,11 mg/ml). Atlikus fenolinių junginių koncentracijos įvertinimą, nustatyta, jog didžiausią šių junginių koncentraciją (15,40 mg/100 g) turėjo brokolių lapų kaliaus kultūros, augusios MS terpėje su L-triptofanu.

Literatūros sąrašas

1. KUMAR, S., SHARMA, S., et al. Cruciferous vegetables: a mine of phytonutrients for functional and nutraceutical enrichment. *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress* [interaktyvus]. Academic Press, 2022, pp. 401-426. [žiūrėta 2025-05-18]. Prieiga per doi: [10.1016/B978-0-12-823482-2.00020-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823482-2.00020-0).
2. VILLARREAL-GARCIA, D., NAIR, V., et al. Plants as Biofactories: Postharvest Stress-Induced Accumulation of Phenolic Compounds and Glucosinolates in Broccoli Subjected to Wounding Stress and Exogenous Phytohormones. *Frontiers in plant science* [interaktyvus]. 2016, Vol. 7. [žiūrėta 2025-05-18]. Prieiga per doi: [10.3389/fpls.2016.00045](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00045).
3. SIOMOS, A.S., KOULARMANIS, K., TSOUVALTZIS, P. The Impacts of the Emerging Climate Change on Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.) Crop. *Horticulturae* [interaktyvus]. 2022, 8 (11), 1032. [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/horticulturae8111032](https://doi.org/10.3390/horticulturae8111032).
4. SYED, R.U., MONI, S.S., BREAK, M.K.B., et al. Broccoli: A Multi-Faceted Vegetable for Health: An In-Depth Review of Its Nutritional Attributes, Antimicrobial Abilities, and Anti-inflammatory Properties. *Antibiotics* [interaktyvus]. 2023, 12, 1157. [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/antibiotics12071157](https://doi.org/10.3390/antibiotics12071157).
5. LI, H., XIA, Y., LIU, H.Y., et al. Nutritional values, beneficial effects, and food applications of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. Elsevier, 2022, Vol. 119, pp. 288-308. [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.tifs.2021.12.015](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.015).
6. QUIZHPE, J., AYUSO, P., et al. Brassica oleracea var *italica* and Their By-Products as Source of Bioactive Compounds and Food Applications in Bakery Products. *Foods* [interaktyvus]. ResearchGate, 2024, 13 (21), 3513. [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/foods13213513](https://doi.org/10.3390/foods13213513).
7. NAGRAJ, G.S., CHOUKSEY, A., JAISWAL, S., JAISWAL, A.K. Chapter 1 – Broccoli. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* [interaktyvus]. Academic Press, 2020, pp. 5-17 [žiūrėta 2025-05-19]. ISBN 978-0-12-812780-3. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128127803000015>.
8. YOUSUF, M., CHAND, G., SINHA, B.K. Effect of nanoparticle and plant growth regulators on callus induction and sterilization of different explants under in vitro culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *The Pharma Innovation* [interaktyvus]. The pharma journal, 2023; 12 (9), pp. 2973-2980 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2023/vol12issue9/PartAH/12-9-309-958.pdf>.
9. GUDINO, I., MARTIN, A., CASQUETE, R., et al. Evaluation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) crop by-products as sources of bioactive compounds. *Scientia Horticulturae* [interaktyvus]. Elsevier, 2022, Vol. 304, 111284 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.scienta.2022.111284](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111284).
10. HOSSAIN, S., ALRUDAYNI, H.A., HAOUALA, F., et al. Callus cell and explants regeneration, glucose, mineral, antioxidant and flavonoid content development using broccoli root tip and leaf cutting *in vitro*. *Cellular and Molecular Biology* [interaktyvus]. CMB association publisher, 2023, 69 (11), pp. 45-50 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.14715/cmb/2023.69.11.8](https://doi.org/10.14715/cmb/2023.69.11.8).

11. JAISWAL, P., SINGH, A.V., YADAV, V.K., et al. Chapter 18 - Phytochemical studies in the field of plant tissue culture. *Advances in Plant Tissue Culture* [interaktyvus]. Academic Press, 2022, pp. 395-405 [žiūrėta 2025-05-19]. ISBN 978-0-323-90795-8. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323907958000229>.
12. KAISER, A.E., BANIASADI, M., GIANSIRACUSA, D., et al. Sulforaphane: A Broccoli Bioactive Phytocompound with Cancer Preventive Potential. *Cancers* [interaktyvus]. MDPI, 2021, 19, 4796 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/cancers13194796](https://doi.org/10.3390/cancers13194796).
13. ALBALADEJO-MARICO, L., CARVAJAL, M., YEPES-MOLINA, L. Involvement of glucosinolates and phenolics in the promotion of broccoli seedling growth through the modulation of primary and secondary metabolism. *Plant Science* [interaktyvus]. Elsevier, 2024, 347, 112205 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.plantsci.2024.112205](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.112205).
14. JO, J.S., BHANDARI, S.R., KANG, G.H., et al. Selection of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) on composition and content of glucosinolates and hydrolysates. *Scientia Horticulturae* [interaktyvus]. Elsevier, 2022, Vol. 298, 110984 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.scienta.2022.110984](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110984).
15. TANDA, AMARJIT S. *Molecular Advances in Insect Resistance of Field Crops*. Springer Nature Switzerland AG, 2022. ISBN 978-3-030-92152-1.
16. LIN, H., SUN, J., HU, Z., et al. Variation in Glucosinolate Accumulation among Different Sprout and Seedling Stages of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Plants* [interaktyvus]. MDPI, 2022, 11 (12), 1563 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/plants11121563](https://doi.org/10.3390/plants11121563).
17. ROMAN, J., CASTILLO, A., COTTET, L., MAHN, A. Kinetic and structural study of broccoli myrosinase and its interaction with different glucosinolates. *Food chemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2018, Vol. 254, pp. 87-94 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618302036>.
18. Ontario. Plant growth regulators [interaktyvus]. 2022. [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per internetą: <https://www.ontario.ca/page/plant-growth-regulators>.
19. JAMWAL, K., BHATTACHARYA, S., PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* [interaktyvus]. Elsevier, 2018, Vol. 9, pp. 26-38 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jarmap.2017.12.003](https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003).
20. SOSNOWSKI, J., TRUBA, M., VASILEVA, V. The Impact of Auxin and Cytokinin on the Growth and Development of Selected Crops. *Agriculture* [interaktyvus]. MDPI, 2023, 13(3), 724 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/agriculture13030724](https://doi.org/10.3390/agriculture13030724).
21. MUKHERJEE, A., GAURAV, A.K., SINGH, S., et al. The bioactive potential of phytohormones: A review. *Biotechnology Reports* [interaktyvus]. Elsevier, 2022, Vol. 35, e00748 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.btre.2022.e00748](https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00748).
22. HERRLING, M.P., LACKNER, S., NIRSCHL, H., et al. Chapter Four - Recent NMR/MRI studies of biofilm structures and dynamics. *Annual Reports on NMR Spectroscopy* [interaktyvus]. Elsevier, 2019, Vol. 97, pp. 163-213 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/bs.arnmr.2019.02.001](https://doi.org/10.1016/bs.arnmr.2019.02.001).
23. SEN, A. Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture. *Antioxidant Enzyme* [interaktyvus]. Research Gate, 2012 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.5772/48292](https://doi.org/10.5772/48292).
24. JEONG, S., JUNG, J.H., JUNG, K.W., et al. From microbes to molecules: a review of microbial-driven antioxidant peptide generation. *World Journal of Microbiology and*

- Biotechnology* [interaktyvus]. Springer, 2024, 40:29 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1007/s11274-023-03826-7](https://doi.org/10.1007/s11274-023-03826-7).
25. SHUBHA, K., ANAND, S., et al. Broccoli: A potential functional food. *Food & scientific report* [interaktyvus]. 2020, Vol. 1 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per internetą: <https://foodandscientificreports.com/details/broccoli-a-potential-functional-food.html>.
 26. ILAHY, R., TLILI, I., PEK, Z., et al. Pre- and Post-harvest Factors Affecting Glucosinolate Content in Broccoli. *Frontiers in nutrition* [interaktyvus]. Frontiers, 2020, Vol. 7 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3389/fnut.2020.00147](https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00147).
 27. LECHTENBERG, M., HENSEL, A. Determination of glucosinolates in broccoli-based dietary supplements by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. *Journal of Food Composition and Analysis* [interaktyvus]. Elsevier, 2019, 78, pp. 138-149 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.jfca.2019.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.02.007).
 28. DOHENY-ADAMS, T., REDEKER, K. ir kt. Development of an efficient glucosinolate extraction method. *Plant methods* [interaktyvus]. Biomed central, 2017, 13, 17 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1186/s13007-017-0164-8](https://doi.org/10.1186/s13007-017-0164-8).
 29. LI, X., WEN, D., HE, Y., et al. Progresses and Prospects on Glucosinolate Detection in Cruciferous Plants. *Foods* [interaktyvus]. MDPI, 2024, 13, 4141 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: <https://doi.org/10.3390/foods13244141>.
 30. TORRES-CONTRERAS, A.M., NAIR, V., SENES-GUERRERO, C., et al. Chemical Genetics Applied to Elucidate the Physiological Role of Stress-Signaling Molecules on the Wound-Induced Accumulation of Glucosinolates in Broccoli. *Plants* [interaktyvus]. MDPI, 2021, 10, 2660 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/plants10122660](https://doi.org/10.3390/plants10122660).
 31. SADANNAVAR, M.K., DONG, X., MANJ, R.Z.A., et al. Extraction of natural dye from Broccoli (*Brassica oleracea*) and evaluation of its antimicrobial, ultraviolet and dyeing properties on cotton fabrics. *Cellulose* [interaktyvus]. Springer nature link, 2024, 31, pp. 9503–9522 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1007/s10570-024-06167-2](https://doi.org/10.1007/s10570-024-06167-2).
 32. HOSSAIN, A.B.M.S., HAQ, I., IBRAHIM, N.A., et al. Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP in vitro culture: Its biochemical and antioxidant properties. *Data in brief* [interaktyvus]. Elsevier, 2016, Vol. 6, pp. 214-220 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.1016/j.dib.2015.11.061](https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.061).
 33. WOJTUNIK-KULESZA, K.A. Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes. *Molecules* [interaktyvus]. MDPI, 2020, 25(22), 5267 [žiūrėta 2025-05-19]. Prieiga per doi: [10.3390/molecules25225267](https://doi.org/10.3390/molecules25225267).
 34. HUSSEN, E.M., ENDALEW, S.A. In vitro antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of *Vernonia amygdalina*. *BMC Complementary Medicine and Therapies* [interaktyvus]. BMC, 2023, 23, 146 [žiūrėta 2025-05-20]. Prieiga per doi: [10.1186/s12906-023-03923-y](https://doi.org/10.1186/s12906-023-03923-y).
 35. NANDI, A., DEVANATHAN, S., RAMESH, A., et al. Anti-inflammatory and anti-microbial activities of the phytochemicals isolated from various parts of broccoli wastes. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics* [interaktyvus]. Researchgate, 2023, 6(1), pp. 67-83 [žiūrėta 2025-05-20]. Prieiga per doi: [10.5455/jabet.2023.d107](https://doi.org/10.5455/jabet.2023.d107).
 36. PORTER, Y. Antioxidant properties of green broccoli and purple-sprouting broccoli under different cooking conditions. *Bioscience Horizons* [interaktyvus]. Researchgate, 2012, Vol. 5 [žiūrėta 2025-05-20]. Prieiga per doi: [10.1093/biohorizons/hzs004](https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzs004).

37. NICOLESCU, A., BUNEA, C.I., MOCAN, A. Total flavonoid content revised: An overview of past, present, and future determinations in phytochemical analysis. *Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. Elsevier, 2025, Vol. 700, 115794 [žiūrėta 2025-05-20]. Prieiga per doi: [10.1016/j.ab.2025.115794](https://doi.org/10.1016/j.ab.2025.115794).
38. ISHIDA, M., NAGATA, M., OHARA, T., et al. Small variation of glucosinolate composition in Japanese cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.) requires simple quantitative analysis for breeding of glucosinolate component. *Breeding Science* [interaktyvus]. Researchgate, 2012, 62(1), pp. 63-70 [žiūrėta 2025-05-20]. Prieiga per doi: [10.1270/jsbbs.62.63](https://doi.org/10.1270/jsbbs.62.63).
39. BALOUCHI, Z., GHASEMNEZHAD, M., SAADATIAN, M., PEYVAST, G.A. Biochemical characteristic of florets senescence in broccoli cultivars during storage at low and high temperatures. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. 2014, Vol. 17, 1-11. ISSN 1505-0297.
40. VILLARREAL-GARCIA, D., JACOBO-VELAZQUEZ, D.A. Glucosinolates from broccoli: Nutraceutical properties and their purification. *Journal of Nutraceuticals and Food Science* [interaktyvus]. Imedpub, 2016, Vol. 1. 1-6 [žiūrėta 2025-05-15].

Publikacijų sąrašas

Darbo rezultatai buvo pristatyti mokslinėje konferencijoje:

1. Lukošūtė Paulina, Jonuškienė Ilona. Evaluation of phytochemicals and bioactivity in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) callus cultures *in vitro*. The 68th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences „Open Readings 2025“, May 13-16, 2025. Book of abstracts, pp. 411. Vilnius, Lietuva.

Priedai

1 priedas. Maitinamosios Murashige & Skoog (MS) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale mg/l	Koncentracija terpėje mg/l
Makroelementai ^b		
NH ₄ NO ₃	33000	1650
KNO ₃	38000	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai ^c		
KI	166	0,83
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis ^c		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai ^c		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Sacharozė		30000
Agar-agaras		5

b - 50 ml tirpalo pilame į terpę; c – 5 ml tirpalo į terpę.