



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas

**Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus  
kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktų fitocheminio,  
antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei  
palyginimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Emilija Žentelytė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Iona Jonuškienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2026**



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas

**Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus  
kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktų fitocheminio,  
antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei  
palyginimas**

Baigiamasis magistro projektas  
Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Emilija Žentelytė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Iona Jonuškienė**

Vadovė

**Doc. dr. Neringa Petrašauskienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2026**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Emilija Žentelytė

**Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų  
*in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktų fitocheminio, antioksidacinio  
ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei palyginimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektualinės 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.

Emilija Žentelytė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Žentelytė, Emilija. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ir augalo *in vivo* ekstraktų fitocheminio, antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas bei palyginimas. 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: vaistinė medetka, kaliaus kultūra, antriniai metabolitai, antioksidacinės savybės, antibakterinis savybės, *L*-triptofanas, melatoninas.

Kaunas, 2026. 52 p.

### Santrauka

Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.) yra vaistažolė, naudojama tradicinėje medicinoje gydyti įvairias akių, odos ar kitus organizmo sutrikimus. Šio augalo ekstraktuose galima aptikti įvairių biologiškai aktyviųjų junginių, kurie suteikia priešuždegiminių ir antiseptinių savybių. Dėl ekstremalių temperatūrų ir drėgmės pokyčių, taršos, augalai nevienodai kaupia metabolitus, kurie yra naudojami gamybos pramonėje. *In vitro* kaliaus kultūrų auginimas yra perspektyvi technologija, leidžianti įvertinti biologiškai aktyviųjų junginių sintezę kaliaus kultūrose ir gerinti jų kaupimąsi, naudojant skirtingus augimo reguliatorius įvairiomis koncentracijomis mitybinėje terpėje. Tyrimo tikslas buvo iširti vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) fitocheminį, antioksidacinį ir antibakterinį aktyvumą *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose.

Tyrimų metu buvo naudojama vaistinės medetkos lapų, stiebų ir šaknų kaliaus kultūros, augintos MS mitybinėje terpėje, papildytoje 0,5 mg/L tidiazuronu (TDZ), 0,1 mg/L 3-indolilacto rūgštimi (IAR), 0,5 mg/L *L*-triptofanu ir 0,5 mg/L melatoninu, bei *in vivo* lapai ir stiebai. Spektrofotometriškai buvo įvertinamos fitocheminių junginių koncentracijos ir antioksidacinis aktyvumas, kuriam buvo taikomi DPPH, ABTS, FRAP metodai bei matuojamos redukcines savybes. Antibakterinis aktyvumas įvertintas prieš *E.coli* ir *B.subtilis*, matuojant slopinimo zoną. Tyrimo rezultatai rodo, kad tam tikri augimo reguliatorių deriniai mitybinėje terpėje gali turėti įtakos kaliaus kultūrose esančių biologiškai aktyviųjų junginių sintezei. *In vivo* lapų ekstraktuose nustatytos didžiausios fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų, malondialdehido, chlorofilo *a* ir *b* koncentracijos. *In vitro* kaliaus kultūrų, augusių tik TDZ ir IAR fitohormonais papildytoje terpėje, ekstraktai atskleidė didesnes antocianinų koncentracijas, superoksido dismutazės aktyvumą ir redukcines savybes. Šaknų kaliaus kultūrų, augusių fitohormonais ir melatoninu (0,5 mg/L) papildytoje terpėje, ekstraktuose nustatyta didžiausia *L*-prolino koncentracija - 511,48 μmol/g. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas, pagal DPPH ir FRAP metodus, įvertintas šaknų kaliaus kultūrų, augusių terpėje su TDZ, IAR ir *L*-triptofanu (0,5 mg/), ekstraktuose. ABTS metodo tyrimo metu beveik visų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas siekė 99 %. Antibakteriniai tyrimai atskleidė reikšmingą *E.coli* ir *B.subtilis* aktyvumo slopinimą, kuomet buvo naudojami *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktai. Prieš *E.coli* didžiausia slopinimo zona nustatyta 1,57 cm, panaudojus lapų kaliaus kultūros, augusios MS terpėje su fitohormonais ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktus. Prieš *B.subtilis* didžiausiu slopinamuoju poveikiu pasižymėjo *in vivo* stiebų ekstraktai, tačiau reikšmingai slopino ir šaknų kaliaus kultūrų, augusių fitohormonais ir melatoninu (0,5 mg/L) papildytoje terpėje, ekstraktai.

Žentelytė, Emilija. Evaluation and Comparison of the Phytochemical, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Callus Cultures In Vitro* and Plant Extracts *In Vivo* of *Calendula Officinalis* L. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Field of study and area (group of study fields): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: pot marigold, callus culture, secondary metabolites, antioxidant properties, antibacterial properties, *L*-tryptophan, melatonin.

Kaunas, 2026. 52.

### Summary

*Calendula officinalis* L. is a medicinal herb, used in traditional medicine to treat various eye, skin and other health disorders. Various biologically active compounds can be found in the extracts of this plant, which provide anti-inflammatory and antiseptic properties. Due to extreme changes in temperature and humidity, pollution, plants accumulate metabolites, which are used in the manufacturing industry, unevenly. *In vitro* cultivation of callus cultures is a promising technology that allows to evaluate the synthesis of biologically active compounds in controlled environment and to improve their accumulation by using different growth regulators at various concentrations in the nutrient medium. The aim of the study was to investigate the phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of *Calendula officinalis* L. in *in vitro* callus cultures and *in vivo* extracts.

The studies used *in vitro* callus cultures of leaves, stems and roots of *Calendula officinalis*, grown in MS nutrient medium, supplemented with 0.5 mg/L thidiazuron (TDZ), 0.1 mg/L 3-indolylacetic acid (IAA), 0.5 mg/L *L*-tryptophan and 0.5 mg/L melatonin, as well as *in vivo* leaves and stems. The concentrations of phytochemical compounds and antioxidant activity were assessed spectrophotometrically, for which DPPH, ABTS, FRAP methods were applied and reducing properties were measured. Antibacterial activity was assessed against *E. coli* and *B. subtilis* by measuring the zone of inhibition. The results of the study show that certain combinations of growth regulators in the nutrient medium may affect the synthesis of biologically active compounds in callus cultures. The highest concentrations of phenolic compounds, phenolic acids, flavonoids, malondialdehyde, chlorophyll *a* and *b* were determined in *in vivo* leaf extracts. Extracts of *in vitro* callus cultures grown in medium supplemented with only TDZ and IAA phytohormones revealed higher anthocyanin concentrations, superoxide dismutase activity and reducing properties. Extracts of root callus cultures grown in medium supplemented with phytohormones and melatonin (0.5 mg/L) showed the highest *L*-proline concentration - 511.48 μmol/g. The highest antioxidant activity, according to DPPH and FRAP methods, was assessed in extracts of root callus cultures, grown in medium with TDZ, IAA and *L*-tryptophan (0.5 mg/). ABTS method study showed that the antioxidant activity of almost all extracts reached 99%. Antibacterial studies revealed significant inhibition of *E.coli* and *B.subtilis* activity when extracts of *in vitro* callus cultures were used. Against *E. coli*, the largest inhibition zone was determined to be 1.57 cm, using extracts from leaf callus cultures grown in MS medium with phytohormones and melatonin (0.5 mg/L). Against *B. subtilis*, the greatest inhibitory effect was observed using *in vivo* stem extracts, but extracts from root callus cultures grown in medium, supplemented with phytohormones and melatonin (0.5 mg/L), also had significant inhibition.

## Turinys

<b>Lentelių sąrašas</b> .....	<b>8</b>
<b>Paveikslų sąrašas</b> .....	<b>9</b>
<b>Santrumpų ir terminų sąrašas</b> .....	<b>10</b>
<b>Įvadas</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b> .....	<b>12</b>
1.1. Astrinių šeimos augalų ypatybės .....	12
1.1.1. Vaistinės medetkos (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) ypatybės .....	12
1.2. Kaliaus kultūra - biologiškai aktyviųjų junginių šaltinis.....	13
1.3. Augalų augimo hormonai ir reguliatoriai .....	13
1.3.1. <i>L</i> -triptofanas.....	14
1.3.2. Melatoninas .....	14
1.4. Biologiškai aktyvūs junginiai vaistinės medetkos <i>in vitro</i> ekstraktuose .....	15
1.4.1. Antioksidantai.....	15
1.4.2. Superoksido dismutazė .....	16
1.4.3. Karotinoidai .....	17
1.4.4. Redukuotas glutationas (GSH).....	17
1.4.5. Antocianinai.....	18
1.4.6. Fenoliniai junginiai .....	18
1.4.7. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas augaliniuose ekstraktuose .....	19
1.4.8. Antibakterinis aktyvumas .....	19
1.5. Vaistinės medetkos aktualumas pramonėje .....	20
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	21
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai</b> .....	<b>22</b>
2.1. Tyrimo objektas .....	22
2.2. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos nustatymas .....	22
2.3. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas.....	23
2.4. Flavonoidų koncentracijos nustatymas.....	23
2.5. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas .....	24
2.6. Redukuoto glutationo (GSH) nustatymas.....	24
2.7. <i>L</i> -prolino koncentracijos nustatymas.....	25
2.8. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas.....	26
2.9. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo nustatymas .....	26
2.10. Antioksidacinis aktyvumas pagal DPPH metodą .....	27
2.11. Antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą .....	28
2.12. Antioksidacinis aktyvumas pagal ABTS metodą .....	28
2.13. Baltymų koncentracijos nustatymas .....	29
2.14. Pigmentų (chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> ) koncentracijos nustatymas.....	30

2.15.	Antibakterinio aktyvumo nustatymas .....	30
<b>3.</b>	<b>Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas .....</b>	<b>31</b>
3.1.	Bendrujų fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas .....	31
3.2.	Bendrujų fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas .....	31
3.3.	Flavonoidų koncentracijos įvertinimas .....	32
3.4.	Bendrujų antocianinų koncentracijos įvertinimas .....	33
3.5.	<i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas .....	33
3.6.	Redukuoto glutationo (GSH) koncentracijos įvertinimas .....	34
3.7.	Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas .....	35
3.8.	Superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas .....	36
3.9.	Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu .....	37
3.10.	Antioksidacinis aktyvumas FRAP metodu .....	37
3.11.	Antioksidacinis aktyvumas ABTS metodu .....	38
3.12.	Redukcinių savybių įvertinimas .....	39
3.13.	Baltymų koncentracijos įvertinimas .....	39
3.14.	Chlorofilų <i>a</i> ir <i>b</i> koncentracijos įvertinimas .....	40
3.15.	Antibakterinio aktyvumo įvertinimas .....	42
<b>4.</b>	<b>Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>44</b>
	<b>Išvados .....</b>	<b>46</b>
	<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>47</b>

## Lentelių sąrašas

<b>2.1 lentelė.</b> Vaistinės medetkos <i>in vitro</i> auginimo terpės .....	22
<b>4.1 lentelė.</b> Aparatūrinėje schemoje naudojamų dalių sąrašas .....	45

## Paveikslų sąrašas

<b>1.1 pav.</b> Vaistinė medetka (lot. <i>Calendula officinalis</i> L.) [9] .....	12
<b>1.2 pav.</b> <i>L</i> -triptofanas [19] .....	14
<b>1.3 pav.</b> Melatoninas [27] .....	15
<b>2.1 pav.</b> Tanino rūgšties kalibracinė kreivė .....	22
<b>2.2 pav.</b> Kvercetino kalibracinė kreivė .....	24
<b>2.3 pav.</b> Redukuoto glutationo kalibracinė kreivė .....	25
<b>2.4 pav.</b> <i>L</i> -prolino kalibracinė kreivė .....	25
<b>2.5 pav.</b> Albumino kalibracinė kreivė .....	27
<b>2.6 pav.</b> Geležies sulfato kalibracinė kreivė .....	28
<b>2.7 pav.</b> Albumino kalibracinė kreivė .....	29
<b>3.1 pav.</b> Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas .....	31
<b>3.2 pav.</b> Bendrųjų fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas .....	32
<b>3.3 pav.</b> Flavonoidų koncentracijos įvertinimas .....	32
<b>3.4 pav.</b> Bendrųjų antocianinų koncentracijos įvertinimas .....	33
<b>3.5 pav.</b> <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas .....	34
<b>3.6 pav.</b> Redukuoto glutationo (GSH) koncentracijos įvertinimas .....	35
<b>3.7 pav.</b> Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas .....	36
<b>3.8 pav.</b> Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas .....	36
<b>3.9 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu .....	37
<b>3.10 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu .....	38
<b>3.11 pav.</b> Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu .....	38
<b>3.12 pav.</b> Redukcinių savybių įvertinimas .....	39
<b>3.13 pav.</b> Baltymų koncentracijos įvertinimas .....	40
<b>3.14 pav.</b> Chlorofilo <i>a</i> koncentracijos įvertinimas .....	41
<b>3.15 pav.</b> Chlorofilo <i>b</i> koncentracijos įvertinimas .....	41
<b>3.17 pav.</b> Antibakterinio aktyvumo prieš <i>E. coli</i> ir <i>B. subtilis</i> įvertinimas .....	42
<b>3.18 pav.</b> Lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš <i>E. coli</i> .....	43
<b>3.19 pav.</b> Šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš <i>B. subtilis</i> .....	43
<b>4.1 pav.</b> <i>L</i> -prolino gavimo iš <i>Calendula officinalis</i> L. kaliaus kultūrų aparatūrinė schema .....	44

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonrūgšties) dinatrio druska;

BHA – butilintas hidroksianizolis;

BHT – butilintas hidroksitoluenas;

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

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia;

GSH – redukuotas glutationas;

IAR – 3-indolilacto rūgštis;

MDA – malondialdehidas;

MS – *Murashige* ir *Skoog* terpė;

NADP– nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;

NADPH – redukuota nikotinamido adenino dinukleotido fosfato forma;

O.v. – optiniai vienetai.

ROS – reaktyvieji deguonies radikalai;

SOD – superoksido dismutazė;

TDZ – tidiazuronas.

## Įvadas

Augalai medicinos ir maisto pramonėje visada buvo laikomi svarbiais. Pagal Pasaulio sveikatos organizaciją (angl. *World Health Organization*), daugiau kaip 80 % pasaulio populiacijos vis dar pasitiki tradicine medicina – augalinėmis gydymosi priemonėmis [1]. Viena iš dažnai naudojamų vaistažolių yra vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.), priklausanti astrinių šeimai. Medetkos žiedų, lapų ar stiebų ekstraktai naudojami kaip natūrali gydymosi priemonė ir yra įvairių kosmetikos gaminių sudėtyje [2]. 2025 metais vaistinė medetka buvo išrinkta Lietuvos vaistiniu augalu. Medetka pasižymi priešuždegiminėmis, antioksidacinėmis, antibakterinėmis savybėmis [3]. Jos ekstraktuose yra daug vertingų antrinių metabolitų, kurie lemia medetkos ekstraktų veiksmingumą gydymo metu.

Augalų biotechnologijos metodais, panaudojant ir modifikuojant augalų ląsteles ar audinius, galima išgauti norimus kiekius biologiškai aktyviųjų medžiagų. Vienas iš metodų yra kaliaus kultūrų auginimas. Augalo skirtingos dalys, tokie kaip lapai ar stiebai, steriliomis sąlygomis yra auginamos iki kol susiformuoja kaliaus kultūra – nediferencijuotų ląstelių masė. Šiai *in vitro* technologijai būdingi dideli privalumai: antrinių metabolitų kaupimas, spartus dauginimas, poliploidų gavimas ir genetinės transformacijos galimybės [4]. Pavyzdžiui, 2024 metais atliktas *in vitro* tyrimas su *Acacia modesta* pumpurų kaliaus kultūromis atskleidė didesnius fenolių, flavanoidų kiekius bei stipresnes antibakterines ir antioksidacines savybes, lyginant su tiriamojo augalo *in vivo* ekstraktais [5].

Mitybinė terpė, kurioje kultivuojamos kaliaus kultūros, yra papildoma įvairiais augimo hormonais, siekiant užtikrinti efektyvų ir greitą kaliaus kultūros ląstelių dalijimąsi. Šiuo metu didėja susidomėjimas melatoninu ir *L*-triptofanu, kaip mitybinės terpės egzogeniniais priedais. Nors mokslinėje literatūroje aprašomas jų individualus poveikis *in vitro* technologijose, vis dar trūksta tyrimų, įvertinančių jų tarpusavio sąveiką ir suderintą poveikį antrinių metabolitų sintezei kaliaus kultūrose.

**Darbo tikslas** – ištirti vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų *in vitro* ir tiriamojo augalo *in vivo* ekstraktų fitochemines, antioksidacines ir antibakterines savybes.

### Darbo uždaviniai:

1. nustatyti bendrųjų fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų, antocianinų, *L*-prolino, redukuoto glutationo, malondialdehido koncentracijas ir superoksido dismutazės aktyvumą vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktuose;
2. nustatyti vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą DPPH, FRAP, ABTS ir redukciniiais metodais;
3. nustatyti baltymų, karotinoidų, chlorofilų *a* ir *b* koncentracijas vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktuose;
4. nustatyti vaistinės medetkos kaliaus kultūrų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktų antibakterinį aktyvumą prieš *Bacillus subtilis* ir *Escherichia coli* bakterijas.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Astrinių šeimos augalų ypatybės

Astrinių šeimai (lot. *Astericeae*) priklauso daugiau nei trisdešimt du tūkstančiai augalų rūšių, kurių dauguma yra žinomos kaip vaistažolės, naudojamos gydyti įvairius sveikatos sutrikimus. Šiai šeimai priklauso daug žinomų genčių, tokių kaip medetka (lot. *Calendula*), kiaulpienė (lot. *Taraxacum*), ežiuolė (lot. *Echinacea*) ir kraujažolė (lot. *Achillea*). Astrinių šeimos vaistažolės pasižymi priešuždegiminėmis, antibakterinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis, todėl mokslininkai tiria jų ekstraktus, siekdami nustatyti biologiškai aktyvius junginius ir pritaikyti juos vaistų, funkcinių maisto produktų ar kosmetikos gamyboje [1,6].

Astrinių šeimai priklausantys augalai yra plačiai randami įvairiose ekologinėse buveinėse – miškuose, aukštikalnių pievose ir miestų žaliosiose erdvėse, rečiau aptinkami tropikuose [1]. Pagrindinis šios šeimos skiriamasis bruožas yra graižas – žiedynas, sudarytas iš daugybės tankiai susitelkusių bekočių žiedų. Žiedyną juosia skraistalapiai, sudarantys apsauginę skraistę [7]. Manoma, kad ši šeima kilo pietinėje Pietų Amerikos dalyje, iš kurios viduriniojo eoceno epochos metu išplito į Aziją ir Afriką, per Šiaurės Ameriką. Eoceno pabaigoje prasidėjo intensyviausias šeimos plitimo ir įvairovės didėjimo etapas, kuomet iš Afrikos ji pasiekė beveik visus žemynus, išskyrus Antarktidą. Šiaurės Amerikoje susiformavo dauguma šiandien egzistuojančių genčių [8].

#### 1.1.1. Vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) ypatybės

Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.) yra vaistažolė, pasižyminti ryškiais oranžinės spalvos žiedais bei aromatingu kvapu (1.1 pav.). Šis augalas natūraliai auga centrinėje ir pietinėje Europoje, rytų Azijoje bei Jungtinėse Amerikos valstijose [2].



1.1 pav. Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.) [9]

Gydymui vaistinė medetka yra naudojama nuo XIII amžiaus. Kremai ir kompresai su šio augalo ekstraktu buvo naudojami gydyti žaizdoms, nudegimams ar kitoms odos problemoms [10]. Senovės medicinoje medetka buvo laikoma gydomuoju augalu, kadangi pasižymėjo priešuždegiminėmis, antiseptinėmis, skausmą malšinančiomis savybėmis ir galėjo būti naudojama siekiant pagerinti sveikatą bei pablogėjusią

organizmo būklę. *C. officinalis* ekstraktų gėrimai naudojami burnai skalauti, akis plauti, odos bėrimams mažinti ar konjunktyvitui gydyti [6].

Vaistinės medetkos ekstraktuose nustatyta daug biologiškai aktyviųjų junginių, kurie yra atsakingi už gydomąsias savybes ir gali būti naudojami naujų produktų gamyboje. Atlikti fitocheminiai tyrimai atskleidžia terpenoidų, flavonoidų, kvininų, karotinoidų ir aminorūgščių buvimą [2]. Augalų audinių kultūrų gebėjimas sintetinti ir kaupti tuos pačius biologiškai vertingus cheminius junginius kaip ir natūraliomis sąlygomis augančių augalų, buvo nustatytas atsiradus *in vitro* technologijoms. Kai kuriais atvejais nustatyta, kad tam tikrų antrinių metabolitų koncentracija kaliaus kultūrose gali būti didesnė, nei tos pačios augalų rūšies, augusios natūraliomis sąlygomis [11].

## **1.2. Kaliaus kultūra – biologiškai aktyviųjų junginių šaltinis**

Kaliaus kultūra yra auginama iš įvairių augalo dalių - šaknų, lapų, stiebų ar žiedų. Augalo audinio eksplantai steriliomis sąlygomis auginami *in vitro* terpėje, papildytoje augimo hormonais. Palaipsniui augdami jie formuoja nediferencijuotą ląstelių masę – kaliaus kultūrą. Kaliaus kultūros gali būti naudojamos tvariai ir didelės apimties antrinių metabolitų gamybai farmacijos, kosmetikos ir maisto pramonėje. Vaistinių augalų kaliaus kultūros pasižymi biologiškai aktyviomis medžiagomis, kurios gali būti naudojamos įvairioms ligoms gydyti [12].

Verta paminėti, kad kaliaus kultūrų ląstelės geba diferencijuotis ir išaugti į augalą. Vadinasi šią technologiją galima naudoti mikrodauginimui – identišku augalų kopijų su pageidaujamomis savybėmis gauti. Be to, kaliaus kultūrų taikymas pramonėje ir moksliniuose tyrimuose prisideda prie retų ar į Raudonąją knygą įtrauktų augalų rūšių apsaugos, nes biologiškai aktyviųjų junginių gamyba gali būti vykdoma kontroliuojamomis *in vitro* sąlygomis, neeksploatuojant natūralių augaviečių [12]. Pavyzdžiui, didėjanti rozmarino rūgšties paklausa lėmė masinį *Zataria multiflora* rinkimą iš natūralių buveinių ir šios rūšies populiacijos sumažėjimą. Atsižvelgiant į tai, *in vitro* technologijos, tokios kaip kaliaus kultūros, laikomos perspektyvia alternatyva ne tik augalų genetiniams ištekliams išsaugoti ar galimoms natūralioms buveinėms atkurti, bet ir tvariai bei ekonomiškai efektyviai antrinių metabolitų gamybai [13].

## **1.3. Augalų augimo hormonai ir reguliatoriai**

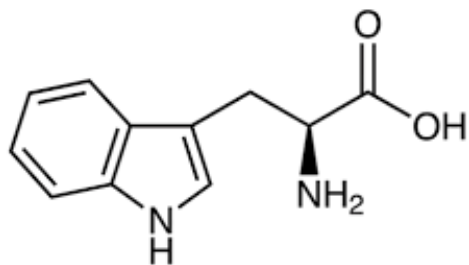
Vaistažolių reikšmingumą lemia jų cheminė sudėtis, ypač antrinių metabolitų koncentracija. Šių junginių sintezė ir kaupimasis augaluose priklauso nuo įvairių aplinkos veiksnių, kurie gali tiek skatinti, tiek slopinti jų gamybą. Augimo reguliatoriai yra junginių grupė, apimanti natūralius ir sintetinius junginius, kurie veikia augalo augimą. Jų taikymas augalų kaliaus kultūrų kultivavime yra itin svarbus siekiant padidinti biologiškai aktyviųjų junginių koncentraciją ar paskatinti augimą [14].

Antrinių metabolitų sintezė kaliaus kultūrose dažnai yra labai maža, todėl mitybinė terpė turi būti atitinkamai papildyta augimo hormonais – auksiniais, citokininiais ir gibereliniais [12]. Auksinai ir citokininai skatina ląstelių ilgėjimą ir dalijimąsi, dėl to dažniausiai yra naudojami kartu mitybinėje terpėje [14,15]. Giberelinų grupei priklauso daugiau nei šimtas junginių, kurie skatina stiebų ir ūglių augimą bei ramybės būsenos nutraukimą. Dažniausiai augalų audinių kultūrose naudojama giberelino rūgštis [15]. Tiazuronas (TDZ) yra sintetinis augimo reguliatorius, pasižymintis citokininams artimu

aktyvumu – skatina ląstelių dalijimąsi, kaliaus kultūrų formavimąsi [16]. Augimo reguliatoriai reguliuoja metabolinius kelius, atsakingus už antrinių metabolitų sintezę [14]. Fitohormonų koncentracija yra pagrindinis veiksnys, lemiantis antrinių metabolitų kaupimąsi *in vitro* kultūrose.

### 1.3.1. L-triptofanas

L-triptofanas (1.2 pav.) yra aromatinė aminorūgštis, kuri baltymų sintezės metu įsijungia į baltymų struktūrą ir dalyvauja augalų metabolizme. Šis junginys sudaro struktūrinį pagrindą daugumai antrinių metabolitų, įskaitant auksinus, alkaloidus, gliukozinolatus, indolaminus [17]. Ši aminorūgštis naudojama žemės ūkyje gerinti pasėlių augimą. Kai kurioms žemės ūkio kultūroms, tokioms kaip kviečiai, morkos ar pomidorai, naudingiau įsisavinti azotą iš aminorūgščių, negu iš nitratų, amonio jonų ar biologiškai fiksuoto azoto. Tokiu būdu augalas sunaudoja mažiau energijos. Taip pat, purškiant pasėlius L-triptofanu, didinamas fotosintezės efektyvumas, ląstelių gebėjimas įsisavinti vandenį ir maistines medžiagas iš dirvožemio, teigiamai veikiant derlių [18].

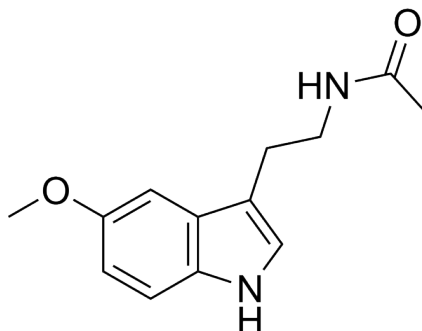


1.2 pav. L-triptofanas [19]

*In vitro* biotechnologijose L-triptofanas veikia kaip kaliaus kultūrų augimą skatinanti medžiaga. Atliktame tyrime, kai kaliaus kultūroms mitybinėje terpėje trūko cinko, nustatyta, kad egzogeninis triptofanas veikė kaip augimą skatinanti medžiaga. Kada cinkas buvo pašalintas iš mitybinės terpės, kaliaus kultūrų šviežios masės prieaugis ir auksino aktyvumas smarkiai sumažėjo. Terpės papildymas L-triptofanu atstatė ląstelių augimą, nurodant, kad ši aminorūgštis gali iš dalies kompensuoti auksino trūkumą [20]. Skirtingos aminorūgštys, kaip egzogeniniai priedai mitybinėje terpėje, gali turėti skirtingą poveikį kaliaus kultūros biomasei ir antrinių metabolitų gamybai [21].

### 1.3.2. Melatoninas

Melatoninas (1.3 pav.) yra natūraliai augaluose randamas augimo reguliatorius, reguliuojantis augalų cirkadinį ritmą, *in vitro* morfogenezę, dalyvaujantis reaktyviųjų deguonies ir hidroksilo radikalų skaidyme [22,23]. Pirmą kartą melatoninas, kaip natūralus junginys, buvo rastas žinduoliuose. Jo biosintezė, tiek augaluose, tiek gyvūnuose prasideda nuo triptofano, kurio prieinamumas lemia, ar metabolizmo metu bus gaminamas melatoninas, ar serotoninas [24]. Melatoninas veikia kaip antioksidantas bei signalinė molekulė, kuri esanti kaliaus kultūros mitybinėje terpėje gali labai pagerinti kaliaus formavimąsi ir augimą [25,26].



1.3 pav. Melatoninas [27]

Atliktuose tyrimuose su augalais yra nustatyta teigiama melatonino įtaka, didinant augalo atsparumą patiriamam stresui nuo sausros, aukštų temperatūrų, radiacijos ir cheminio užterštumo [23]. Taip pat pastebėtas teigiamas poveikis antrinių metabolitų sintezei. Tyrimuose su baziliko lapų kaliaus kultūromis, užaugintomis mitybinėje terpėje su melatoninu, buvo nustatytos didesnės fenolinių junginių ir rozmarino rūgšties koncentracijos [28]. Paminėtina, kad sėjamosios pipirnės (lot. *Lepidium sativum* L.) kaliaus kultūros pasižymėjo didesne polifenolinių junginių koncentracija, reiškiančia didesnę antioksidacinę aktyvumą [22]. Skatinamasis melatonino poveikis yra siejamas su jo gebėjimu skaidyti reaktyviasias deguonies ir azoto formas, stimuliuoti augsino sintezę ir reguliuoti antioksidantinių fermentų aktyvumą [25].

#### 1.4. Biologiškai aktyvieji junginiai vaistinės medetkos *in vitro* ekstraktuose

Augalų kaliaus kultūrų gebėjimas sintetinti ir kaupti tuos pačius biologiškai vertingus junginius, kaip ir natūraliomis sąlygomis augantys augalai, buvo įvertintas atsiradus *in vitro* technologijoms. Kai kuriais atvejais nustatyta, kad tam tiktų antrinių metabolitų koncentracija kaliaus kultūrų ekstraktuose gali būti didesnė, nei tos pačios augalų rūšies, augusios natūraliomis sąlygomis [11].

##### 1.4.1. Antioksidantai

Deguonis yra svarbiausias elementas, palaikantis aerobinių organizmų gyvybę Žemėje. Vis dėlto, mažoji jo dalis atmosferoje virsta reaktyviaisiais deguonies radikalais, kurie, dėl jiems būdingo didelio reaktyvumo ir nestabilumo, sukelia žalą visiems organizmams [29]. Laisvaisiais radikalais yra laikomi atomai, molekulės ar jonai, turintys laisvą elektroną. Jie gali susidaryti iš deguonies, azoto arba sieros. Reaktyviosios deguonies formos (ROS), tokios kaip superoksidas, hidroksilo, peroksilo, alkoksilo radikalai ir azoto oksidas, kilusios iš deguonies laisvųjų radikalų, yra labai reaktyvios ir pažeidžiančios netoliese esančių ląstelių molekules [30].

Natūralūs antioksidantai apsaugo organizmą nuo širdies ir kraujagyslių ligų ar vėžinių susirgimų. Daugiausiai antioksidantų yra nustatoma vaisiuose, daržovėse, sėklų aliejuose, vaistažolėse, prieskoniuose ar įvairiuose gėrimuose (arbata, kava, raudonasis vynuogų sultys, alus). Sintetiniai antioksidantai yra dažnai naudojami kosmetikos bei medicinos pramonėje dėl didesnio ir stabilesnio aktyvumo bei žemos kainos [31]. Butilintas hidroksitoluenas (BHT) ir butilintas hidroksianizolis (BHA) yra sintetiniai

antioksidantai, dažnai naudojami maisto produktuose, siekiant pailginti galiojimo laiką. Tačiau manoma, kad šios medžiagos gali daryti žalą sveikatai [32]. Didėjant susirūpinimui dėl sintetinių junginių neigiamo poveikio organizmui, auga visuomenės susidomėjimas natūraliais biologiškai aktyviais junginiais ir jų panaudojimu maisto, farmacijos ar kosmetikos pramonėje [31].

Stresą audinių kultūrose sukelia *in vitro* auginimo sąlygos, tokios kaip augimo hormonų ar reguliatorių koncentracijos, šviesos intensyvumas, drėgmė bei aeracija. Dėl to kaliaus kultūros dažnai aktyvuoja fiziologinius procesus, lemiančius reaktyviųjų deguonies formų susidarymą ir antrinių metabolitų sintezę [4]. Vienas iš patiriamo streso augalo ląstelėse požymių yra padidėjusi malondialdehido (MDA) koncentracija, lemianti suintensyvėjusią lipidų peroksidaciją [26,33]. Tyrimai, kuriuose į mitybinę terpę buvo įterptas melatoninas, atskleidė ryškų jo antioksidacinį poveikį *Saussurea orgaadayi* L. kaliaus kultūrų ekstraktuose, kuomet reikšmingai sumažėjo lipidų peroksidacijos intensyvumas, įvertintas pagal MDA koncentraciją, ir padidėjo *L*-prolino koncentracija [34]. Prolinas augaluose reguliuoja osmosinę pusiausvyrą ir padeda stabilizuoti tarpląstelines struktūras, tokias kaip membranos ir baltymai. Taip pat jis padeda neutralizuoti laisvuosius radikalus ir reguliuoti NADP/NADPH santykį, kuris yra būtinas optimaliai medžiagų apykaitai palaikyti [35]. 2004 metais buvo atliktas vaistinės medetkos ekstrakto antioksidacinio aktyvumo *in vitro* tyrimas. Nustatyta, kad ekstraktai geba neutralizuoti superoksido ir hidroksilo radikalus, slopinti lipidų peroksidaciją. Taip pat, ekstraktas efektyviai neutralizavo ABTS ir DPPH radikalus [36].

Antioksidantai pagal poveikį yra skirstomi į du tipus – fermentinius ir nefermentinius. Fermentiniai antioksidantai dalyvauja reaktyviųjų deguonies formų šalinime, versdami vandenilio peroksidą ( $H_2O_2$ ) vandeniu. Nefermentiniai antioksidantai yra mažos molekulės, kurios atiduodamos elektroną arba vandenilio atomą, stabdo oksidacines grandininės reakcijas, taip slopindamos  $H_2O_2$  vartimą reaktyviaisiais radikalais [37]. Ji skirstoma į dvi pagrindines grupes - vandenyje netirpius antioksidantus (tokoferoliai ir karotinoidai) ir vandenyje tirpius antioksidantus, tarp kurių yra glutationas (GSH) ir įvairūs fenoliniai junginiai. Šie antioksidantai veikia skirtingose ląstelės organelėse ir tarpusavyje sąveikaudami sudaro integruotą apsauginę sistemą, palaikančia ląstelės redokso pusiausvyrą ir ribojančia reaktyviųjų deguonies formų kaupimąsi [35].

#### 1.4.2. Superoksido dismutazė

Superoksido dismutazė (SOD) katalizuoja superoksido radikalų ( $O_2^-$ ) disociaciją į deguonį ( $O_2$ ) ir vandenilio peroksidą ( $H_2O_2$ ) [38]. Šis fermentas yra oligomerinis baltymas, kurio katalitinei veiklai būtini metalo kofaktoriai, tokie kaip manganas, geležis, varis ir cinkas. Šių metalų buvimas lemia SOD gebėjimą efektyviai dalyvauti ląstelės antioksidacinės gynybos sistemoje [35]. Augaluose aptinkamos trys superoksido dismutazės izoformos, kurios skiriasi prisijungusiu metalo kofaktoriumi ir vieta ląstelėje. Manganą turinti SOD (Mn-SOD) aptinkama mitochondrijose – pagrindinėje ląstelės energijos gamybos vietoje. Mn-SOD naudoja mangano jonus, kaip kofaktorius, ir yra būtina mitochondrijų apsaugai nuo oksidacinio streso [35]. Vario ir cinko SOD (Cu/Zn-SOD) randama citozolyje ir chloroplastuose, kur saugo tiek fotosintetinius organoidus, tiek citoplazmą nuo oksidacinio streso. Geležį turinti SOD (Fe-SOD) randama tik chloroplastuose. Ši izoforma pasižymi tetradentine struktūra – geležies jonas fermento aktyviojoje vietoje yra koordinuojamas trijų histidino ir vienos aspartato aminorūgščių liekanų, kurios stabilizuoja metalo joną ir užtikrina katalitinį aktyvumą [35,38].

*In vitro* sąlygomis augančios augalo ląstelės patiria stresą, dėl to padidėja reaktyviųjų deguonies formų. Atliktame tyrime su azijinio krino kaliaus kultūromis, buvo nustatyta padidėjusi superoksido dismutazės koncentracija, žyminti patiriantį oksidacinį stresą [39]. Panašūs rezultatai nustatyti ir tyrime su sėjamosios pipirmės kaliaus kultūra, auginta melatoninu papildytoje terpėje, kuomet padidėjęs superoksido dismutazės aktyvumas siejamas su melatonino gebėjimu stiprinti antioksidacinę apsaugą [22].

### **1.4.3. Karotinoidai**

Karotinoidai yra lipofiliniai junginiai, kaupiami augalų plastidžių membranose ir veikiantys kaip antioksidantai. Karotinoidų grupei priklausantis  $\beta$ -karotinas, likopenas ir luteinas skaido peroksilo ir hidroksilo radikalus, mažindami lipidų peroksidaciją. Jų antioksidacinės savybės yra siejamos su perteklinės šviesos energijos vertimu į šilumą, išvengiant reaktyviųjų deguonies radikalų kaupimo [35].

Kaliaus kultūrose, kurioms būdinga chloroplastų stoka, karotinoidai atlieka svarbų vaidmenį mažindami oksidacinį stresą. Pavyzdžiui, pomidoro (lot. *Lycopersicon esculentum* L.) kaliaus kultūros ekstraktuose buvo nustatytas karotino likopeno, pasižyminčiu intensyviu laisvųjų radikalų neutralizavimu, kaupimasis [40]. Taip pat tyrimai su stresą patiriančiomis kaliaus kultūromis, pavyzdžiui, melatoninu apdorotomis *Salvia* genties augalų kaliaus kultūromis, parodė padidėjusį karotinoidų kiekį, kuris koreliavo su sustiprėjusia reaktyviųjų deguonies formų detoksikacija [35].

### **1.4.4. Redukuotas glutationas (GSH)**

Redukuotas glutationas (GSH) yra tripeptidas, susidarantis iš glutamino, cisteino ir glicino. Šis antioksidantas atlieka esminį vaidmenį mažinant reaktyviųjų deguonies formų (ROS) kiekį, pažeistų baltymų atstatyme ir streso signalinių kelių reguliavime [35]. Augalui patiriant stresą, GSH koncentracija padidėja, patvirtindamas atliekamą apsauginę funkciją. Jis taip pat padeda atkurti kitų antioksidantų, tokių kaip askorbato, sintezę [41]. Glutationas augalų ląstelėse daugiausiai aptinkamas redukuota forma, o didžiausia jo koncentracija nustatoma chloroplastuose [35].

Be ROS neutralizavimo, glutationas didina augalų atsparumą įvairiems aplinkos veiksniams, keliantiems stresą, ir dalyvauja fermentinių peptidų, kurie yra svarbūs sunkiųjų metalų detoksikacijos procese, sintezėje. GSH reikšmingai prisideda prie augalų augimo ir vystymosi reguliavimo, veikdamas tokius procesus kaip ląstelių dalijimąsi, diferenciaciją ir apoptozę. Be to, redukuotas glutationas reguliuoja pagrindinius signalinius kelius, darančius įtaką genų raiškai ir hormoniniams atsakams, įskaitant mutagenų aktyvuojamas baltymų kinazes bei transkripcijos veiksnius [41].

Augalų kaliaus kultūrose, kurioms būdingas intensyvus ląstelių dauginimas ir padidėjęs oksidacinis stresas, padidėjęs GSH kiekis palaiko nuo glutationo priklausomų fermentų, tokių kaip glutationo-S-transferazės (GST) ir glutationo peroksidazės (GPX), aktyvumą. Šie fermentai saugo ląsteles nuo lipidų peroksidacijos ir baltymų karbonilinimo. Pavyzdžiui, tabako kaliaus kultūrose, pasižyminčiose padidėjusiu glutationo aktyvumu, buvo nustatytas reikšmingai geresnis atsparumas didelio druskingumo sukeltam stresui [41].

### 1.4.5. Antocianinai

Antocianinai yra vandenyje tirpūs antioksidantai, suteikiantys vaisiams, daržovėms ir augalų žiedams raudonai mėlynus atspalvius [42]. Šie junginiai pasižymi įvairiomis sveikatai naudingomis savybėmis: veikia kaip antioksidantai, turi priešvėžinį, antidiabetinį, antibakterinį poveikį. Dėl šių savybių antocianinai, išskirti iš augalų, yra naudojami ir tiriami farmacijos srityje. Be to, antocianinai yra natūralūs pigmentai, daugiausiai naudojami kaip natūralūs dažikliai, suteikiantys oranžinę, rožinę, raudoną, mėlyną spalvą įvairiose augalo dalyse [43]. Vis dėlto pramonėje jų panaudojimą riboja nestabilumas, kuriam daro įtaką pH, temperatūra, šviesa, sąveika su kitomis maisto sudedamosiomis dalimis, todėl sudėtinga užtikrinti kokybišką antocianinų panaudojimą [44].

Antocianinai pasižymi 15 anglies atomų struktūra, sudaryta iš dviejų fenilo žiedų, sujungtų trimis anglies atomais. Šių junginių antioksidacinis poveikis atsiranda per vandenilio atomo arba elektrono perdavimo mechanizmus, kurie leidžia vienu metu neutralizuoti laisvuosius radikalus, tokius kaip DPPH, ABTS ir peroksilo radikalus [42].

### 1.4.6. Fenoliniai junginiai

Fenoliniai junginiai struktūroje turi vieną ar daugiau aromatinių žiedų ir bent vieną hidroksilo grupę. Šiuo metu yra žinomi daugiau nei 8000 skirtingų junginių struktūrų. Augaluose fenoliniai junginiai atlieka svarbų vaidmenį tiek spalvos suteikime, tiek jų apsaugoje [45]. Augalinės kilmės maisto produktai ir gėrimai pasižymi didele šių junginių koncentracija, kuri daro reikšmingą įtaką skoniui. Sąveikaudami su seilių glikoproteinais, fenoliniai junginiai sukuria kartumo pojūtį, ypač būdingą vynui ar kai kuriems vaisiams [45,46]. Polifenolius galima aptikti vaisiuose, daržovėse, grūduose, arbatoje, kavoje bei vyne [46]. Tai taip pat yra metabolitai, gebantys neutralizuoti laisvuosius radikalus ir apsaugoti augalų ląsteles nuo žalos [33]. Didelis antioksidacinis šių junginių aktyvumas yra siejamas su kaimyninių hidroksilo grupių vandenilio atomais, esančiais skirtingose A, B ir C žiedų padėtyse. Taip pat, antioksidacinį poveikį stiprina benzeno žiedo dvigubieji ryšiai [45]. Pagrindinės polifenolių grupės yra fenolinės rūgštys, flavonoidai, stilbenai ir lignanai.

Fenolinės rūgštys pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis ir gebėjimu mažinti reaktyviųjų deguonies formų žalingą poveikį [35]. Tai yra viena iš pagrindinių fenolinių junginių grupių, aptinkamų augalų sėklose ir lapuose [45]. Fenolinės rūgštys prisideda prie fermentų aktyvumo reguliavimo, maistinių medžiagų įsisavinimo, baltymų sintezės ir fotosintezės. Pasižymi priešvėžinėmis, antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis, antimikrobinėmis savybėmis, dėl kurių gali būti naudojami kosmetikos priemonių ir maisto produktų gamyboje kaip natūralūs konservantai [47].

Flavonoidai yra antriniai metabolitai, kaupiami augalo ląstelių vakuolėse. Jie atlieka svarbias funkcijas augale, reguliuodami hormonų transportavimą ir reaktyviųjų deguonies radikalų kiekį [21]. Atliktame tyrime su juodųjų kmynų kaliaus kultūromis, flavonoidų koncentracija buvo mažesnis, lyginant su *in vivo* sąlygomis augusiais lapais. Tai gali būti siejama su *in vitro* maitinamosios terpės sudėtimi [48]. Pavyzdžiui, moksliniame tyrime su skirtingomis egzogeninio *L*-triptofano koncentracijomis mitybinėje terpėje (0–2,0 mg/L) buvo nustatyta tolygiai mažėjanti flavonoidų koncentracija burnočio (lot. *amaranthus*) kaliaus kultūrų ekstraktuose, didėjant *L*-triptofano koncentracijai [21].

#### 1.4.7. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas augaliniuose ekstraktuose

ABTS, FRAP ir DPPH yra dažniausiai taikomi cheminiai metodai antioksidaciniam aktyvumui įvertinti [49]. DPPH ir ABTS metodai yra laikomi vieni populiariausių antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodų dėl jų paprastumo, trumpos analizės trukmės. Abejais metodais antioksidacinis aktyvumas nustatomas vertinant DPPH ir ABTS radikalų neutralizavimą, jiems reaguojant su tiriamu antioksidantu. Kuo didesnis šviesos sugerties sumažėjimas, tuo didesnis tiriamo ekstrakto antioksidacinis aktyvumas [50].

2,2-Difenil-1-pikilhidrazilo (DPPH) tyrimas matuoja antioksidacinį aktyvumą, pagrįstą antioksidantų gebėjimu atiduoti vandenilio atomus arba elektronus stabiliam laisvajam radikalui. DPPH yra tamsiai violetinis radikalas, kuris sugeria šviesą maždaug 517 nm bangos ilgyje. Pridėjus antioksidacinį junginį, jis redukuoja DPPH radikalą iki DPPH-H, todėl spalva pasikeičia iš violetinės į šviesiai geltoną. Spektrofotometru matuojamas absorbcijos sumažėjimas yra proporcingas atiduotų elektronų arba vandenilio atomų skaičiui, todėl galima kiekybiškai įvertinti antioksidacinį aktyvumą [50,51].

2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfono) rūgšties dinatrio druskos (ABTS) tyrimas veikia susidarant ABTS radikaliniam katijonui (ABTS<sup>•+</sup>), kuris yra melsvai žalias chromoforas. Radikalo katijonas susidaro oksiduojant ABTS kalio persulfatu prieš pradedant tyrimą. Pridėjus antioksidantų, jie atiduoda elektronus ABTS<sup>•+</sup> radikalui, paversdami jį į bespalvę neutralią formą. Absorbcijos sumažėjimas po inkubacijos rodo antioksidanto gebėjimą neutralizuoti radikalus, o didesnis spalvos praradimas atitinka stipresnį antioksidacinį aktyvumą [50,52].

FRAP tyrimas veikia kitokiu principu. Jis nustato antioksidantų gebėjimą redukuoti Fe<sup>3+</sup> jonus iki Fe<sup>2+</sup>, sudarant spalvos pokytį, kuris matuojamas spektrofotometriškai [53]. Tai yra greitas, pigus ir tikslus metodas, dažniausiai naudojamas maisto produktų, gėrimų ir maisto papildų, kurių sudėtyje yra polifenolių, antioksidacinėms savybėms įvertinti. Tyrime kaip oksidatorius naudojamas geležies-tripiridiltriazino (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) kompleksas esant žemam pH. Mėginyje esantys antioksidantai atiduoda elektronus, kad redukuotų geležies (Fe<sup>3+</sup>) kompleksą iki geležies formos (Fe<sup>2+</sup>), kuri sukuria intensyvią mėlyną spalvą, sugeriančią šviesą 540-600 nm bangos ilgiuose. Mėlynos spalvos intensyvumo padidėjimas yra tiesiogiai proporcingas antioksidanto koncentracijai [54].

#### 1.4.8. Antibakterinis aktyvumas

Didėjantis žmonių patogenų atsparumas įprastiems antibiotikams skatina ieškoti alternatyvių antibakterinių junginių. Nors dauguma augalų yra ištirti dėl galimų antibakterinių savybių, didelė jų dalis vis dar nėra detalai įvertinti. Dėl šios priežasties vis daugiau mokslinių tyrimų orientuojasi į augalų ekstraktų, kaip galimų antibakterinių medžiagų, analizę. Mokslininkų atlikti *in vitro* tyrimai atskleidžia galimas kaliaus kultūrų ekstraktų perspektyvas. Tirtų *C. asiatica* lapų kaliaus ekstraktų antibakterinis aktyvumas pasižymėjo reikšmingu bakterijų augimo slopinimu. Nors didžiausias antibakterinis aktyvumas nustatytas *in vivo* lapų ekstraktuose prieš *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* ir *S. aureus*, panašus poveikis buvo gautas ir *in vitro* išaugintų kaliaus kultūrų ekstraktuose [5]. Atlikto tyrimo su vaistine medetka rezultatai atskleidė, kad visi medetkos skilčialapių kaliaus kultūrų ekstraktai pasižymėjo didesniu antibakteriniu aktyvumu prieš gramteigiamas nei prieš gramneigiamas bakterijas [55].

Augalinės kilmės antibakterinės medžiagos yra tiriamos dėl jų veiksmingumo ir potencialaus pritaikymo pramonėje. Šiems junginiams priskiriami eteriniai aliejai, flavonoidai, terpenai, alkaloidai, kumarinai ir polisacharidai [46]. Šiuo metu dažniausiai naudojami mėsos konservantai yra tokie nitratai kaip kalio nitratas (E249) ir natrio nitratas (E250). Šios medžiagos padeda prailginti mėsos produktų galiojimo laiką, slopindamos gedimą sukeliančių bakterijų augimą ir mažindamos oksidaciją. Jos taip pat suteikia mėsai būdingą rausvą spalvą. Žinoma, jog nitritai gali sukelti riziką žmogaus sveikatai, dėl to intensyviai ieškoma alternatyvų [56].

Polifenoliai, kuriuos augalai sintetina reaguodami į įvairius stresinius veiksnius, pasižymi antibakteriniu poveikiu bakterijoms, mielėms ir grybams, susijusiems su maisto gedimu [56]. Jie maisto pramonėje vertinami kaip natūrali sintetinių priedų alternatyva [46]. Fenoliniai junginiai sąveikauja su bakterijų ląstelių sienelėmis ir išorine membrana, sukeldami jų pažeidimus. Tai mažina bakterijų atsparumą nepalankioms aplinkos sąlygoms. Nustatyta, kad gramneigiamos bakterijos yra atsparesnės fenoliniams junginiams dėl lipofiliškos išorinės membranos [56].

Siekiant sėkmingai taikyti *in vitro* technologijas, būtina optimizuoti kaliaus kultūros auginimo metodiką, naudojant skirtingus augalinius eksplantus ir mitybines terpes su įvairiomis augimo reguliatorių kombinacijomis [5].

### **1.5. Vaistinės medetkos aktualumas pramonėje**

Pramonėje vaistinė medetka vertinama dėl biologiškai aktyviųjų junginių, kurie naudojami kosmetikos, farmacijos ir žemės ūkio pramonėje. Augalo žiedai pasižymi antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis, antibakterinėmis savybėmis. Pastarieji moksliniai tyrimai atkreipia dėmesį į stiebus ir lapus kaip potencialius biologiškai aktyviųjų junginių šaltinius [57].

Vaistinės medetkos ekstraktai kosmetikos pramonėje naudojami dėl odos būklę gerinančių savybių. Jų galima rasti kremuose, balzamuose, serumuose ir kituose vaido odai prižiūrėti skirtuose produktuose [29]. 2024 metais Amerikos rinkoje medetkos žiedų ekstrakto vertė siekė 65 milijonus amerikietišku dolerių. Tikima, kad iki 2030 metų ši vertė išaugs ir sieks 150 milijonus dolerių [58].

Ajurvedos, Unani, homeopatijos ir kitose tradicinėse medicinos sistemose vaistinė medetka naudojama gydyti įvairias ligas. Ši vaistažolė pasižymi skausmą malšinančiomis, antiseptinėmis savybėmis ir gali būti naudojamas gydant ginekologines problemas, virškinamojo trakto sutrikimus. Augalo žiedai naudojami žaizdų gydymui skirtų tepalų gamybai. Indijoje medetkų tepalai naudojami gydant vėjaraupius, pūslelines, opas ir nušalimus [29].

Be farmakologinio poveikio, vaistinė medetka gali būti naudojama žemės ūkio pramonėje. Ši vaistažolė geba formuoti simbiotinius ryšius su endofitinėmis ir rizosferinėmis bakterijomis, kurios skatina augimą, didina derlių ir atsparumą biotiniams bei abiotiniams veiksniams, sukeliantiems stresą. Atliktame tyrime buvo išskirtos 36 endofitinių bakterijų padermės, kurios buvo analizuojamos *in vitro* ir *ex vivo* sąlygomis siekiant nustatyti augalų augimą skatinančias savybes. Keletas atrinktų bakterinių padermių reikšmingai pagerino pomodoro sėklų dygimą ir augalo augimą [59].

Atlikus junginių ekstrakciją, juos privaloma stabilizuoti, kad ilgiau išlaikytų savo vertę. Tai galima atlikti cheminiu ar mechaniniu būdu. Pramonėje dažniausiai naudojamas purškiamasis džiovinimas, dėl žemos kainos ir plataus pritaikomumo. Šiuo metodu stabilizuojami fenoliniai junginiai, pigmentai, karotinoidai bei eteriniai aliejai iš įvairių augalinių žaliavų [31].

#### **1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

Vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.) yra vaistažolė, kurioje aptinkami biologiškai aktyvieji junginiai, tokie kaip terpenoidai, flavonoidai, kvininai, karotinoidai ir aminorūgštys. Augalas pasižymi priešuždegiminėmis, antiseptinėmis, skausmą malšinančiomis savybėmis ir yra plačiai naudojamas farmacijos, kosmetikos ir maisto pramonėje. Kadangi biologiškai aktyvieji junginiai yra jautrūs kintančioms aplinkos sąlygoms (temperatūra, šviesa ar pH), daugiau dėmesio skiriama *in vitro* augalų technologijoms. Kaliaus kultūros yra nediferencijuotos ląstelės, kurių auginimo terpė gali būti papildoma įvairiais augimo reguliatoriais ir aminorūgštimis, norint optimizuoti antrinių metabolitų sintezę. Melatoninas ir *L*-triptofanas, kaip egzogeniniai priedai mitybinėje terpėje, reguliuoja antrinių metabolitų biosintezę ir antioksidacinį aktyvumą. Jų taikymas *in vitro* kaliaus kultūrų technologijose gali padidinti bioaktyviųjų junginių koncentracijas, reguliuojant fermentinį aktyvumą ir atsaką į stresą.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Tyrimo objektas

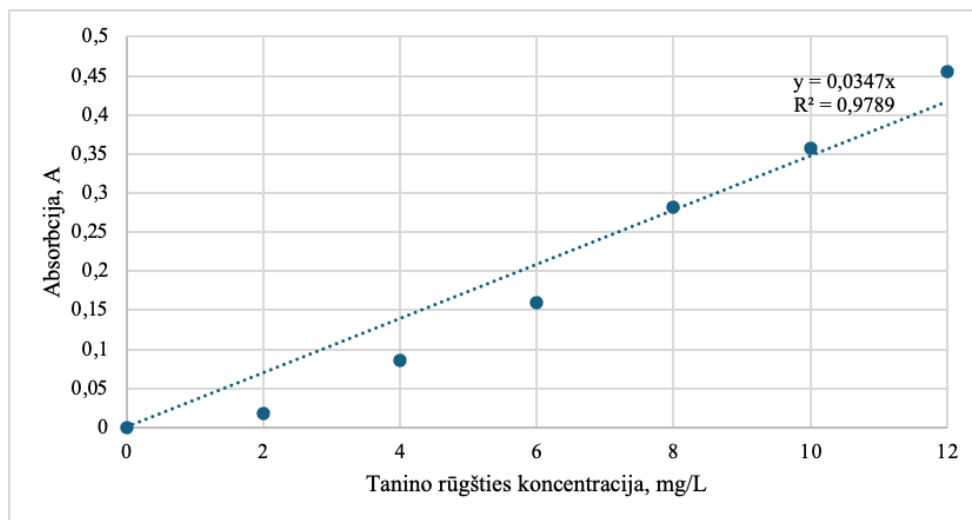
Tiriamasis objektas buvo vaistinė medetka (lot. *Calendula officinalis* L.). Tyrimų metu buvo naudojamos vaistinės medetkos *in vitro* šaknų, stiebų ir lapų kaliaus kultūros bei *in vivo* lapai ir stiebai. Kaliaus kultūros buvo auginamos MS mitybinėje terpėje, papildytoje fitohormonais, *L*-triptofanu ir melatoninu.

#### 2.1 lentelė. Vaistinės medetkos *in vitro* auginimo terpės

Maitinamoji terpė
Vaistinės medetkos lapų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)
Vaistinės medetkos stiebų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)
Vaistinės medetkos šaknų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)
Vaistinės medetkos lapų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)+melatoninas (0,5 mg/L)
Vaistinės medetkos stiebų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)+melatoninas (0,5 mg/L)
Vaistinės medetkos šaknų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)+melatoninas (0,5 mg/L)
Vaistinės medetkos lapų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)+ <i>L</i> -triptofanas (0,5 mg/L)
Vaistinės medetkos stiebų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)+ <i>L</i> -triptofanas (0,5 mg/L)
Vaistinės medetkos šaknų kalius MS+TDZ (0,5 mg/L)+IAR (0,1 mg/L)+ <i>L</i> -triptofanas (0,5 mg/L)

### 2.2. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos nustatymas

Kalibracinės kreivės (2.1 pav.) paruošimui paimama 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo į mėgintuvėlius. Įpilama distiliuoto vandens iki 500 µl. Į šį tirpalą pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento (1 N) ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje 40 min tamsoje. Po 40 min matuojama šviesos sugertis 725 nm bangos ilgyje prieš tuščią mėginį.



2.1 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

Sausa, susmulkinta augalinė medžiaga (0,05 g) yra suberiama į mėgintuvėlį ir užpilama 10 ml acetono (70 %) tirpalu. Maišoma kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Vėliau mėgintuvėlis centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min 4 °C. Papildomai centrifuguojama 2 min *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose. Supernatantas surenkamas ir toliau naudojamas tyrimams. Atliekami 3 pakartojimai.

Paimamas paruošto ekstrakto kiekis (30 µl) ir praskiedžiamas vandeniu iki 500 µl. Pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir įpilama 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Sumaišoma ir matuojama absorbcija tirpalo 725 nm bangos ilgyje po 40 min inkubavimo tamsoje. Apskaičiuojama bendra fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (mg/100 g), pagal (2.1) formulę:

$$x = a \times V \times \frac{100}{n}; \quad (2.1)$$

čia  $a$  – tanino rūgšties koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/l;  $V$  – pradinis ekstrakto tūris, L;  $n$  – augalinė masė, g [60].

### 2.3. Bendrosios fenolinių rūgščių koncentracijos nustatymas

0,1 g augalinės žaliavos homogenizuojama 2,5 ml distiliuotu vandeniu 30 min termostatuojame kratytuve 25 °C. Po to nucentrifuguojama 9000 aps/min 5 min ir po to 5 min *Eppendorf* mėgintuvėliuose. Po centrifugavimo ekstraktas (1 ml) yra praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 5 ml. Vėliau 1 ml ekstrakto yra 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. Šviesos sugertis išmatuojama 490 nm bangos ilgyje. Fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį % apskaičiuojama iš (2.2) formulės:

$$C \% = \frac{A \times 1.7544}{m}; \quad (2.2)$$

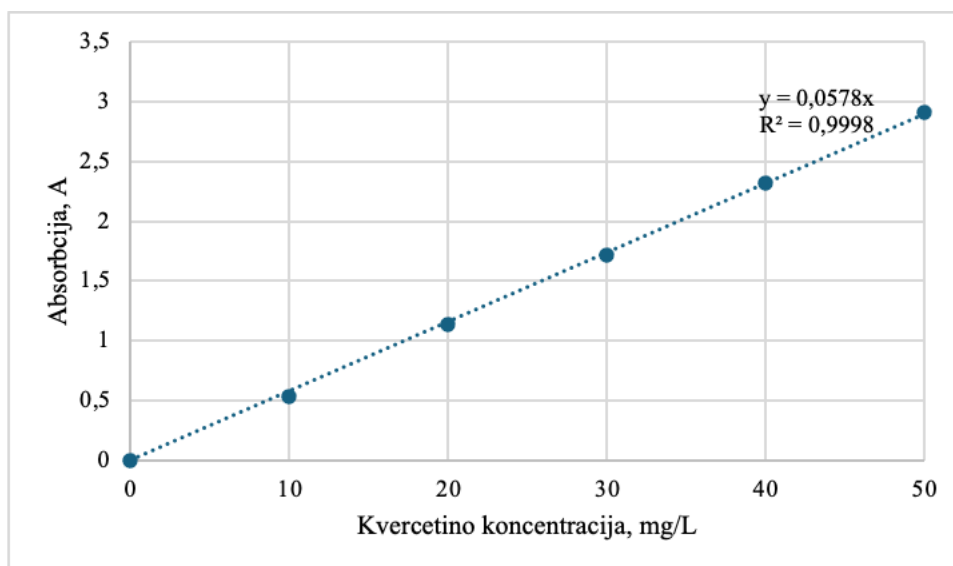
čia  $A$  – šviesos sugerties reikšmė;  $m$  – augalinė masė, g [61].

### 2.4. Flavonoidų koncentracijos nustatymas

0,2 g susmulkinta augalinė žaliava maišoma su 2 ml 80 % metanolio 24 valandas (150 rpm). Homogenatas nucentrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir naudojamas supernatantas.

Bendra flavonoidų koncentracija nustatoma naudojant aliuminio chloridą. Į tiriamąjį pavyzdį 0,1 ml įpilama iki 1 ml 80 % metanolio ir 1 ml 2 % aliuminio chlorido. Mišinys paliekamas 30 min inkubuotis ir absorbcija išmatuojama 415 nm bangos ilgyje.

Kvercetino kalibracinės kreivės sudarymui paruošiamos skirtingos kvercetino koncentracijos: 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L. Išmatuojama šviesos sugertis 415 m bangos ilgyje. Braižoma kvercetino kalibracinė kreivė (2.2 pav.).



2.2 pav. Kvercetino kalibracinė kreivė

Flavonoidų koncentracija mg/g pagal kvercetiną apskaičiuojama pagal (2.3) formulę:

$$C = \frac{C_1 \times V}{g}; \quad (2.3)$$

čia  $C_1$  – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibracinę kreivę;  $V$  – ekstrakto pradinis tūris, ml;  $g$  – augalinė masė, g [61].

## 2.5. Bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas

Į 0,2 g augalinę žaliavą įpilama 5 ml 50 %  $C_2H_5OH$  ir homogenizuojama 25 °C 15 min. Homogenatas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min greičiu ir naudojamas tyrimams. Pakartotinai supernatantas centrifuguojamas *Eppendorf* mėgintuvėliuose 10 000 aps/min 5 min. 0,875 ml ekstrakto įpilama atskirai į 857,5 μl KCl buferį (pH 1) ir 857,5 μl NaOAc buferį (pH 4,5). Išmatuojama šviesos sugertis 510 nm bangos ilgyje.

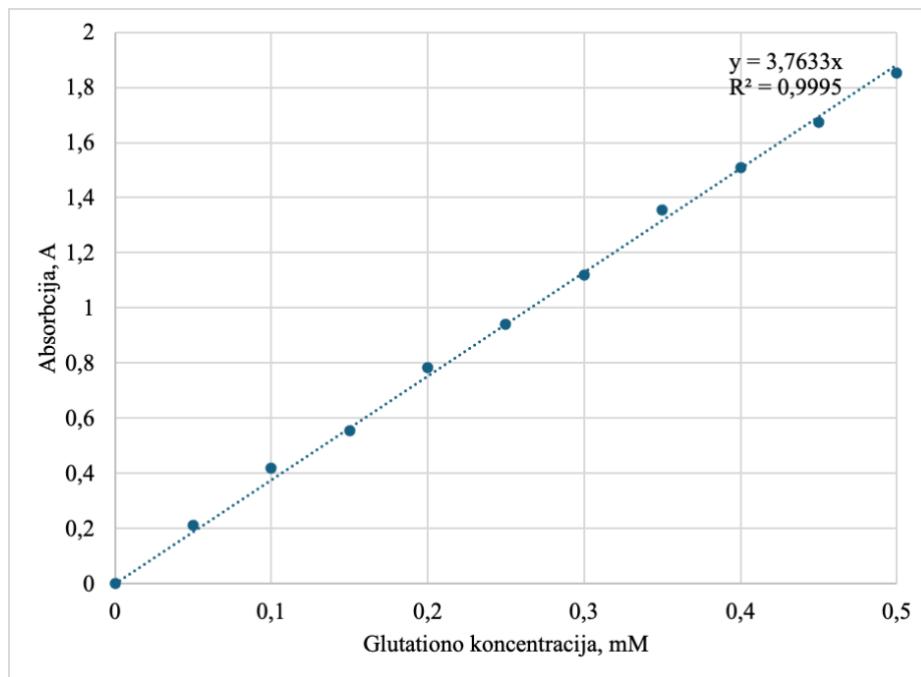
Bendroji antocianinų koncentracija mg/100g apskaičiuojama iš (2.4) formulės:

$$BAK = (A \times M \times PF) \times \frac{1000}{\epsilon}; \quad (2.4)$$

čia BAK – bendroji antocianinų koncentracija miligramai cianidin-3-gliukozido ekvivalento 100 g;  $A$  – absorbcija = ( $A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}$ ), pH 1 – ( $A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}$ ) pH 4,5;  $M$  – molekulinė masė (449,2 g/mol);  $PF$  – praskiedimo faktorius;  $\epsilon$  – cianidin-3-gliukozido (Cy3G) molinis adsorbcijos koeficientas (26900 l/mol cm) [62].

## 2.6. Redukuoto glutationo (GSH) nustatymas

Kalibracinės kreivės (2.3 pav.) ruošimui paimama 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 μl redukuoto glutationo standartinio tirpalo į atskirus mėgintuvėlius. Tada įpilama buferio, kad bendras tūris mėgintuvėliuose būtų 1,1 ml ir įpilama 0,5 ml Elmano reagento.

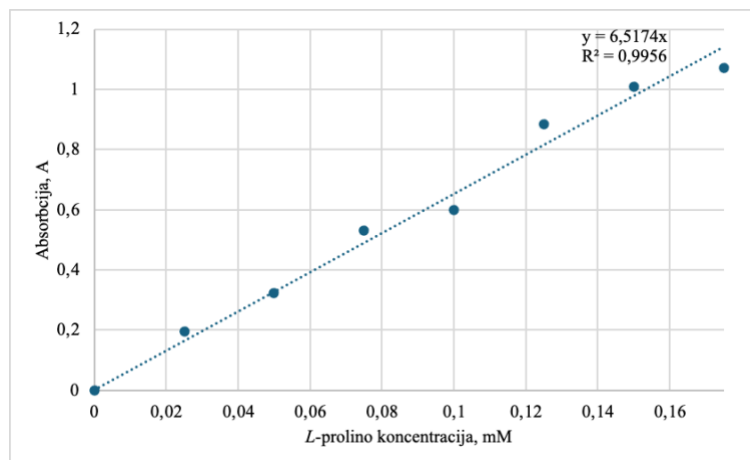


2.3 pav. Redukuoto glutatio no kalibracinė kreivė

Augalinė žaliava (0,1 g) homogenizuojama 5 ml 100 mM natrio fosfatiniame buferyje (pH 7,4) 10 min termostatuojamame kratytuve 25 °C temperatūroje. Vėliau mėginiai centrifuguojami 9000 aps/min 10 min 4 °C ir papildomai *Eppendorf* mėgintuvėliuose 5 min. Į 1 ml supernatanto įpilama 0,5 ml 5 % trichloracto rūgštis ir 0,5 ml Elmano reagento. Šviesos sugertis išmatuojama 412 nm bangos ilgyje. Redukuoto glutatio no (GSH) koncentracija apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę [63].

### 2.7. L-prolino koncentracijos nustatymas

Kalibracinei kreivei (2.4 pav.) pasveriami *L*-prolino 0,0011 g ir ištirpinama 10 ml H<sub>2</sub>O (1 mM). Ruošiamos koncentracijos *L*-prolino kalibracinei kreivei: 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 mM. Mėgintuvėliai kaitinami 30 min 95 °C vandens vonelėje ir atšaldžius matuojama šviesos sugertis 520 nm bangos ilgyje.



2.4 pav. *L*-prolino kalibracinė kreivė

100 mg augalinės žaliavos susmulkinama ir užpilama 4 ml distiliuotu vandeniu mėgintuvėlyje. Mėgintuvėlis, su augaline žaliava, sumaišomas purtykle, 3 min kaitinamas 95 °C ir atšaldomas. Kaitinimo procedūra iš viso atliekama 3 kartus. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min. Gautas ekstraktas (1 ml) nupilamas į kitą mėgintuvėlį ir praskiedžiamas iki 6 ml distiliuotu vandeniu.

Į kitą mėgintuvėlį įpilama 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir kaitinama 30 min vandens vonelėje 95 °C. Šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje. *L*-prolino koncentracija apskaičiuojama naudojantis *L*-prolino kalibracine kreive ir (2.5) formule:

$$C_x = \frac{E \times k \times V_{bendras}}{V_{paimta} \times m}; \quad (2.5)$$

čia  $C_x$  – *L*-prolino koncentracija  $\mu\text{mol/g}$ ;  $E$  – tirpalo šviesos sugertis;  $k$  – *L*-prolino koncentracija, gauta pagal kalibracinę kreivę ( $\mu\text{mol}$ );  $V_{bendras}$  – bendras ekstrakto tūris, ml;  $V_{paimta}$  – paimto ekstrakto tūris, ml;  $m$  – augalinės žaliavos kiekis, g [64].

## 2.8. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas

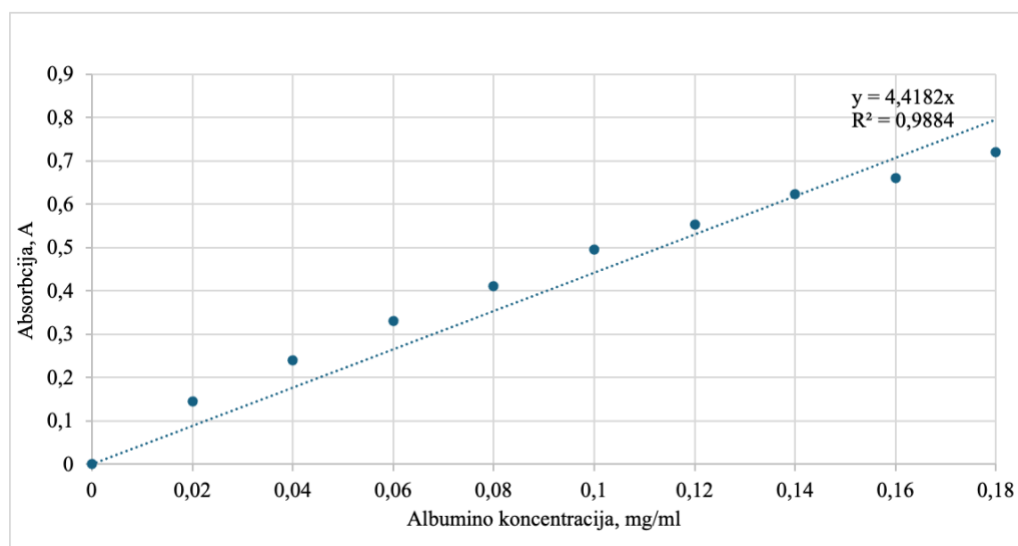
Augalinė žaliava (100 mg) homogenizuojama su 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi. Mėginys maišomas kratytuve 10 min 25 °C ir tirpalas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min 4 °C. Supernatantas (0,3 ml) sumaišomas su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūrine rūgštimi (ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje) ir inkubuojamas 95 °C temperatūroje 30 min, atšaldomas ir centrifuguojamas 15 min 9000 aps/min. Šviesos sugertis išmatuojama 532 ir 600 nm bangos ilgiuose. MDA koncentracija apskaičiuojama pagal (2.6) formulę:

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \times V_e \times 2}{k \times m_s \times V_a}; \quad (2.6)$$

čia  $C_x$  – MDA koncentracija  $\mu\text{mol/g}$ ;  $E$  – tirpalo šviesos sugertis;  $V_e$  – ekstrakto tūris, ml;  $V_a$  – ekstrakto tūris analizei, ml;  $k$  – molinės ekstinkcijos koeficientas  $156 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ;  $m_s$  – bandinio masė, g [65].

## 2.9. Fermento superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo nustatymas

Paruošiama baltymų kalibracinė kreivė (2.5 pav.) pagal albuminą. Paruoštas 1 mg/ml albumino tirpalas (25 mg albumino ištirpinama 25 ml distiliuoto vandens). Paruošti 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12; 0,14; 0,16 ir 0,18 mg/ml koncentracijos albumino tirpalai skiesti iki 10 ml distiliuotu vandeniu.



**2.5 pav.** Albumino kalibracinė kreivė

Baltymų nustatymui paimama 200  $\mu$ l mėginio, įpilama 2 ml Bradfordo reagento ir išmatuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje.

Fermento aktyvumas nustatomas susmulkinant 0,1 g augalinės žaliavos. Tirpių baltymų ekstrakcija vyksta 0,066 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH 7,4) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditiotritolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono. Mėginys maišomas kratytuve 10 min 25 °C. Vėliau mėginys centrifuguojamas 9000 aps/min 10 min ir supernatantas dar kartą centrifuguojamas *Eppendorf* mėgintuvėliuose.

Reakcijos mišinys 2 ml tūrio turi 40  $\mu$ l fermentinio preparato, 400  $\mu$ l 200 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200  $\mu$ l 100 mM L-metionino, 200  $\mu$ l 540  $\mu$ M nitromėlynojo tetrazolio, 500  $\mu$ l 0,1 % Tritono X-100, 20  $\mu$ l 300  $\mu$ M riboflavino ir 640  $\mu$ l distiliuoto vandens. Paruošiamas kontrolinis mėginys be fermentinio preparato. Reakcija atliekama apšviečiant liuminescencinėmis lempomis 30 min. Šviesos sugertis matuojama 560 nm bangos ilgyje.

Fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.6) formulę:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \times m}; \quad (2.6)$$

čia A – SOD aktyvumas vnt/mg;  $E_K$  – šviesos sugertis kontrolinio bandinio;  $E_T$  – šviesos sugertis tiriamojo bandinio; m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml [60].

## 2.10. Antioksidacinis aktyvumas pagal DPPH metodą

DPPH yra tamsiai violetinis radikalas, kuris redukuojasi į tirpalą pridėjus antioksidacinį junginį, ir pakeičia tirpalo spalvą į šviesiai geltoną. Spektrofotometru nustatytas absorbcijos sumažėjimas yra tiesiogiai proporcingas atiduotų elektronų arba vandenilio atomų skaičiui, todėl galima kiekybiškai įvertinti antioksidacinį aktyvumą [50,51].

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

Tiriamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml paruošto ekstrakto, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir po 15 minučių laikymo tamsoje matuojama tirpalo šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje. Etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje.

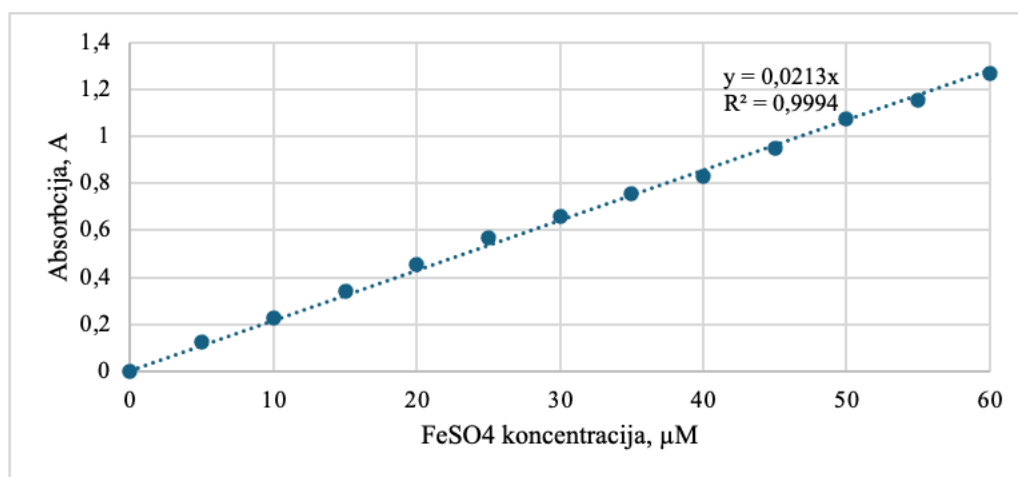
Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.7) formulę:

$$\% \text{ slopinimas} = \left[ \frac{AB-AA}{AB} \right] \times 100; \quad (2.7)$$

čia AB – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis; AA – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis [66,67].

### 2.11. Antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą

Kalibracinė kreivė ruošiama  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (5, 10, 15, 20; 25  $\mu\text{mol/L}$ ) (2.6 pav.) [60,68].



2.6 pav. Geležies sulfato kalibracinė kreivė

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 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,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mmol/L). FRAP reagentas ruošiamas su 25 ml 300 mM acetato buferio, 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 2,5 ml  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mmol/L). Mėginiai (20  $\mu\text{L}$  mėginio ir 80  $\mu\text{L}$  metanolio) yra sumaišomi su 3 ml FRAP reagentu. Reakcijos mišinys matuojamas 593 nm bangos ilgyje spektrofotometriškai. Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę  $\mu\text{mol/L Fe(II)/L}$  [60,68].

### 2.12. Antioksidacinis aktyvumas pagal ABTS metodą

ABTS metodas paremtas radikalo anijono slopinimu. ABTS yra gaunamas pridėdant į jį kalio persulfato tirpalą. Radikalo anijonas turi mėlynai-žalią spalvą ir šviesos sugertis matuojama 734 nm bangos ilgyje. ABTS tirpalas praskiedžiamas, kad šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje būtų 1,0-1,5.

Išdžiovinta augalinė medžiaga (0,1 g) ekstrahuojama metanolyje (5 ml) 45 °C, 30 minučių. 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. Nustatoma ABTS šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje.

Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.7) formulę:

$$\% \text{ slopinimas} = \left[ \frac{AB-AA}{AB} \right] \times 100; \quad (2.7)$$

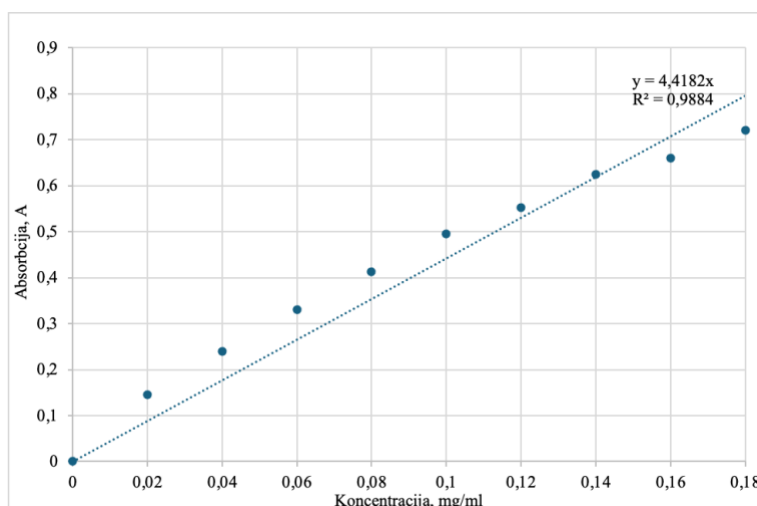
čia AB – praskiesto ABTS tirpalo šviesos sugerties dydis; AA – tiriamojo augalų ekstrakto šviesos sugerties dydis [61].

### 2.13. Baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų koncentracijos nustatymas atliekamas pagal Bradfordo metodą. Metodas pagrįstas specifine baltymų sąveika su Kumasi briliantiniu mėliu ir susidariusio komplekso koncentracijos matavimu spektrofotometriškai 595 nm bangos ilgyje.

Kalibracinės kreivės sudarymui paruošiamos albumino koncentracijos: 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,12, 0,14, 0,16, 0,16, 0,018 mg/ml.

Kalibracinei kreivei į pirmą mėgintuvėlį įpilama 0,2 ml distiliuoto vandens, o į likusius mėgintuvėlius po 0,2 ml skiesto albumino tirpalo. Į visus mėgintuvėlius įpilama 2 ml Bradfordo reagento. Mėginiai sumaišomi ir matuojami spektrofotometru 595 nm bangos ilgyje.



2.7 pav. Albumino kalibracinė kreivė

Baltymų išskyrimui augalinė medžiaga išdžiovinama, pasveriamą 0,05 g ir naudojami buferiai. Augalinė medžiaga užpilama buferiu 0,1 M natrio acetatu (pH 4) 1 ml ir maišoma vieną valandą, po to nucentrifuguojant 9000 aps/min 20 min 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo paimama 200 µl ekstrakto, pridedama Bradfordo reagento (2 ml). Po 2 minučių matuojama šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje.

Bendroji baltymų koncentracija X (mg/100 mg) apskaičiuojama iš (2.8) formulės:

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

čia  $a$  – baltymo koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/ml;  $V$  – pradinis ekstrakto tūris, ml;  $n$  – augalinė masė, mg [69].

#### 2.14. Pigmentų (chlorofilo $a$ ir $b$ ) koncentracijos nustatymas

Chlorofilo  $a$  ir  $b$  koncentracijos nustatymui 0,05 g augalinės medžiagos susmulkinama grūstuvėje. Į ją pridedama 5 ml 96%  $C_2H_5OH$  ir centrifuguojama. Nucentrifuguoto ekstrakto tūris išmatuojamas cilindru. Filtratas supilamas į matavimo kiuvetę ir matavimai atliekami spektrofotometru 662 nm (chlorofilo  $a$ ), 644 nm (chlorofilo  $b$ ) bangų ilgiuose.

Pigmentų koncentracija apskaičiuojama pagal (2.9 – 2.11) formules:

Chlorofilo  $a$  koncentracija ( $mg\ l^{-1}$ ):

$$C_a = 9,784 \times D_{66} - 0,99 \times D_{644}; \quad (2.9)$$

Chlorofilo  $b$  koncentracija ( $mg\ l^{-1}$ ):

$$C_b = 21,426 \times D_{644} - 4,65 \times D_{662}; \quad (2.10)$$

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojama:

$$x = C \times V \times \frac{100}{n} \times 1000; \quad (2.11)$$

čia  $C$  - pigmentų koncentracija mg/l;  $V$  - pradinis ekstrakto tūris;  $n$  - augalinė masė, g [61].

#### 2.15. Antibakterinio aktyvumo nustatymas

0,2 g susmulkinta augalinė žaliava sumaišoma su 2 ml DMSO tirpalu ir ekstrahuojama 14 dienų. Ekstraktas centrifuguojamas 9000 aps/min 10 minučių. Kontroliniam mėginiui naudojamas antibiotikas ciprofloksacinas.

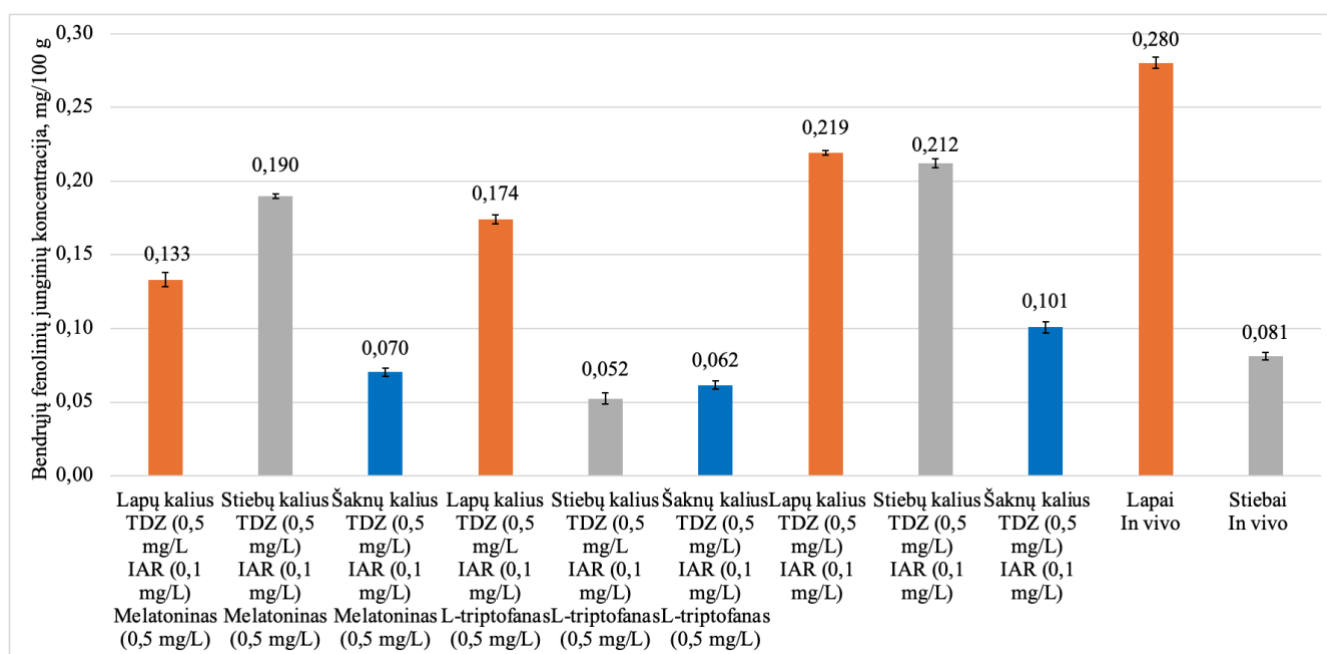
Ant *Luria Bertani* (LB) terpės atskirose *Petri* lėkštelėse užpilama po 50  $\mu$ l *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų suspensijos, paskirstoma kilpele ir uždedami 6 filtrinio popieriaus diskeliai. Ant diskelių užlašinami 50  $\mu$ l tiriamo augalinio ekstrakto. Kontroliniame mėginyje ant diskelių užlašinama 50  $\mu$ l antibiotiko. *Petri* lėkštelės inkubuojamos termostate 37 °C temperatūros 24 valandas. Po vienos paros matuojamas antibakterinis aktyvumas, išmatuojant skaidrią zoną aplink diskelį, kuri rodo bakterijų augimo slopinimą [60].

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas

Atlikto tyrimo rezultatai (3.1 pav.) atskleidė, jog fenolinių junginių kaupimasis vaistinėje medetkoje reikšmingai priklauso nuo augalo dalies, augimo sąlygų ir naudotų augimo reguliatorių. Didžiausia fenolinių junginių koncentracija buvo nustatyta *in vivo* medetkos lapų ekstrakto – 0,280 mg/100 g. Tuo tarpu *in vivo* stiebų ekstrakto fenolinių junginių koncentracija buvo žymiai mažesnė – 0,081 mg/100 g. Mažiausia koncentracija nustatyta stiebo kaliaus kultūrų, augusių mitybinėje terpėje (MS) su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstrakto ir siekė 0,052 mg/100 g.

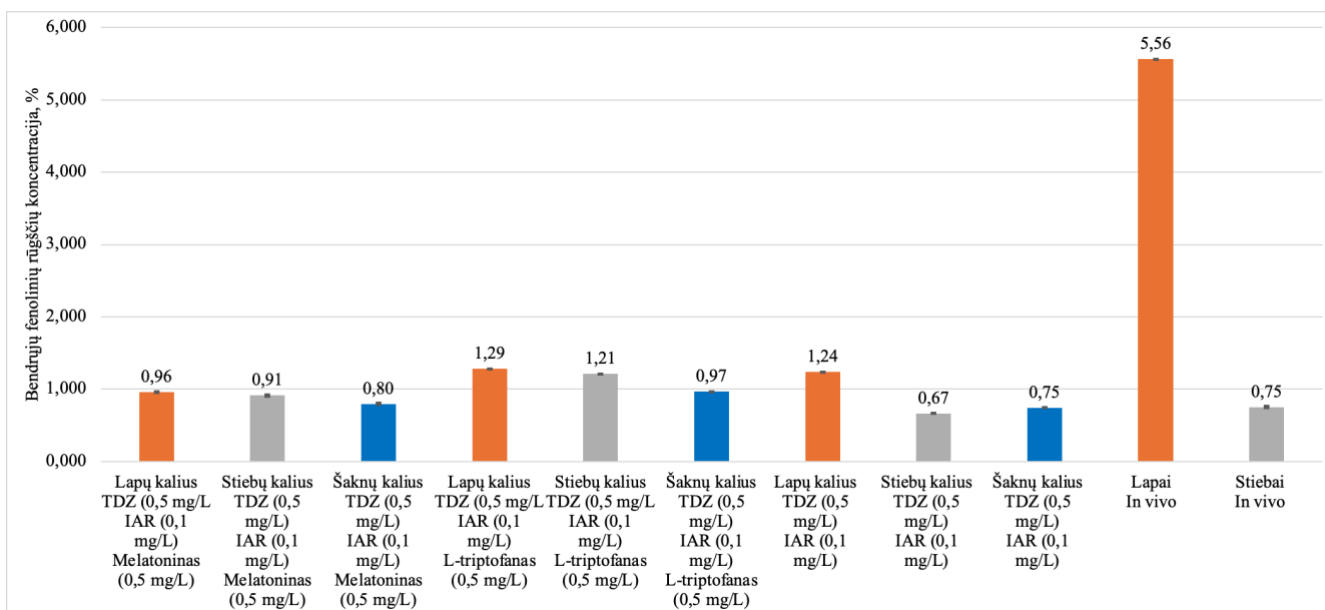
Pastebima, jog *in vitro* ir *in vivo* medetkos lapų ekstraktai pasižymėjo didžiausiomis bendrųjų fenolinių junginių koncentracijomis. Tai rodo lapuose vyraujančią didesnę metabolinį aktyvumą ir suintensyvėjusią fenolinių junginių biosintezę. Vis dėlto, lapų kaliaus kultūrų, augusių mitybinėje terpėje su melatoninu (0,5 mg/l), ekstraktuose fenolinių junginių koncentracija buvo 30 % mažesnė už toje pačioje terpėje augusių stiebo kaliaus kultūrų ekstraktuose. Tai reiškia, kad priklausomai nuo augalo dalies, melatoninas turėjo poveikį fenolinių junginių sintezei.



3.1 pav. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas

#### 3.2. Bendrųjų fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas

Tyrimo rezultatai (3.2 pav.) atskleidė, jog lapų ekstraktai pasižymėjo didesnėmis fenolinių rūgščių koncentracijomis, lyginant su kitomis augalo dalimis. Didžiausia koncentracija nustatyta medetkos *in vivo* lapų ekstrakto ir siekė 5,56 %. Tuo tarpu mažiausia koncentracija nustatyta stiebo kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonais, ekstraktuose, kuomet koncentracija siekė 0,67 %.

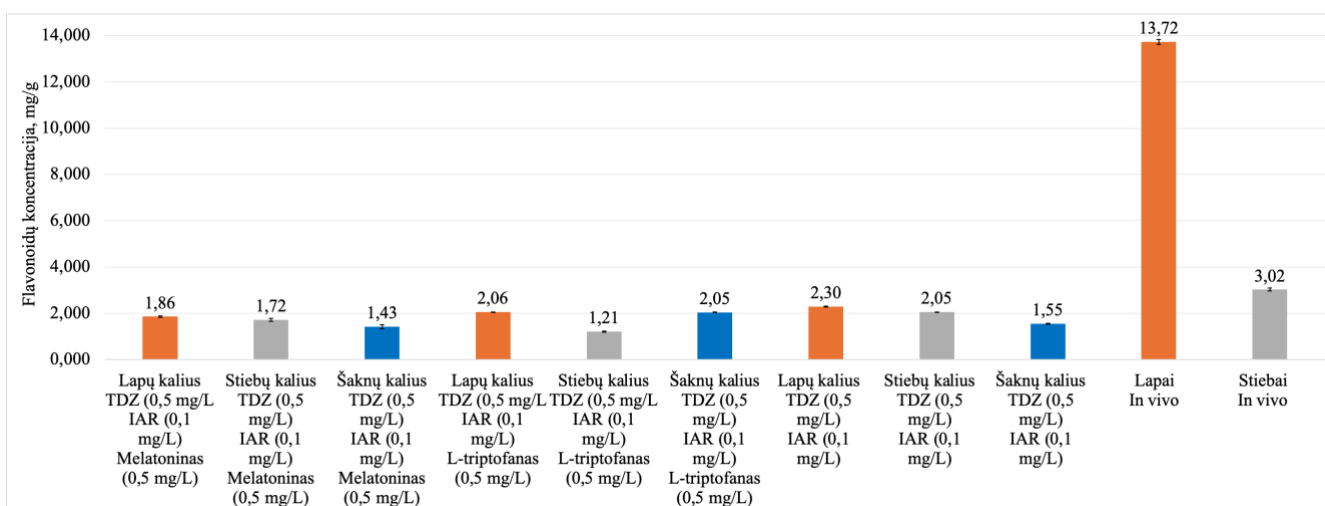


3.2 pav. Bendrųjų fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas

Aromatinės aminorūgštys yra antrinių metabolitų, tokių kaip fenolinių rūgščių, pirmtakai, tiesiogiai dalyvaujantys jų sintezėje [21]. Pastebima, jog kaliaus kultūros, augusios *L*-triptofanu papildytoje terpėje pasižymėjo didesne bendrųjų fenolinių rūgščių koncentracija, lyginant su kitose terpėse augusių *in vitro* kultūrų ekstraktais.

### 3.3. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Tyrimas atskleidė (3.3 pav.), jog didžiausia flavonoidų koncentracija nustatyta medetkos *in vivo* lapų ekstraktuose, siekianti 13,72 %. Tuo tarpu mažiausia koncentracija nustatyta stiebo kaliaus kultūros, augusios MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktuose, kuomet koncentracija buvo 33 % mažesnė už nustatytą didžiausią koncentraciją, ir siekė 1,21 %.

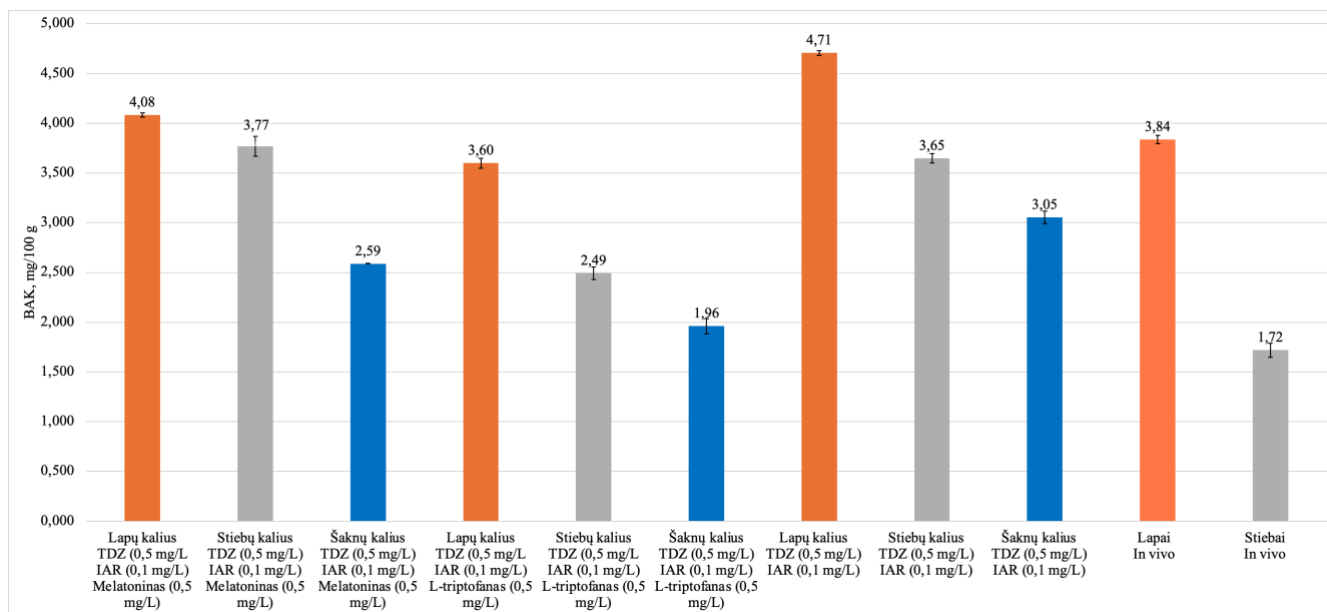


3.3 pav. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Pastebima, kad didžiausios flavonoidų koncentracijos nustatytos lapų ekstraktuose, lyginant su stiebais ir šaknimis. Vertinant *in vitro* medetkos kaliaus kultūrų ekstraktus, nustatyta, kad daugiausiai flavonoidų kaupė kaliaus kultūros, augusios kontrolinėje MS terpėje, papildytoje tik TDZ ir IAR fitohormonais. Šiek tiek mažesnėmis flavonoidų koncentracijomis pasižymėjo *L*-triptofanu papildytoje mitybinėje terpėje augusių kaliaus kultūrų ekstraktai, kuomet lapų kaliaus kultūros ekstrakto flavonoidų koncentracija buvo 11 % mažesnis už kontrolinėje terpėje augusių lapų kaliaus kultūrų, ir siekė 2,06 mg/g.

### 3.4. Bendrųjų antocianinų koncentracijos įvertinimas

Atlikus tyrimą pastebėta (3.4 pav.), kad didžiausios bendrųjų antocianinų koncentracijos (BAK) nustatytos lapų ekstraktuose, lyginant su stiebų ir šaknų ekstraktais. Didžiausia BAK nustatyta lapų kaliaus kultūrų, augusių kontrolinėje MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonais, ekstraktuose, kuomet koncentracija siekė 4,706 mg/100 g. Šiek tiek mažesnė BAK gauta lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktuose, kuomet koncentracija siekė 4,084 mg/100 g. Mažiausia koncentracija nustatyta medetkos *in vivo* stiebų ekstraktuose – 1,719 mg/100 g.



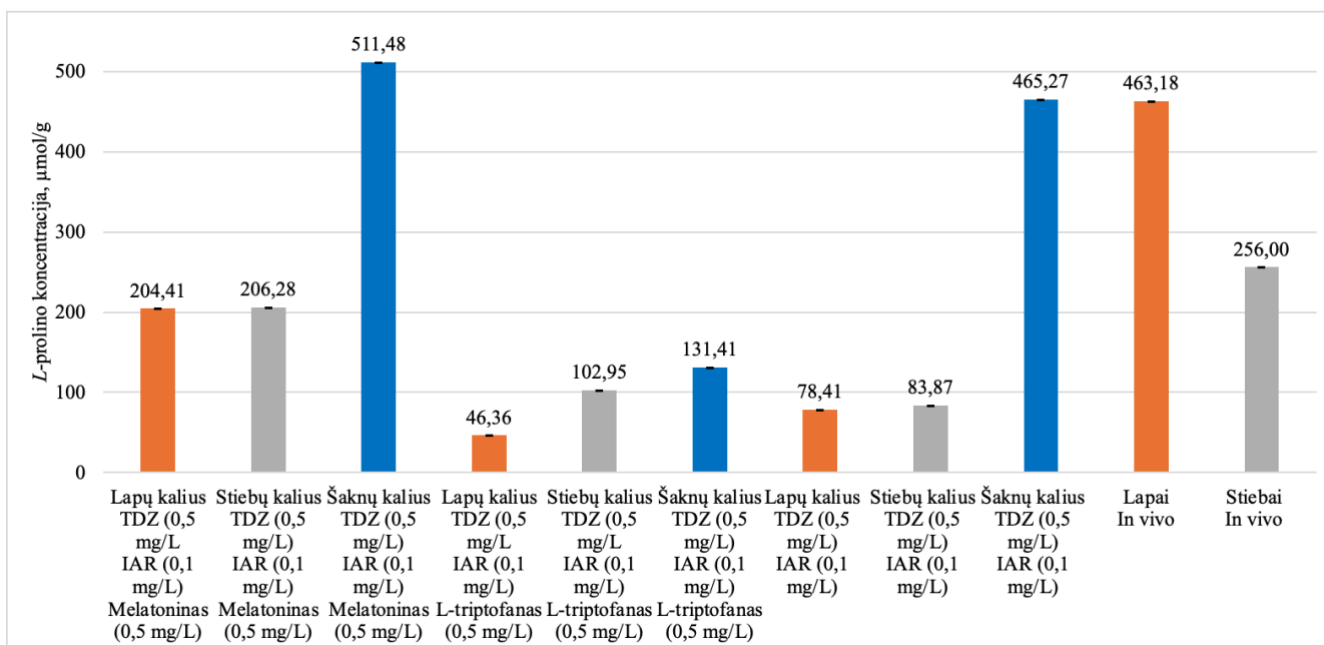
3.4 pav. Bendrųjų antocianinų koncentracijos įvertinimas

Pagal rezultatus galima matyti, kad optimaliausia mitybinė terpė, siekiant išgauti didžiausias antocianinų koncentracijas, yra kontrolinė terpė, papildyta tik TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonais. Atkreipiant dėmesį į

### 3.5. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas

*L*-prolino koncentracijos įvertinimas leidžia suprasti augalo ląstelėse patiriamą stresą. Nustatyta, jog medetkos lapuose intensyviausiai vyko *L*-prolino sintezė (3.5 pav.). Didžiausia koncentracija nustatyta šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktuose – 511,48 μmol/g. Ši koncentracija buvo 60 % didesnė, lyginant su toje pačioje mitybinėje terpėje augusių lapų ir stiebo kaliaus kultūrų ekstraktuose nustatyta koncentracija. Mažiausia

koncentracija nustatyta lapų kaliaus kultūros, augusios MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktuose – 46,36 μmol/g.

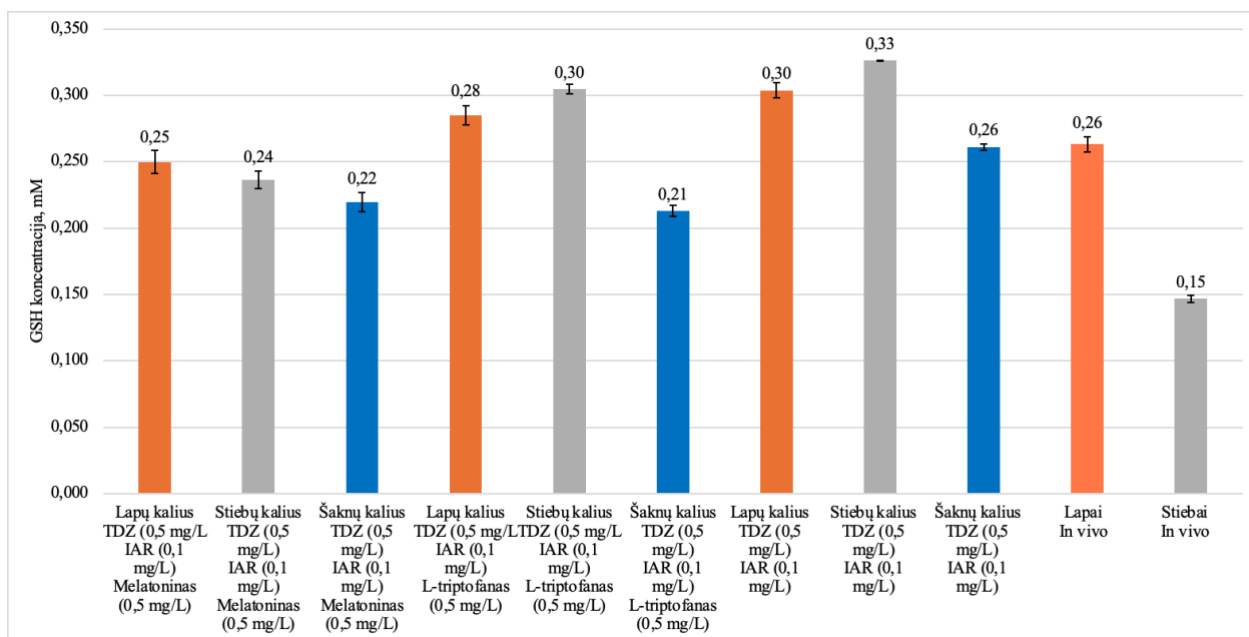


3.5 pav. *L*-proolino koncentracijos įvertinimas

Atsižvelgiant į tai, jog *L*-proolino kaupimasis augaluose yra siejamas su oksidaciniu stresu, galima teigti, jog iš visų augalo dalių, šaknų kaliaus kultūros patyrė didesnę stresą ir yra jautresnės, nei lapų ar stiebo kaliaus kultūros. Taip pat, analizuojant naudotų augimo stimuliatorių įtaką, galima išvelgti, jog melatoninas turėjo didesnę įtaką ir skatino *L*-proolino sintezę, kuomet *L*-triptofanas slopino. Melatoninas augaluose veikia kaip signalinė molekulė, todėl jis tiesiogiai aktyvina antioksidacines reakcijas ir skatina *L*-proolino sintezę [24].

### 3.6. Redukuoto glutationo (GSH) koncentracijos įvertinimas

Redukuoto glutationo (GSH) koncentracijos įvertinimo tyrimo rezultatai pateikti 3.6 paveiksle. Didžiausia koncentracija nustatyta stiebo kaliaus kultūrų, augusių kontrolinėje MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L), ekstraktuose ir siekė 0,33 mM. Kontrolinėje MS terpėje GSH koncentracija buvo didesnė, lyginant su kitose terpėse užaugintomis kaliaus kultūromis. Mažiausia koncentracija buvo nustatyta *in vivo* stiebų ekstraktuose, kuomet GSH koncentracija siekė 0,15 mM.

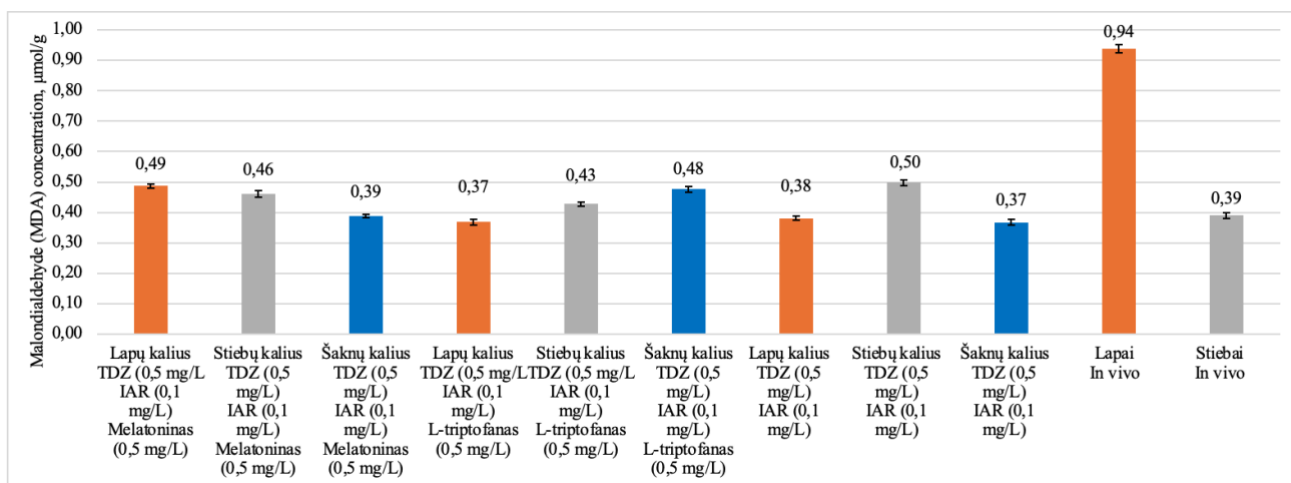


**3.6 pav.** Redukuoto glutationo (GSH) koncentracijos įvertinimas

*In vivo* audiniai pasižymėjo aukštomis antocianinų, flavonoidų ir fenolinių junginių koncentracijomis, tačiau GSH koncentracijos įvertinimo tyrimas atskleidė mažesnes šio junginio koncentracijas, lyginant su *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktais. Sumažėjusi GSH koncentracija *in vivo* audiniuose gali būti patiriamo oksidacinio streso rezultatas, reiškiantis didesnę suvartojamumą, siekiant neutralizuoti laisvuosius radikalus. Panašiomis GSH koncentracijomis pasižymėjo ir *in vitro* kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje papildytoje TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktai.

### 3.7. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

Malondialdehidas yra lipidų peroksidacijos žymuo, rodantis ląstelių membranų pažeidimo lygį. Atliktame tyrime (3.7 pav.) didžiausia malondialdehido (MDA) koncentracija buvo nustatyta *in vivo* medetkos lapų ekstraktuose – 0,94  $\mu\text{mol/g}$ , kuomet mažiausia koncentracija rasta šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L), ekstraktuose, ir stiebų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktuose, siekiant 0,37  $\mu\text{mol/g}$ .

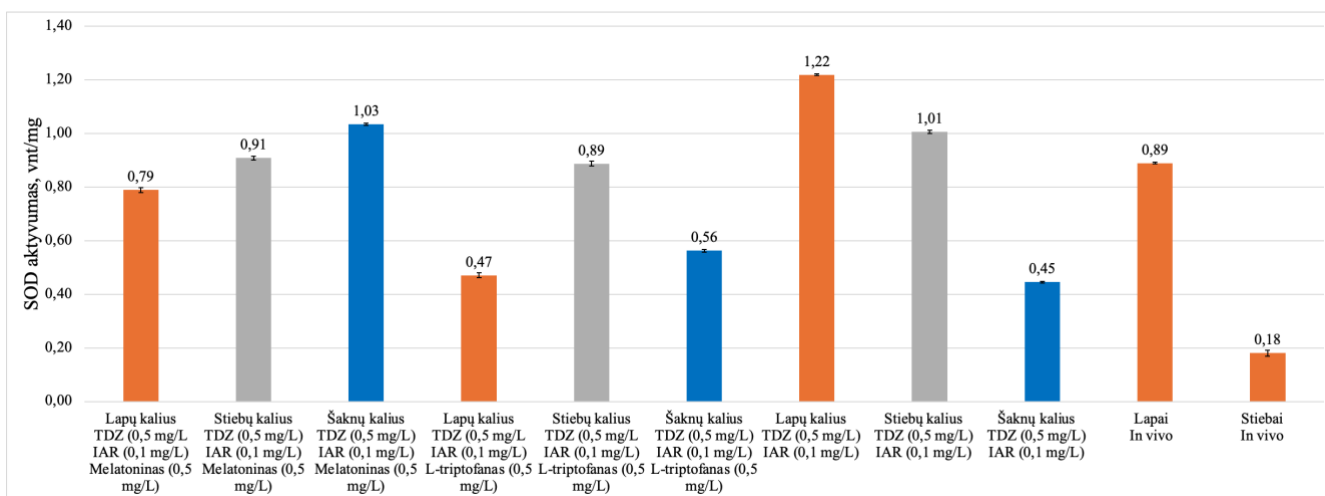


3.7 pav. Malondialdehido (MDA) koncentracijos įvertinimas

*In vivo* augintų medetkų lapuose nustatyta žymiai didesnė MDA koncentracija rodo intensyvią lipidų peroksidaciją ir didesnę oksidacinį stresą, augant natūraliomis sąlygomis. Tuo tarpu *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktai pasižymi mažesnėmis MDA koncentracijomis. Pastebima, kad kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktai pasižymėjo šiek tiek didesne MDA koncentracija, lyginant su kitomis *in vitro* kaliaus kultūromis.

### 3.8. Superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo įvertinimas

Superoksido dismutazės (SOD) aktyvumo nustatymo tyrimas leidžia įvertinti augalo atsaką į oksidacinį stresą. Didžiausias SOD aktyvumas (3.8 pav.) nustatytas lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L), ekstraktuose - 1,22 vnt/mg. SOD aktyvumas 15 % mažesnis buvo nustatytas šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktuose. Tai rodo šiuose audiniuose suaktyvėjusią antioksidacinę apsaugą. Mažiausias aktyvumas buvo įvertintas *in vivo* augusios medetkos stiebų ekstraktuose – 0,18 vnt/mg.

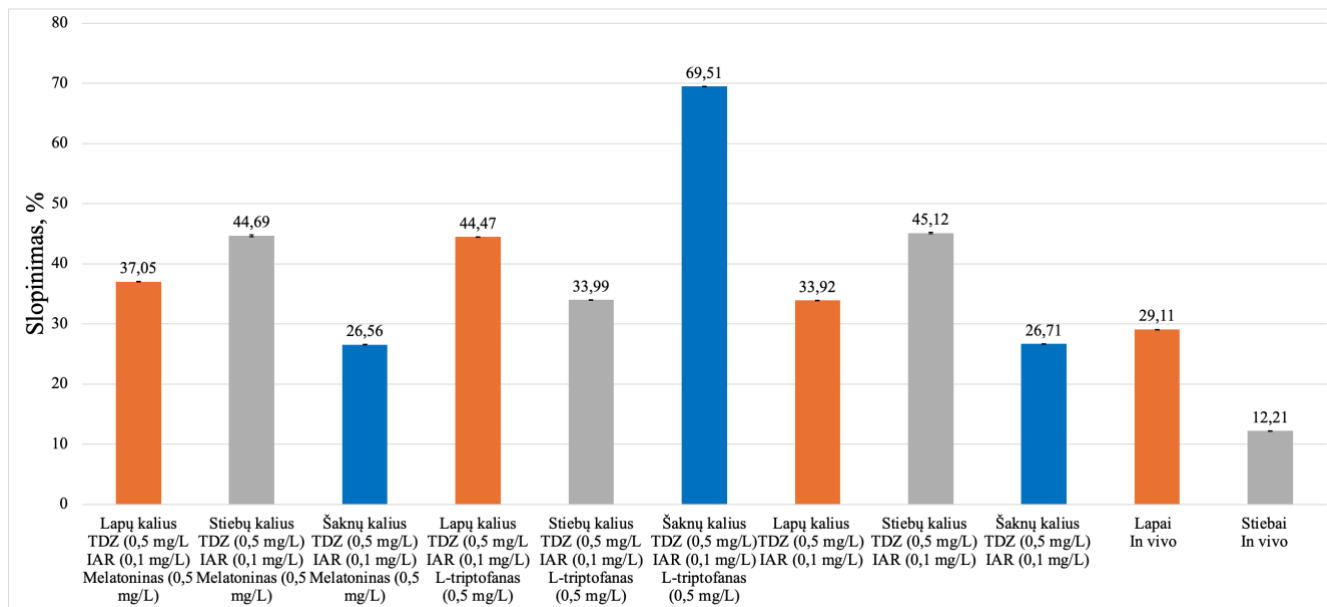


3.8 pav. Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Pastebima, kad kaliaus kultūrų, augusių *L*-triptofanu (0,5 mg/L) papildytoje MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonais, ekstraktuose SOD aktyvumas buvo mažesnis, ypač lapų ir šaknų kaliaus kultūrų ekstraktuose, kuomet aktyvumas atitinkamai siekė 0,47 ir 0,56 vnt/mg.

### 3.9. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Atlikus antioksidacinio aktyvumo įvertinimą DPPH metodu (3.9 pav.), didžiausias slopinimas nustatytas šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktuose, kuomet slopinimas siekė 69,51 %. Tuo tarpu mažiausias slopinimas buvo nustatytas *in vivo* medetkos stiebų ekstraktuose, kuomet rezultatas siekė 12,21 %.

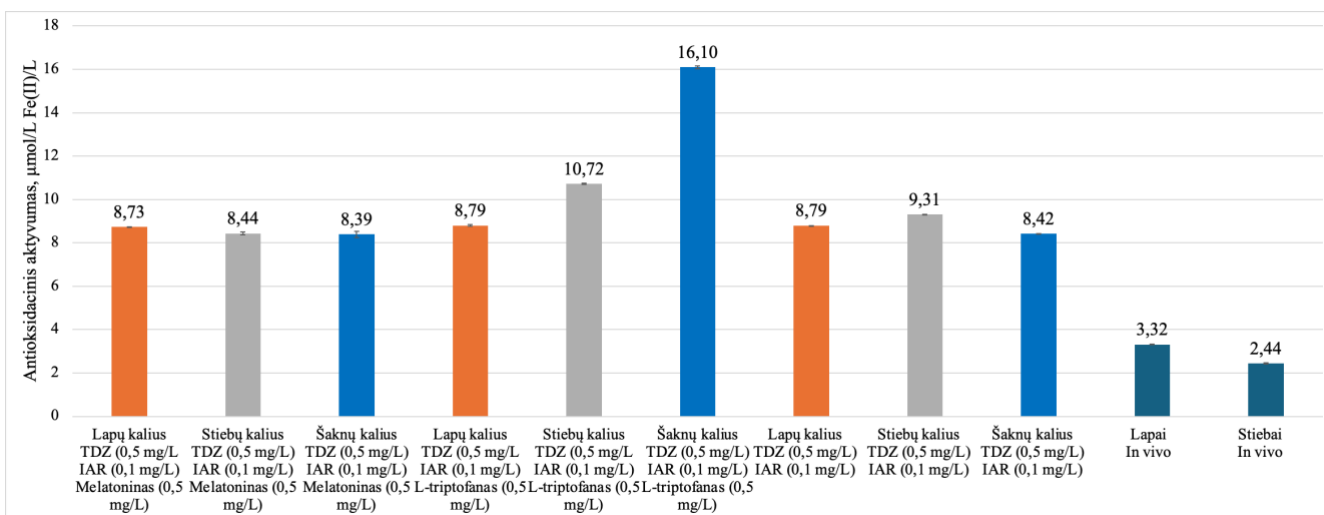


3.9 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Analizuojant augimo stimuliatorių įtaką antioksidaciniam aktyvumui, nustatyta, kad *L*-triptofano priedas mitybinėje terpėje aktyvino DPPH radikalo skaidymą. Tuo tarpu *in vivo* augusių medetkų ekstraktuose DPPH radikalo slopinimas buvo mažiausias, kuomet antioksidantų, tokių kaip flavonoidai, fenoliniai junginiai ir fenolinės rūgštys, koncentracijos buvo didžiausios. Tai gali reikšti, jog antioksidacinis aktyvumas priklauso ne tik nuo šių junginių koncentracijos, bet ir nuo jų biologinio prieinamumo ar struktūrinių savybių.

### 3.10. Antioksidacinis aktyvumas FRAP metodu

Antioksidacinio įvertinimo FRAP metodu tyrimo metu gauti rezultatai (3.10 pav.) buvo panašūs į prieš tai atliktą antioksidacinio aktyvumo tyrimą DPPH metodu (3.9 pav.). Didžiausias aktyvumas nustatytas šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,5 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), kuomet rezultatas siekė 16,10  $\mu\text{mol/L Fe(II)/L}$ . Mažiausias aktyvumas buvo nustatytas *in vivo* medetkos stiebų ekstraktuose – 2,44  $\mu\text{mol/L Fe(II)/L}$ .

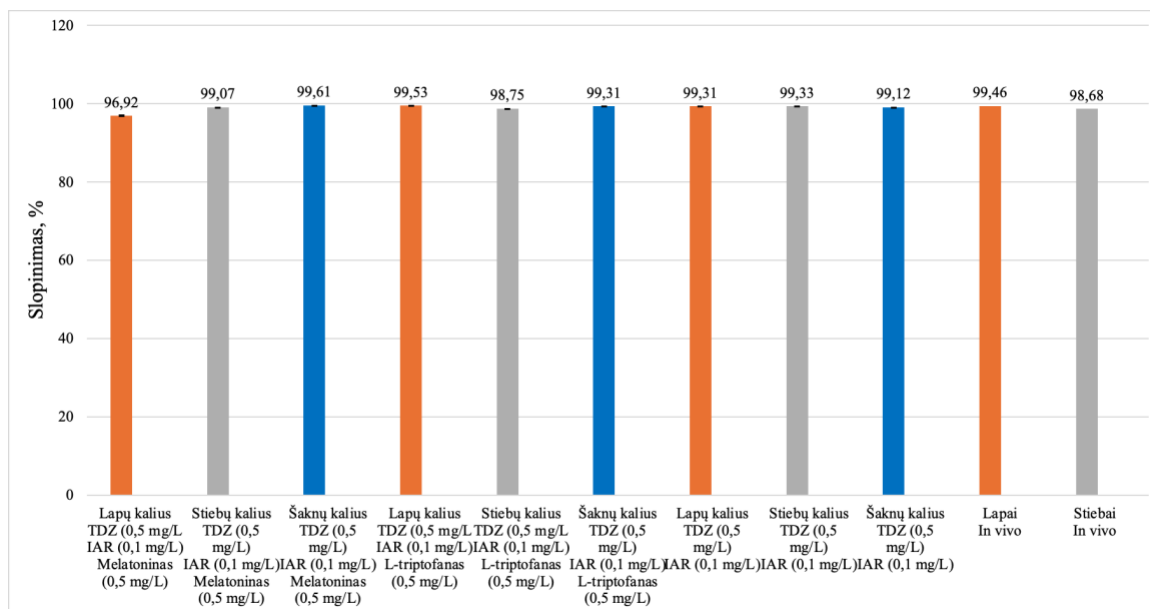


3.10 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad *in vitro* augusių kaliaus kultūrų ekstraktai pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su *in vivo* medetkos lapų ir stiebų ekstraktais. Ypač reikšmingą poveikį turėjo *L*-triptofanas (0,5 mg/L), kuris didino antioksidacinį aktyvumą, skatindamas geležies trivalentės ( $Fe^{3+}$ ) redukciją į geležies divalentę ( $Fe^{2+}$ ). Tai rodo, kad fitohormonai ir augimo stimulatoriai turėjo įtakos antioksidaciniam aktyvumui. Skirtumai tarp *in vitro* ir *in vivo* ekstraktų antioksidacinio aktyvumo taip pat rodo, kad auginimo sąlygos veikia antioksidacinių junginių kaupimąsi ir prieinamumą.

### 3.11. Antioksidacinis aktyvumas ABTS metodu

Antioksidacinio aktyvumo įvertinimu ABTS metodu siekiama nustatyti vaistinės medetkos ekstraktų gebėjimą neutralizuoti ABTS radikalą.

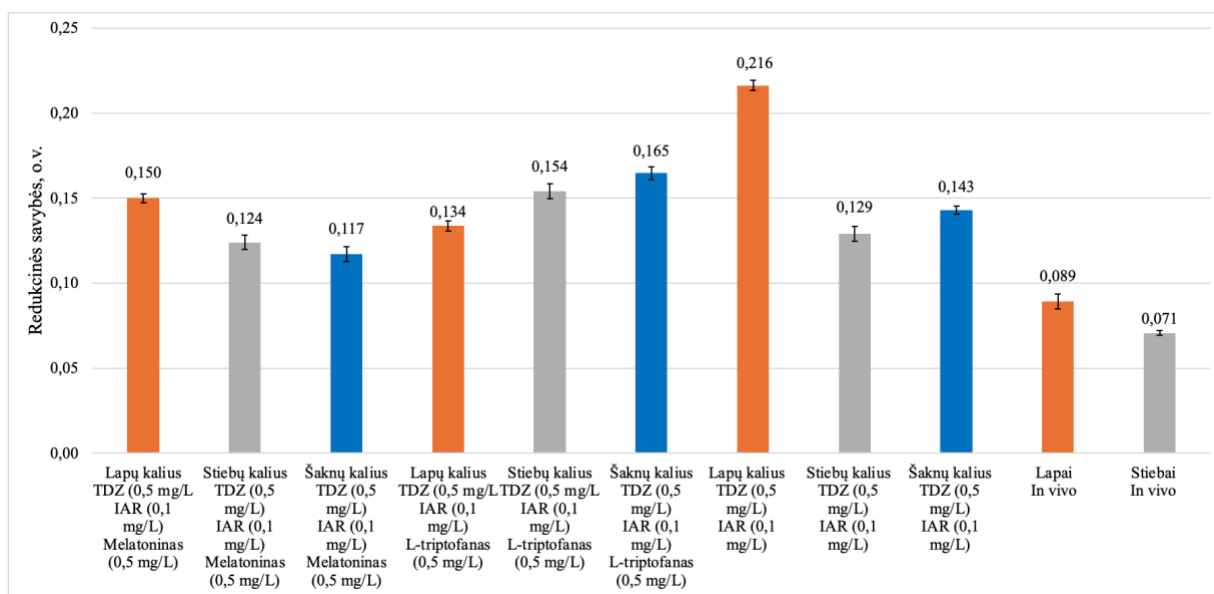


3.11 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

Tyrimo metu gauti rezultatai (3.11 pav.) rodo, kad beveik visi vaistinės medetkos *in vivo* ir *in vitro* ekstraktai pasižymėjo panašiu gebėjimu neutralizuoti ABTS radikalą, o radikalo slopinimas siekė 99 %. Mažesniu slopinimu pasižymėjo lapų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktai, kuomet slopinimas siekė 96,92 %.

### 3.12. Redukcinių savybių įvertinimas

Analizuojant vaistinės medetkos redukcines savybes (3.12 pav.), nustatyta, jog didžiausia šviesos sugertis buvo gauta lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L), ekstraktuose – 0,216 o.v. Žinoma, kad kuo didesnė tiriamo ekstrakto šviesos sugertis, tuo didesnės jo redukcinės (antioksidacinės) savybės. Mažiausia šviesos sugertis buvo gauta *in vivo* augusių medetkos stiebų ekstraktuose – 0,071 o.v. Tai atitinkamai rodo 54 % mažesnes redukcines savybes, lyginant su *in vitro* stiebų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktais.

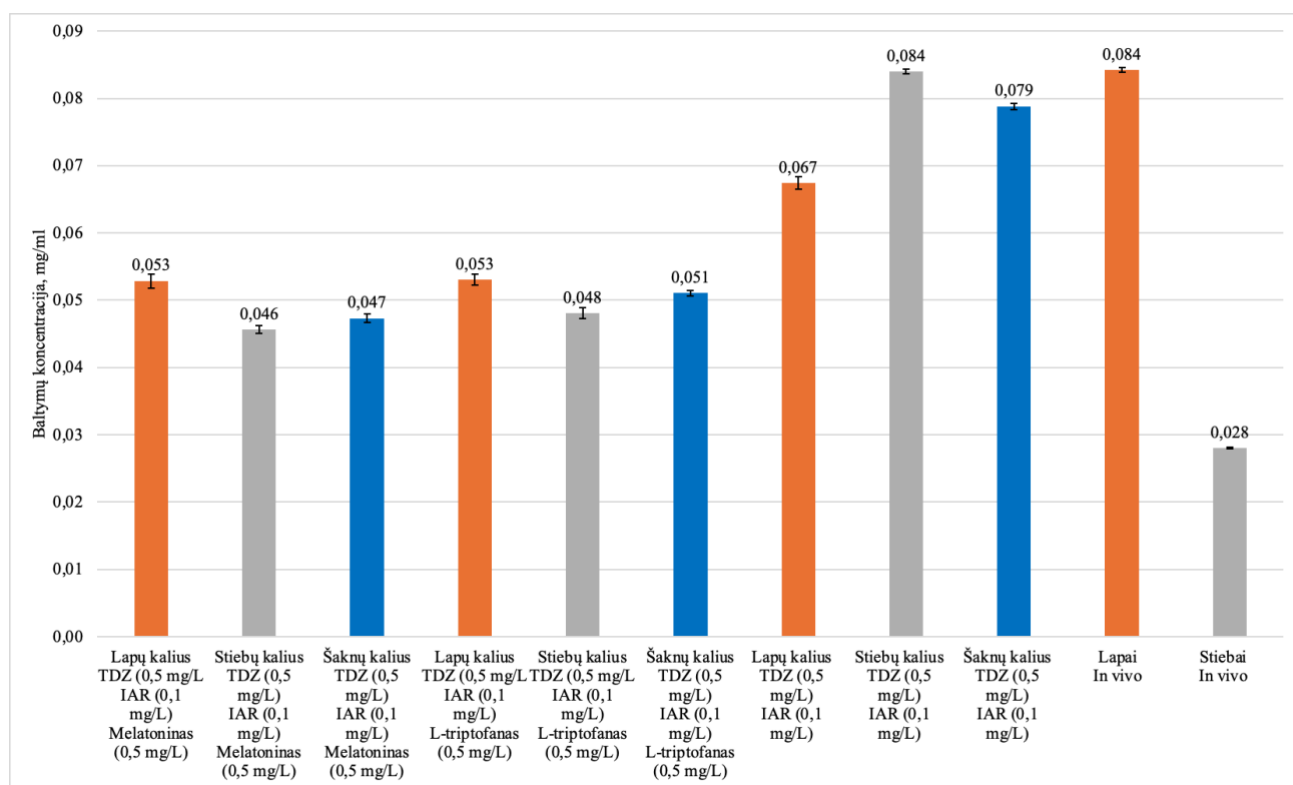


3.12 pav. Redukcinių savybių įvertinimas

Pagal gautus rezultatus galima teigti, jog *in vitro* sąlygomis augintos vaistinės medetkos kaliaus kultūrų redukcinės savybės yra reikšmingai didesnės nei *in vivo* augusios medetkos. Tai rodo didesnę atsaką į patiriamą stresą augimo metu.

### 3.13. Baltymų koncentracijos įvertinimas

Atlikto tyrimo metu gauti rezultatai (3.13 pav.) rodo, kad kaliaus kultūros mitybinės terpės papildymas tik TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonais lėmė didesnę baltymų sintezę, lyginant su kaliaus kultūrų, augusių melatoninu ir *L*-triptofanu praturtintose *in vitro* terpėse, ekstraktais. Didžiausia baltymų koncentracija buvo nustatyta *in vivo* medetkos lapų ir stiebo kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L), ekstraktuose – 0,084 mg/ml. Šiek tiek mažesnė koncentracija buvo nustatyta toje pačioje kontrolinėje terpėje augusių šaknų kaliaus kultūrų ekstraktuose – 0,079 mg/ml. Tuo tarpu mažiausia baltymų koncentracija siekė 0,028 mg/ml *in vivo* stiebų ekstraktuose.

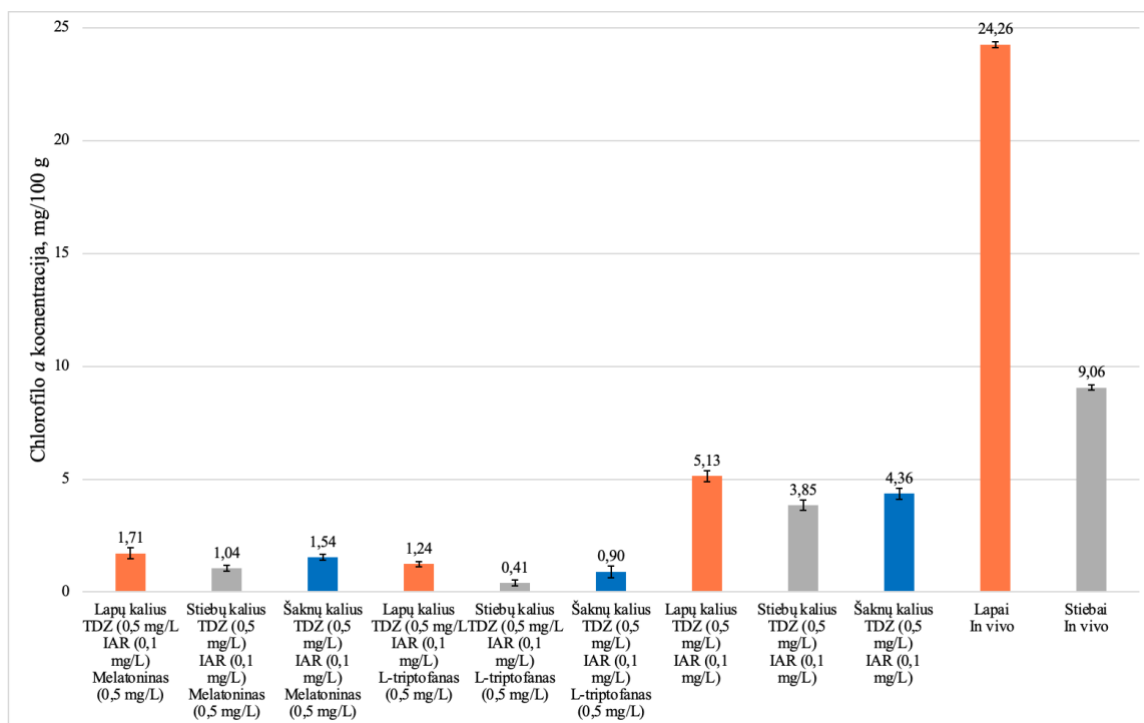


3.13 pav. Baltymų koncentracijos įvertinimas

Vertinant fitohormonų ir augimo stimuliatorių įtaka baltymų sintezei, galima teigti, jog *L*-triptofano ir melatonino poveikis yra panašus. Tuo tarpu kontrolinėje terpėje, naudojant tik TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonus, baltymų koncentracija buvo žymiai didesnė. Tai galima vertinti kaip optimalią terpę baltymų sintezei, skatinančią pirminį metabolinį aktyvumą vaistinės medetkos kaliaus kultūrose.

### 3.14. Chlorofilų *a* ir *b* koncentracijos įvertinimas

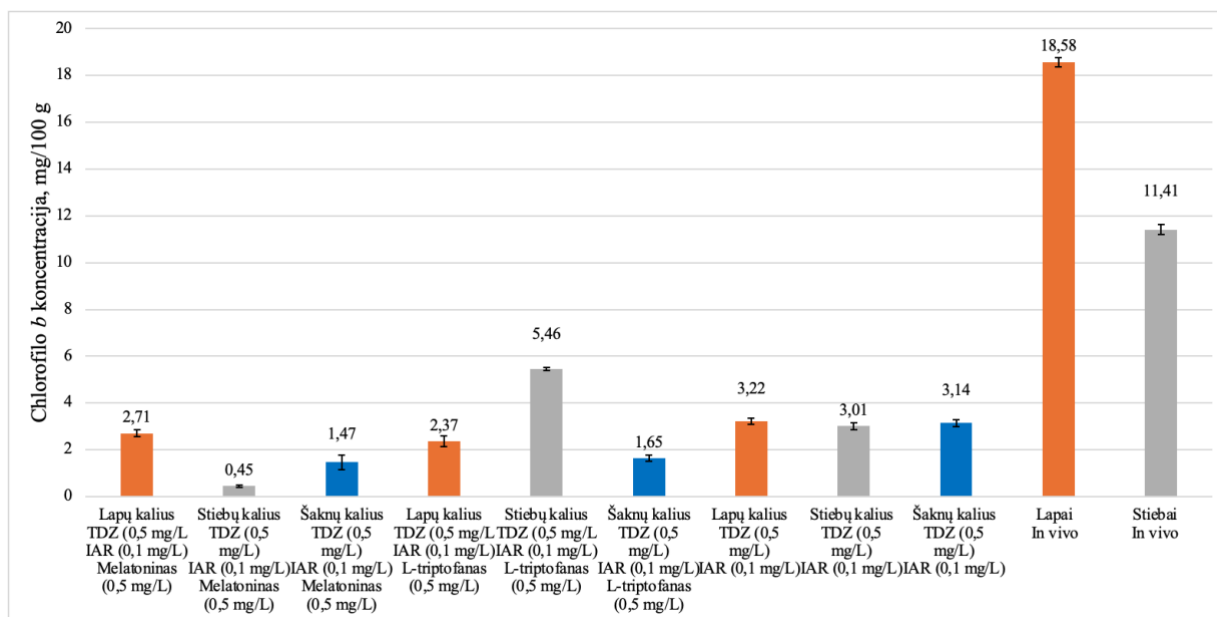
Atlikto pigmentų (chlorofilo *a* ir *b*) koncentracijų vertinimo vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų ir *in vivo* ekstraktuose tyrimo rezultatai pavaizduoti 3.14 paveiksle. Didžiausia chlorofilo *a* koncentracija buvo nustatyta *in vivo* lapų ekstraktuose – 24,26 mg/100 g. *In vivo* stiebų ekstraktuose nustatyta 63 % mažesnė koncentracija ir siekė 9,06 mg/100 g. Mažiausia koncentracija buvo nustatyta stiebų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktuose - 0,41 mg/100 g.



3.14 pav. Chlorofilo *a* koncentracijos įvertinimas

Nustatyta, kad kaliaus kultūrų, augusių kontrolinėje mitybinėje terpėje, papildytoje tik TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonais, chlorofilo *a* koncentracijos buvo didesnės, lyginant su kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje papildytoje melatoninu (0,5 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktų tyrimais.

Chlorofilo *b* koncentracijų rezultatai matomi 3.15 paveiksle. Gauti rezultatai rodo, kad didžiausia chlorofilo *b* koncentracija taip pat buvo nustatyta *in vivo* lapų ekstraktuose ir siekė 18,58 mg/100 g, o *in vivo* stiebų ekstraktuose koncentracija buvo 39 % mažesnė – 11,41 mg/100 g.



3.15 pav. Chlorofilo *b* koncentracijos įvertinimas

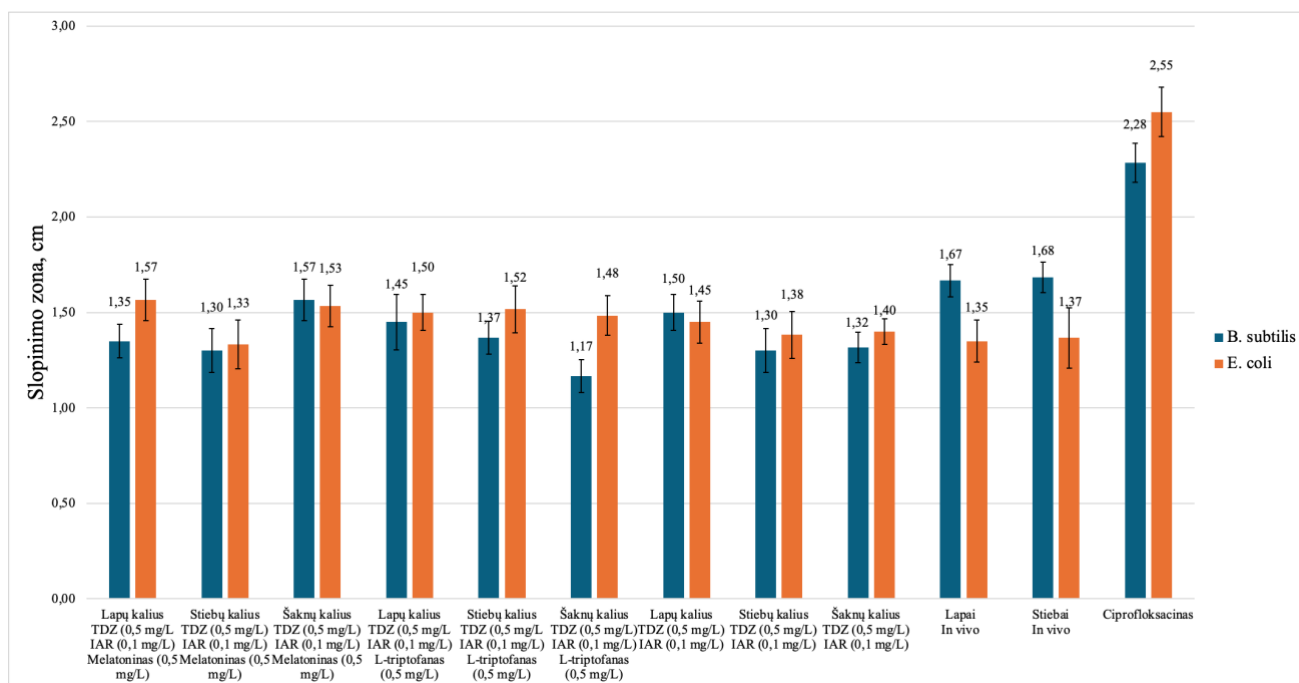
Tyrimo metu buvo pastebėtas neigiamas melatonino poveikis chlorofilo *b* sintezei. Mažiausia koncentracija nustatyta *in vitro* stiebo kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su TDZ (0,5 mg/), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktuose, kuomet rezultatas siekė 0,45 mg/100 g. Toje pačioje terpėje kultivuočių šaknų ir lapų kaliaus kultūrų ekstraktuose koncentracija buvo atitinkamai 83 % ir 69 % didesnė.

Mažos pigmentų koncentracijos *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktuose, lyginant su *in vivo* audiniais, gali būti paaiškinamos augimo sąlygų skirtumu. Kaliaus kultūros augimo metu gauna mažiau natūralios šviesos, o tai gali lemti mažesnę fotosintetinančių pigmentų sintezę.

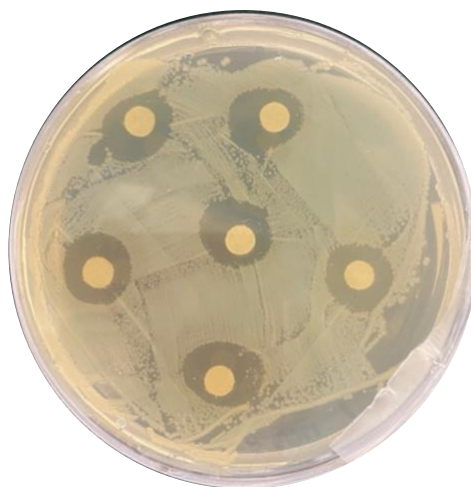
### 3.15. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Antibakterinis aktyvumas buvo tiriamas prieš *E. coli* ir *B. subtilis* bakterijas. Kontroliniame variante buvo naudojamas antibiotikas ciprofloksacinas.

Gautuose rezultatuose (3.16 pav.) matoma, kad prieš *E. coli* didžiausias slopinimo poveikis nustatytas naudojant lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktus, kuomet slopinimo zona siekė 1,57 cm (3.17 pav.). Mažiausia slopinimo zona įvertinta panaudojus toje pačioje terpėje kultivuočių stiebo kaliaus kultūrų ekstraktus, kuomet aktyvumas buvo 15 % mažesnis ir siekė 1,33 cm.

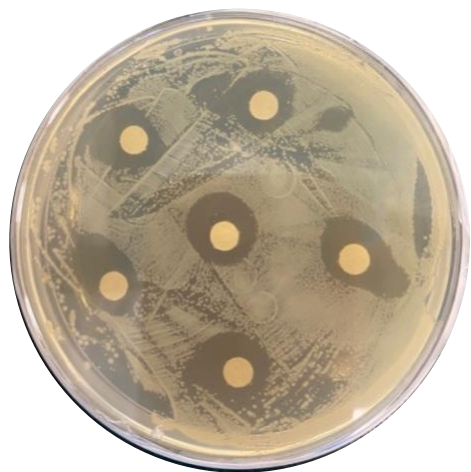


3.16 pav. Antibakterinio aktyvumo prieš *E. coli* ir *B. subtilis* įvertinimas



**3.17 pav.** Lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *E. coli*

Vertinant antibakterinį aktyvumą prieš *B. subtilis*, didžiausiu aktyvumu pasižymėjo vaistinės medetkos *in vivo* stiebų ekstraktai, kuomet slopinimo zona siekė 1,68 cm (3.18 pav.). Šiek tiek mažesniu aktyvumu pasižymėjo *in vivo* lapų ekstraktai, kuomet slopinimo zona buvo tik 1 mm mažesnė ir siekė 1,67 cm. Vertinant *in vitro* kaliaus kultūrų aktyvumą, didžiausias *B. subtilis* slopinimas buvo nustatytas panaudojus šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktus, slopinimo zonai siekiant 1,57 cm (3.18 pav.). Mažiausias poveikis bakterijų slopinimui buvo įvertintas šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktuose, slopinimo zonai siekiant 1,17 cm.



**3.18 pav.** Šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *B. subtilis*

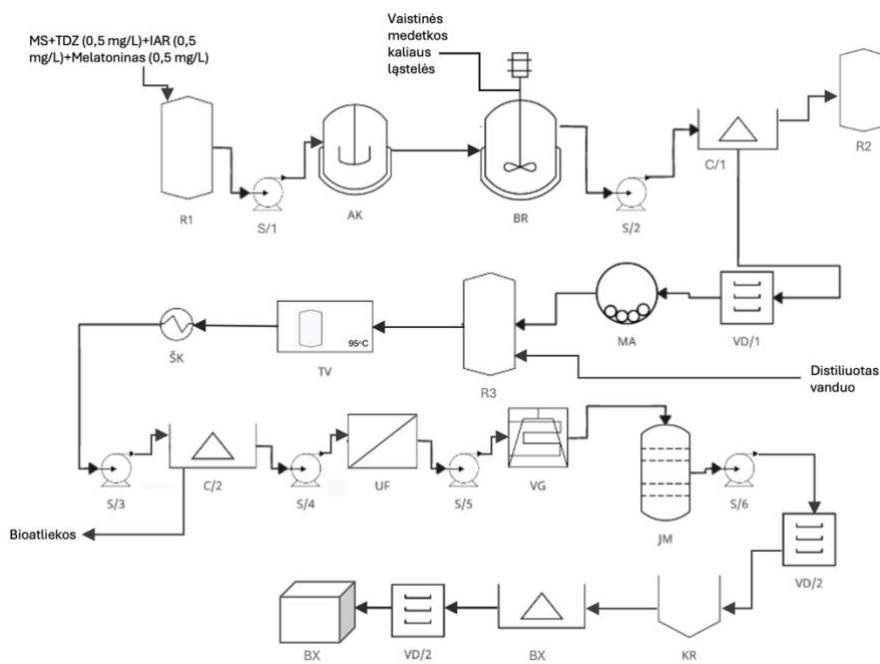
Vertinant augimo stimuliatorių įtaką antibakteriniam aktyvumui, *L*-triptofanas pasižymėjo didesniu poveikiu antibakteriniam aktyvumui prieš *E. coli*, kuomet melatoninas gerino *B. subtilis* aktyvumo slopinimą.

#### 4. Rekomendacijų dalis

*L*-proolino išskyrimas iš vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) kaliaus kultūrų ir gryninimas iliustruojamas aparatūrinėje schemeje (4.1 pav.). Atsižvelgiant į atliktus tyrimus (3.5 pav.), *in vitro* kaliaus kultūros ląstelės kultivuojamos skystoje MS terpėje su 0,5 mg/L TDZ ir 0,1 mg/L IAR fitohormonais bei 0,5 mg/L melatonino priedu, siekiant padidinti *L*-proolino koncentraciją.

Procesas pradedamas terpės paruošimu rezervuare (R1), kuriame sumaišoma mitybinė terpė su 0,5 mg/L TDZ ir 0,1 mg/L IAR fitohormonais bei 0,5 mg/L melatonino priedu. Mitybinė terpė su augimo regulatoriais sterilizuojama autoklave (AK), siekiant sumažinti užterštumo riziką. Terpė su medetkos kaliaus kultūros ląstelėmis yra perkeliama į bioreaktorių (BR). Suspensija maišoma 100 aps/min, 25 °C temperatūroje ir peristaltiniu siurbliu (S/2) perkeliama į centrifugą (C/1). Supernatantas atskiriamas nuo kietų nuosėdų ir pašalinamas, o nuosėdos džiovinamos vakuuminėje džiovyklėje (VD/1). Norint, kad bioaktyviojo junginio ekstrakcija būtų efektyvesnė, išdžiovinta kaliaus kultūra yra susmulkinama malūne (MA).

Rezervuare (R3) džiovinta biomasė sumaišoma su distiliuotu vandeniu. *L*-proolino ekstrakcija vykdoma termostatinėje vonelėje (TV), nuolat maišant suspensiją 95 °C temperatūroje, 30 minučių. Po ekstrakcijos suspensija per šilumokaitį nukreipiama į centrifugą (C/2), kurioje atskiriama kietoji fazė nuo skystosios fazės. Skystoji fazė gryninama ultrafiltruojant (UF) ir perkeliama į vakuuminį garintuvą (VG), o kietoji fazė pašalinama kaip bioatliekos. Produkto gryninimas vykdomas naudojant jonų mainų chromatografiją (JM), po kurios ekstraktas papildomai džiovinamas džiovyklėje (VD/2), išgarinant tirpiklį, ir kristalizuojamas aušinimo kristalizacijos būdu (KR), palaipsniui mažinant temperatūrą. Susidarę kristalai atskiriami centrifugavimo būdu (C/3) ir išdžiovinami vakuuminėje džiovyklėje (VD/3). Galutinis produktas įvertinamas atliekant kokybės tyrimus ir supakuojamas (BX) sandėliavimui.



4.1 pav. *L*-proolino gavimo iš *Calendula officinalis* L. kaliaus kultūrų aparatūrinė schema

**4.1 lentelė. Aparatūrinėje schemoje naudojamų dalių sąrašas**

<b>Prietaiso žymėjimas</b>	<b>Prietaisas</b>
R1-R3	Rezervuaras
AK	Autoklavas
BR	Bioreaktorius
S/1-S/6	Peristaltinis siurblys
C/1-C/3	Centrifuga
VD/1-VD/2	Vakuuminė džiovyklė
MA	Rutulinis malūnas
TV	Terminė vonelė
UF	Ultrafiltras
VG	Vakuuminis garintuvas
JM	Jonų mainų chromatografija
KR	Kristalizacija
ŠK	Šilumokaitis

## Išvados

1. Didžiausios fenolinių junginių, fenolinių rūgščių, flavonoidų ir malondialdehido koncentracijos buvo nustatytos vaistinės medetkos (lot. *Calendula officinalis* L.) lapų *in vivo* ekstraktuose, kuomet rezultatai atitinkamai siekė 0,28 mg/100 g, 5,56%, 13,72 mg/g ir 0,94 μmol/g. Melatonino (0,5 mg/L) ir *L*-triptofano (0,5 mg/L) priedas mitybinėje terpėje atitinkamai reikšmingai padidino *in vitro* stiebų ir lapų kaliaus kultūrų ekstraktuose aptinkamas koncentracijas. Didžiausia bendrųjų antocianinų koncentracija ir superoksido dismutazės aktyvumas buvo nustatytas *in vitro* lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,1 mg/L) fitohormonais, ekstraktuose. Tuo tarpu *in vitro* šaknų kaliaus kultūrų, augusių terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktuose nustatyta didžiausia *L*-prolino koncentracija – 511,48 μmol/g.
2. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas DPPH ir FRAP metodais, buvo nustatytas šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir *L*-triptofanu (0,5 mg/L), ekstraktuose. ABTS metodo tyrimo metu beveik visuose ekstraktuose aktyvumas siekė 99 %. Mažiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su fitohormonais ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktuose. Didžiausios redukcinės savybės buvo nustatytos TDZ (0,5 mg/L) ir IAR (0,5 mg/L) fitohormonais papildytoje MS terpėje augusių lapų kaliaus kultūrų ekstraktuose.
3. Atliktuose pirminių metabolitų koncentracijų tyrimuose, didžiausia baltymų koncentracija buvo nustatyta stiebų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su 0,5 mg/L TDZ ir 0,1 mg/L IAR fitohormonais, ir *in vivo* medetkos lapų ekstraktuose – 0,084 mg/ml. Chlorofilo *a* ir *b* didžiausios koncentracijos buvo nustatytos *in vivo* lapų ekstraktuose, kuomet koncentracijos atitinkamai siekė 24,26 ir 18,28 mg/100 g. *L*-triptofano (0,5 mg/L) ir melatonino (0,5 mg/L) pridėjimas į augimo mitybinę terpę didelio poveikio nepadarė.
4. Nustačius vaistinės medetkos *in vitro* kaliaus kultūrų in *in vivo* ekstraktų antibakterinį poveikį prieš *E. coli*, didžiausia slopinimo zona buvo įvertinta panaudojant lapų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktus – 1,57 cm. Didžiausias antibakterinis poveikis prieš *B. subtilis* buvo nustatytas panaudojus *in vivo* stiebų ekstraktus, kuomet slopinimo zona siekė 1,68 cm. Taip pat pastebėtas *in vitro* kaliaus kultūrų ekstraktų reikšmingas poveikis, kurį atskleidė šaknų kaliaus kultūrų, augusių MS terpėje su TDZ (0,5 mg/L), IAR (0,1 mg/L) ir melatoninu (0,5 mg/L), ekstraktai, kuomet slopinimo zona siekė 1,57 cm. Tai rodo, kad melatoninas (0,5 mg/L) turėjo reikšmingos įtakos medetkos kaliaus kultūrų antibakterinėms savybėms.

## Literatūros sąrašas

1. ROLNIK, A. ir OLAS, B. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International Journal of Molecular Sciences*. [interaktyvus]. 2021, 22 [žiūrėta 2026-03-11]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms22063009.
2. ASHWLAYAN, V. D. ir VERMA, M. Therapeutic potential of *Calendula officinalis*. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*. [interaktyvus]. 2018, 6 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.15406/ppij.2018.06.00171.
3. RAGAŽINSKIENĖ, O. Lietuvoje išrinktas 2025 metų populiarus „Vaistinis augalas“ – vaistinė medetka. [interaktyvus]. [žiūrėta 2026-04-09]. Prieiga per: <https://www.lfsajunga.lt/post/lietuvoje-issrinktas-2025-metu-populiarus-vaistinis-augalas-vaistine-medetka>.
4. FATIMA, T.; MUJIB, A.; BANSAL, Y.; DEWIR, Y. H. ir MENDLER-DRIENYOVSZKI, N. Indirect organogenesis of *Calendula officinalis* L. and comparative phytochemical studies of field-grown and in vitro-regenerated tissues. *Agronomy*. [interaktyvus]. 2024, 14(8) [žiūrėta 2026-03-14]. Prieiga per doi: 10.3390/agronomy14081743.
5. ARUMUGAM, T.; AYYANAR, M.; PILLAI, Y. J. K. ir SEKAR, T. Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. [interaktyvus]. 2011, 6, 55–60 [žiūrėta 2026-03-14]. Prieiga per doi: 10.3329/bjp.v6i1.8555.
6. DEVKOTA, H. P. An overview of medicinal plants of the Asteraceae family and their role in human health. *Medicinal Plants of the Asteraceae Family: Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities* [interaktyvus]. Springer Nature Singapore, 2022, p. 1–15. [žiūrėta 2026-03-07]. ISBN 978-981-19-6080-2. Prieiga per doi: 10.1007/978-981-19-6080-2\_1
7. GUDŽINSKAS, Z. Graižas. [interaktyvus]. [žiūrėta 2026-04-09]. Prieiga per: <https://www.vle.lt/straipsnis/graižas/>.
8. ZHANG, T. ir ELOMAA, P. Development and evolution of the *Asteraceae* capitulum. *New Phytologist*. [interaktyvus]. 2024, 242, 33–48 [žiūrėta 2026-03-28]. Prieiga per doi: 10.1111/nph.19590.
9. CAI, B. Common marigold at the UBC Botanical Garden in British Columbia, Canada. [interaktyvus]. [žiūrėta 2026-04-09]. Prieiga per: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=40667475>.
10. AYDIN ACAR, C.; GENCER, M. A.; PEHLIVANOGLU, S.; YESILOT, S. ir DONMEZ, S. Green and eco-friendly biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Calendula officinalis* flower extract: wound healing potential and antioxidant activity. *International Wound Journal*. [interaktyvus]. 2024, 21, e14413 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.1111/iwj.14413.
11. ČETIN, B.; KURTULUŞ, B. ir BİNGÖL, N. A. Effects of plant growth regulators on callus formation in different explant of *Calendula officinalis* L. [interaktyvus]. [žiūrėta 2026-03-22].
12. EFFERTH, T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*. [interaktyvus]. 2019, 5, 50–59 [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.1016/j.eng.2018.11.006.
13. BAKHTIAR, Z.; KHALILI, F. A.; GHASEMI, M. ir MIRJALILI, M. H. Micropropagation, callus induction and cell culture establishment of *Zataria multiflora* (Lamiaceae): an efficient biotechnological platform for the production of rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products*.

- [interaktyvus]. 2025, 226, 120701 [žiūrėta 2026-03-08]. Prieiga per doi: 10.1016/j.indcrop.2025.120701.
14. ALSALEH, M. M. ir kt. Impact of various combinations of phytohormones on the in vitro cultivation of *Ammi visnaga* (L.) Lam microshoots and calli. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. [interaktyvus]. 2025, 160, 56 [žiūrėta 2026-03-22]. Prieiga per doi: 10.1007/s11240-025-02984-w.
  15. MAZRI, M. A. ir kt. In vitro responses of some Mediterranean fruit crops to auxin, cytokinin and gibberellin treatments. *Auxins, Cytokinins and Gibberellins Signaling in Plants* [interaktyvus]. Springer, 2022, p. 91–123. [žiūrėta 2026-03-26]. ISBN 978-3-031-05427-3. Prieiga per doi: 10.1007/978-3-031-05427-3\_5.
  16. ALI, H. M.; KHAN, T.; KHAN, M. A. ir ULLAH, N. The multipotent thidiazuron: a mechanistic overview of its roles in callogenesis and other plant cultures in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. [interaktyvus]. 2022, 69, 2624–2640. [žiūrėta 2026-04-03]. Prieiga per doi: 10.1002/bab.2311.
  17. ERLAND, L. A. E. ir SAXENA, P. Auxin driven indoleamine biosynthesis and the role of tryptophan as an inductive signal in *Hypericum perforatum* (L.). *PLoS ONE*. [interaktyvus]. 2019, 14, 1–22 [žiūrėta 2026-03-22]. Prieiga per doi: 10.1371/journal.pone.0223878.
  18. ROSA, R. ir kt. Effect of L-tryptophan and L-glutamic acid on carrot yield and its quality. *Agronomy*. [interaktyvus]. 2023, 13, 562 [žiūrėta 2026-04-03]. Prieiga per doi: 10.3390/agronomy13020562.
  19. TOKYO CHEMICAL INDUSTRY. L-Tryptophan. [interaktyvus]. [žiūrėta 2026-04-09]. Prieiga per: <https://www.tcichemicals.com/IN/en/p/T0541>
  20. KLEIN, R. M.; CAPUTO, E. M. ir WITTERHOLT, B. A. The role of zinc in the growth of plant tissue cultures. *American Journal of Botany*. [interaktyvus]. 1962, 49, 323–327 [žiūrėta 2026-03-26]. Prieiga per doi: 10.1002/j.1537-2197.1962.tb14945.x.
  21. XUAN, Y.; FENG, W.; LAI, Z. ir LIU, S. Effects of aromatic amino acids on callus growth and accumulation of secondary metabolites in amaranth. *Tropical Plants*. [interaktyvus]. 2024, 3 [žiūrėta 2026-03-26]. Prieiga per doi: 10.48130/tp-0024-0034.
  22. ULLAH, M. A. ir kt. Effect of ultraviolet-C radiation and melatonin stress on biosynthesis of antioxidant and antidiabetic metabolites produced in in vitro callus cultures of *Lepidium sativum* L. *International Journal of Molecular Sciences*. [interaktyvus]. 2019, 20 [žiūrėta 2026-03-21]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms20071787.
  23. BANO, A. S. ir kt. Callus induction, proliferation, enhanced secondary metabolites production and antioxidants activity of *Salvia moorcroftiana* L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin and melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. [interaktyvus]. 2022, 65 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.1590/1678-4324-2022210200.
  24. CAI, H.; LI, J.; LI, J. ir TENG, H. Melatonin — angel of plant growth regulation and protection. *Advanced Agrochem*. [interaktyvus]. 2025, 4, 114–122 [žiūrėta 2026-04-07]. Prieiga per doi: 10.1016/j.aac.2025.01.001.
  25. CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. ir ARNAO, M. B. Role of exogenous melatonin in plant biotechnology: physiological and applied aspects. *Critical Reviews in Plant Sciences*. [interaktyvus]. 2024, 43, 395–404 [žiūrėta 2026-03-21].

26. IQBAL, R. ir KHAN, T. Application of exogenous melatonin in vitro and in planta: a review of its effects and mechanisms of action. *Biotechnology Letters*. [interaktyvus]. 2022, 44, 933–950 [žiūrėta 2026-03-26]. Prieiga per doi: 10.1007/s10529-022-03270-x.
27. MEDCHEMEXPRESS. Melatonin. [interaktyvus]. [žiūrėta 2024-04-23]. Prieiga per: [https://www.medchemexpress.com/Melatonin.html?srsId=AfmBOoLdHs7C75U96QdZNB3xUQNsmzQIXf398q\\_O8AmoF2vEVBqL3nB](https://www.medchemexpress.com/Melatonin.html?srsId=AfmBOoLdHs7C75U96QdZNB3xUQNsmzQIXf398q_O8AmoF2vEVBqL3nB).
28. DURAN, R. E.; KILIC, S. ir COSKUN, Y. Melatonin influence on *in vitro* callus induction and phenolic compound production in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. [interaktyvus]. 2019, 55, 468–475 [žiūrėta 2026-03-15]. Prieiga per doi: 10.1007/s11627-019-10006-6.
29. SAPKOTA, B. ir KUNWAR, P. A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn. *Natural Product Communications*. [interaktyvus]. 2024, 19 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.1177/1934578X241259021.
30. GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. [interaktyvus]. 2020, 94, 651–715 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.1007/s00204-020-02689-3.
31. LOURENÇO, S. C.; MOLDÃO-MARTINS, M. ir ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications. *Molecules*. [interaktyvus]. 2019, 24 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules24224132.
32. PANDEY, P. ir DESPANDE, B. Antioxidant activity in the leaves and petals of *Calendula officinalis* Linn. *Asian Pacific Journal of Health Sciences*. [interaktyvus]. 2022, 9, 130–132 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.21276/apjhs.2022.9.2.26.
33. GONCHARUK, E. A. ir kt. Effects of hydrogen peroxide on *in vitro* cultures of tea (*Camellia sinensis* L.) grown in the dark and in the light: morphology, content of malondialdehyde, and accumulation of various polyphenols. *Molecules*. [interaktyvus]. 2022, 27, 6674 [žiūrėta 2026-03-26]. Prieiga per doi: 10.3390/molecules27196674.
34. GOLOVATSKAYA, I. F.; BOYKO, E. V.; REZNICHENKO, A. E. ir PLYUSNIN, I. N. Melatonin and selenium regulate growth and oxidative status of *Saussurea orgaadayi in vitro* cell cultures derived from different explants. *Russian Journal of Plant Physiology*. [interaktyvus]. 2020, 67, 1036–1045 [žiūrėta 2026-03-22]. Prieiga per doi: 10.1134/S1021443720050052.
35. FATHI, A. ir kt. Reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems in enhancing plant resilience against abiotic stress. *International Journal of Agronomy*. [interaktyvus]. 2025, 2025 [žiūrėta 2026-03-22].
36. SINGH, M. ir kt. Organoleptic properties *in vitro* and *in vivo* pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn: an over review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. [interaktyvus]. 2011, 3(4), 655–663 [žiūrėta 2026-03-07].
37. NAKAI, K. ir TSURUTA, D. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases? *International Journal of Molecular Sciences*. [interaktyvus]. 2021, 22 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms221910799.
38. CARILLON, J.; ROUANET, J.; CRISTOL, J. ir BRION, R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and

- proposal of an original mechanism of action. *Pharmaceutical Research*. [interaktyvus]. 2013, 30, 2718–2728 [žiūrėta 2026-03-30]. Prieiga per doi: 10.1007/s11095-013-1113-5.
39. BANSAL, Y. ir kt. Development of a callus culture for increased yield of secondary metabolite production in spider lily (*Crinum asiaticum* L.). *HortScience*. [interaktyvus]. 2025, 60, 1268–1275 [žiūrėta 2026-03-22]. Prieiga per doi: 10.21273/HORTSCI18602-25.
  40. GOENAWAN, Y. A.; KHODJOJO, K. K.; HARDJO, P. H. ir PURWANTO, M. G. M. Lycopene content in several ages of tomato callus (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rampai). *Agric. F*[interaktyvus]. 2022, 34, 89–104 [žiūrėta 2026-04-28]. Prieiga per doi: 10.24246/agric.2022.v34.i1.p89-104.
  41. AYUB, A. ir kt. Glutathione and biosensor technologies: enhancing plant resilience to environmental stressors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. [interaktyvus]. 2025, 136, 102570 [žiūrėta 2026-03-30]. Prieiga per doi: 10.1016/j.pmpp.2025.102570.
  42. SADOWSKA-BARTOSZ, I. ir BARTOSZ, G. Antioxidant activity of anthocyanins and anthocyanidins: a critical review. *International Journal of Molecular Sciences*. [interaktyvus]. 2024, 25, 12001 [žiūrėta 2026-04-01]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms252212001.
  43. AMOGNE, N. Y.; AYELE, D. W. ir TSIGIE, Y. A. Recent advances in anthocyanin dyes extracted from plants for dye sensitized solar cell. *Materials for Renewable and Sustainable Energy*. [interaktyvus]. 2020, 9, 23 [žiūrėta 2026-04-28]. Prieiga per doi: 10.1007/s40243-020-00183-5.
  44. MURTHY, H. N.; JOSEPH, K., PAEK, K. ir PARK, S. Anthocyanin production from plant cell and organ cultures in vitro. *Plants*. [interaktyvus]. 2023, 13, 117 [žiūrėta 2026-04-02]. Prieiga per doi: 10.3390/plants13010117.
  45. EDO, G. I. ir kt. A review on the composition, extraction and applications of phenolic compounds. *Ecological Frontiers*. [interaktyvus]. 2025, 45, 7–23 [žiūrėta 2026-03-30]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ecofro.2024.09.008.
  46. DE OLIVEIRA, I.; SANTOS-BUELGA, C.; AQUINO, Y.; BARROS, L. ir HELENO, S.. New frontiers in the exploration of phenolic compounds and other bioactives as natural preservatives. *Food Bioscience*. [interaktyvus]. 2025, 68, 106571 [žiūrėta 2026-03-30]. Prieiga per doi: 10.1016/j.fbio.2025.106571.
  47. KUMAR, N. ir GOEL, N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. [interaktyvus]. 2019, 24, e00370 [žiūrėta 2026-04-38]. Prieiga per doi: 10.1016/j.btre.2019.e00370.
  48. JANNAH, M. ir DAMANIK, R. I. Production of biomass and flavonoids in black cumin tissue culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. [interaktyvus]. 2023, 1241, 012032 [žiūrėta 2026-03-26]. Prieiga per doi: 10.1088/1755-1315/1241/1/012032.
  49. PARCHETA, M. ir kt. Recent developments in effective antioxidants: the structure and antioxidant properties. *Materials*. [interaktyvus]. 2021, 14 [žiūrėta 2026-03-07]. Prieiga per doi: 10.3390/ma14081984.
  50. OLSZOWY, M. ir DAWIDOWICZ, A. L. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? *Chemical Papers*. [interaktyvus]. 2018, 72, 393–400 [žiūrėta 2026-04-28]. Prieiga per doi: 10.1007/s11696-017-0288-3.
  51. AKAR, Z.; KÜÇÜK, M. ir DOĞAN, H. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal

- herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. [interaktyvus]. 2017, 32, 640–647 [žiūrėta 2026-04-30]. Prieiga per doi: 10.1080/14756366.2017.1284068.
52. ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V.; SELIVANOVA, I. ir TEREKHOV, R. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. [interaktyvus]. 2020, 21, 1131 [žiūrėta 2026-04-30]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms21031131.
  53. RUMPF, J.; BURGER, R. ir SCHULZE, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*. [interaktyvus]. 2023, 233, 123470 [žiūrėta 2026-04-28]. Prieiga per doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123470.
  54. SINGH, M.; PATRA, S. ir SINGH, R. K. Common techniques and methods for screening of natural products for developing of anticancer drugs. *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules*. Academic Press, 2021, p. 323–353. ISBN 978-0-12-821710-8. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-821710-8.00015-1.
  55. ČETIN, B.; KALYONCU, F. ir KURTULUŞ, B. Antibacterial activities of *Calendula officinalis* callus extract. *International Journal of Secondary Metabolite*. [interaktyvus]. 2017, 257–263 [žiūrėta 2026-04-28]. Prieiga per doi: 10.21448/ijsm.372108.
  56. EFENBERGER-SZMECHTYK, M.; NOWAK, A. ir CZYZOWSKA, A. Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. [interaktyvus]. 2021, 61, 149–178 [žiūrėta 2026-03-30]. Prieiga per doi: 10.1080/10408398.2020.1722060.
  57. SCHIAVONE, G. ir kt. Beyond flowers: exploring *Calendula officinalis* aerial parts composition and biological potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. [interaktyvus]. 2026, 74, 104042 [žiūrėta 2026-04-29]. Prieiga per doi: 10.1016/j.bcab.2026.104042.
  58. PEDNEKAR, S. Global *Calendula officinalis* flower extract market size, growth trends & forecast 2026–2034. [interaktyvus]. [žiūrėta 2026-04-28]. Prieiga per: <https://www.verifiedmarketreports.com/product/calendula-officinalis-flower-extract-market/>.
  59. TSALGATIDOU, P. C. ir kt. *Calendula officinalis* — a great source of plant growth promoting endophytic bacteria (PGPEB) and biological control agents (BCA). *Microorganisms*. [interaktyvus]. 2023, 11, 206 [žiūrėta 2026-04-29]. Prieiga per doi: 10.3390/microorganisms11010206.
  60. JONUŠKIENĖ, I.; STANKEVIČIENĖ, R.; KANTMINIENĖ, K. ir TUMOSIENĖ, I. The influence of phytohormones on antioxidative and antibacterial activities in callus cultures of *Hypericum perforatum* L. *Agriculture*. [interaktyvus]. 2023, 13 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.3390/agriculture13081543.
  61. NUTAUTAITĖ, M. ir kt. Evaluation of phenolic compounds and pigments in freshwater *Cladophora glomerata* biomass from various Lithuanian rivers as a potential future raw material for biotechnology. *Water*. [interaktyvus]. 2022, 14 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.3390/w14071138.
  62. YANG, L.; RONG-RONG, C.; JI-LI, F. ir KE, Y. Total anthocyanins and cyanidin-3-O-glucoside contents and antioxidant activities of purified extracts from eight different pigmented plants. *Pharmacognosy Magazine*. [interaktyvus]. 2019, 15, 124 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.4103/pm.pm\_162\_18.

63. ZHANG, X.; PIAO, Y.; CUI, S. ir LEE, Y. Determination of reduced glutathione, cystein and total thiols in pine pollen powder by in situ derivatization. *Microchemical Journal*. [interaktyvus]. 2014, 112, 1–6 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.microc.2013.09.011.
64. ZDUNEK-ZASTOCKA, E.; GRABOWSKA, A.; MICHNIEWSKA, B. ir ORZECZOWSKI, S. Proline concentration and its metabolism are regulated in a leaf age dependent manner but not by abscisic acid in pea plants exposed to cadmium stress. *Cells*. [interaktyvus]. 2021, 10 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.3390/cells10040946.
65. SAVICKA, M. ir SHKUTE, N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija*. [interaktyvus]. 2010, 56 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.2478/v10055-010-0004-x.
66. SANPINIT, S.; GOON, J. ir WETCHAKUL, P. Characterization of the antioxidant activity, identified free radical-relieving components by LC/QTOF/MS and acute oral toxicity studies of Tri-Tharn-Thip tea. *Journal of Agriculture and Food Research*. [interaktyvus]. 2024, 16, 101131 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.1016/j.jafr.2024.101131.
67. SHI, L.; ZHAO, W.; YANG, Z.; SUBBIAH, V. ir SULERIA, H. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*. [interaktyvus]. 2022, 29, 81112–81129 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.1007/s11356-022-23337-6.
68. MINICKAITĖ, R. ir kt. Synthesis of novel aminothiazole derivatives as promising antiviral, antioxidant and antibacterial candidates. *International Journal of Molecular Sciences*. [interaktyvus]. 2022, 23 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.3390/ijms23147688.
69. MÆHRE, H. K.; DALHEIM, L.; EDVINSEN, G.; ELVEVOLL, E. ir JENSEN, I. Protein determination — method matters. *Foods*. [interaktyvus]. 2018, 7 [žiūrėta 2026-05-12]. Prieiga per doi: 10.3390/foods7010005.