



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

**Bioaktyviųjų fitocheminių junginių kaupimo
optimizavimas ir biologinio aktyvumo įvertinimas Notrelinių
(*Lamiaceae*) šeimos augaluose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas

Ernesta Gižaitė
Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė
Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

**Bioaktyviųjų fitocheminių junginių kaupimo
optimizavimas ir biologinio aktyvumo įvertinimas Notrelinių
(*Lamiaceae*) šeimos augaluose *in vitro***

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Ernesta Gižaitė
Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė
Vadovė

Doc. dr. Kristina Kantminienė
Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos

Ernesta Gižaitė

**Bioaktyviųjų fitocheminių junginių kaupimo
optimizavimas ir biologinio aktyvumo įvertinimas Notrelinių
(*Lamiaceae*) šeimos augaluose *in vitro***

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Ernestos Gižaitės, baigiamasis projektas tema „Bioaktyviųjų fitocheminių junginių kaupimo optimizavimas ir biologinio aktyvumo įvertinimas Notrelinių (*Lamiaceae*) šeimos augaluose *in vitro*“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

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

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Gižaitė, Ernesta. Bioaktyviųjų fitocheminių junginių kaupimo optimizavimas ir biologinio aktyvumo įvertinimas Notrelinių (*Lamiaceae*) šeimos augaluose *in vitro*. Baigiamasis magistro projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *Lamiaceae*, *Hyssopus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula*, kaliaus kultūros, antioksidacinis aktyvumas, antibakterinis aktyvumas.

Kaunas, 2019. 68 p.

Santrauka

Antioksidantai – tai junginiai sugebantys sulaikyti arba slopinti oksidacinius procesus, kurie vyksta dėl atmosferinio deguonies arba reaktyvių deguonies formų susidarymo ląstelėse. Jie suteikia bendrą antioksidacinį aktyvumą ir yra naudojami stabilizuoti maisto, kosmetikos ir farmacijos produktus, taip pat dalyvauja organizmų gynybos mechanizmuose prieš laisvuosius radikalus, žmogaus organizme apsaugo nukleorūgštis, baltymus, lipidus nuo oksidacijos, sumažina lėtinių ligų kiekį, širdies ligas, mažina vėžio riziką. Šių antioksidantų yra vaistiniuose augaluose, tačiau jų kiekiai yra nestabilūs ir maži, o cheminė junginių sintezė yra sudėtinga. Dėl šių priežasčių, kad būtų pagerinta ir padidinta naudingų medžiagų gamybą augaluose yra pasitelkiamos biotechnologijos. Augalų ląstelės, audiniai ir organų kultūros suformuojamos ir regeneruojamos *in vitro* sąlygomis. Kaliaus kultūroms suformuoti terpėse yra naudojami skirtingi augimo hormonai ir elicitoriai. Universalios terpės, gauti bet kokio augalo kaliaus kultūrą, nėra. Šiame darbe buvo atlikti tyrimai su Notrelinių (*Lamiaceae*) šeimos augalais: vaistine juozažole (*Hyssopus officinalis* L.), vaistiniu čiobreliu (*Thymus vulgaris* L.), prancūziška levanda (*Lavandula stoechas* L.) ir vaistine levanda (*Lavandula angustifolia* L.), suformuotos šių augalų kaliaus kultūros naudojant skirtingus augimo hormonus, elicitorius. Skirtingose kaliaus kultūrose, *in vitro* ir *in vivo* augaluose buvo nustatyti pigmentų kiekiai (chlorofilo *a*, chlorofilo *b* ir karotinoidų), antioksidacinis aktyvumas (DPPH, FRAP ir redukcinių savybių nustatymo metodais), bendras fenolinių junginių, flavonoidų kiekis, fermentinis antioksidacinis aktyvumas (superoksido dismutazės, katalazės ir askorbatperoksidazės kiekis), *L*-prolino kiekis, malondialdehido koncentracija ir antibakterinis aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* ir *Listeria monocytogenes*.

Nustatyta, kad didžiausią karotinoidų kiekį sukaupe vaistinio čiobreliaus augalai užauginti *in vitro* ($60,5 \pm 0,1$ mg/ 100g) sąlygomis MS terpėse. Dideliu fermentiniu ir nefermentiniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo prancūziškos levandos kaliaus kultūros suformuotos iš lapų MS terpėse, naudojant 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR. Aminorūgštis *L*-prolino didžiausią kiekį sukaupe prancūziškos levandos kaliaus kultūros suformuotos iš stiebų ($18,83 \pm 3,6$ mM/g), naudojant 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR. Didžiausią malondialdehido kiekį sukaupe prancūziškos levandos kaliaus kultūros iš lapų ($0,88 \pm 0,19$ μmol/g), kai buvo naudoti 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR. Tuo tarpu didžiausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris* pasižymėjo vaistinės juozažolės augalai *in vivo*. Prieš *Listeria monocytogenes* didžiausiu aktyvumu pasižymėjo prancūziškos levandos kaliaus kultūros suformuotos, naudojant 1 mg/l kinetiną ir 2 mg/l IBR.

Gižaitė, Ernesta. Optimization of Bioactive Phytochemical Compounds Accumulation and Evaluation of Biological Activity in *Lamiaceae* Family Plants *in vitro*. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: *Lamiaceae*, *Hyssopus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula*, callus culture, antioxidant activity, antibacterial activity.

Kaunas, 2019. 68.

Summary

Antioxidants are compounds capable of inhibiting the oxidative processes that occur due to the formation of atmospheric oxygen or reactive oxygen forms in cells. They provide general antioxidant activity and used to stabilize food, cosmetics and pharmaceuticals, and also participate in organisms defense mechanisms against free radicals, protects nucleic acids, proteins, and lipids from oxidation, reduces chronic diseases, heart disease, reduces cancer risk. These antioxidants are in medicinal plants, but their amounts are unstable and small, and chemical compounds synthesis is difficult. For these reasons, biotechnology is used to improve and increase the production of antioxidants in plants. Plant cells, tissues and organ cultures formed and regenerated *in vitro*. Different growth hormones and elicitors used in media for the formation of callus cultures. There is no universal medium to get the callus culture of any plant. In this work described studies with *Lamiaceae* family plants (hyssop (*Hyssopus officinalis* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), French lavender (*Lavandula stoechas* L.), and English lavender (*Lavandula angustifolia* L.)). These plants callus cultures were formed using different growth hormones, elicitors. In different callus cultures, *in vitro* and *in vivo* plants were determined by pigments levels (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids), antioxidant activity (DPPH, FRAP, and reducing antioxidant power), total phenolic compounds, flavonoids, enzymatic antioxidant activity (superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase), *L*-proline, malondialdehyde and antibacterial activity against *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* and *Listeria monocytogenes*.

It was determined that the highest amount of carotenoids (60.5 ± 0.1 mg/ 100g) has been accumulated in MS medium with *Thymus vulgaris* L. *in vitro*. *Lavandula stoechas* L. callus cultures formed from leaves in MS medium with 2 mg/l BAP and 2 mg/l IBA characterized by high enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity. The highest amount of amino acid *L*-proline had been accumulated in *Lavandula stoechas* L. callus cultures formed from stems (18.83 ± 3.6 mM/g) in MS medium with 0.5 mg/l BAP and 1 mg/l NAA. The highest amount of malondialdehyde has been accumulated the *Lavandula stoechas* L. callus cultures which formed from leaves (0.88 ± 0.19 μ mol/g) in MS medium with 0.5 mg/l BAP and 1 mg/l NAA. *Hyssopus officinalis* L. *in vivo* plants were shown the highest antibacterial activity against *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, and *Xanthomonas campestris*. *Lavandula stoechas* L. callus cultures formed in MS medium with 1 mg/l kinetin and 2 mg/l IBA were shown the highest antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	7
Įvadas.....	8
1. Literatūros apžvalga	10
1.1 Augalų audinių kultūros <i>in vitro</i>	10
1.2 Augaluose susidarantys bioaktyvūs junginiai.....	11
1.2.1 Nefermentinis antioksidacinis aktyvumas	11
1.2.3 Fermentinis antioksidacinis aktyvumas	13
1.3 Antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodų apibūdinimas.....	15
1.4 Baltymai ir <i>L</i> -prolinas	16
1.5 Lipidų peroksidacija ir malondialdehidas (MDA).....	16
1.6 Notrelinių (<i>Lamiaceae</i>) šeimos augalai	17
1.6.1 Vaistinės juozažolės (<i>Hyssopus officinalis</i> L.) charakteristika.....	17
1.6.2 Vaistinio čiobrelio (<i>Thymus vulgaris</i> L.) apibūdinimas	18
1.6.3 Levandos (<i>Lavandula</i> L.) charakteristika	19
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	21
2.1 Tyrimų objektas	21
2.2 Įranga, priemonės ir medžiagos	21
2.3 Mitybinių terpių gamyba	22
2.4 Pigmentų kiekio įvertinimas	24
2.5 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	25
2.5.1 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu.....	25
2.5.2 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	25
2.5.3 Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas	26
2.6 Fenolinių junginių kiekio įvertinimas.....	26
2.7 Flavonoidų kiekio įvertinimas	26
2.8 Fermentinio aktyvumo įvertinimas.....	27
2.8.1 Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas.....	27
2.8.2 Katalazės aktyvumo įvertinimas.....	27
2.8.3 Askorbatperoksidazės įvertinimas	28
2.9 Baltymų kiekio įvertinimas.....	28
2.10 Prolino kiekio įvertinimas.....	28
2.11 Malondialdehido kiekio įvertinimas	29
2.12 Antibakterinio aktyvumo įvertinimas	30
2.12.1 Augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas.....	30

2.12.2	Antibiotikų antibakterinio aktyvumo įvertinimas.....	31
2.13	Statistinė analizė	31
2.14	3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propeno rūgšties (Z,E)-2-(3-4 dihidroksifenil)etenilesterio (mėlyno pigmento) kiekio įvertinimas	31
3.	Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	32
3.1	Sėklų daigumo įvertinimas MS terpėje.....	32
3.2	Pigmentų kiekio įvertinimas	32
3.3	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas.....	34
3.3.1	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu.....	34
3.3.2	Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	36
3.3.3	Redukcinių savybių įvertinimas.....	38
3.4	Fenolinių junginių kiekio įvertinimas.....	40
3.5	Flavonoidų kiekio įvertinimas	42
3.6	Fermentinio antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	42
3.6.1	Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas.....	42
3.6.2	Katalazės aktyvumo įvertinimas.....	42
3.6.3	Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas	43
3.7	Baltymų kiekio įvertinimas.....	47
3.8	L-prolino kiekio įvertinimas	47
3.9	Malondialdehido koncentracijos įvertinimas.....	48
3.10	Antibakterinio aktyvumo įvertinimas	51
3.10.1	Prieš <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Escherichia coli</i> ir <i>Xanthomonas campestris</i>	51
3.10.2	Prieš <i>Listeria monocytogenes</i>	53
3.11	3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propeno rūgšties (Z,E)-2-(3-4 dihidroksifenil)etenilesterio (mėlyno pigmento) kiekio įvertinimas	54
4.	Rekomendacijų dalis	55
	Išvados	59
	Literatūros sąrašas	61
	Publikacijų sąrašas	67
	Padėka	68

Santrumpų ir terminų sąrašas

2,4-D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis
APX – askorbato peroksidazė
BAP – 6-benzilaminopurinas
DMSO – dimetil sulfoksidas
DNR – deoksiribonukleorūgštis
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas
EDTA – etilenodiaminotetraacto rūgštis
FRAP – geležies redukcijos antioksidacinis aktyvumas
GA₃ – giberelino rūgštis
HNE – 4-hidroksinonenas
H₂O₂ – vandenilio peroksidas
IAR – 3-indolilacto rūgštis
IBR – 3-indolilbutano rūgštis
JA – žasmono rūgštis
kin – kinetinas; 6-furfurilaminopurinas
LB – Luria – Bertani
MDA – malondialdehidas
MeJA – metilžasmonatas
MS – Murashige ir Skoog
NADPH – nikotinamido dinukleotido fosfatas
NAR – 1-naftilacto rūgštis
¹O₂ – singletinis deguonis
O₂^{•-} – superoksido radikalas
•OH – hidroksil radikalas
ppm – milijoninės dalys
RNR – ribonukleorūgštis
ROS – reaktyvios deguonies rūšys
SOD – superoksido dismutazė

Įvadas

Augalai turi įvairius mažos molekulinės masės junginius, kurių dalis yra pirminiai metabolitai (dažni visiems organizmams), o likusieji yra antriniai metabolitai. Jų biosintezė priklauso nuo augalų grupės ir jie gali būti skirtingi. Gebėjimas sintetinti antrinius metabolitus išsivystė evoliucijos metu, kai keitėsi gyvenimo sąlygos [1]. Vaistiniai augalai turi 100 000 fitocheminių junginių, daugelis iš jų pasižymi antioksidaciniu aktyvumu. Antriniai metabolitai ne tik vaidina svarbų vaidmenį augalų apsaugoje, bet ir yra naudojami žmonių, dėl savo aromatinių savybių ir maistinės vertės kaip vaistai, kvapiosios medžiagos, agrochemijos produktai, dažikliai, biopesticidai, maisto priedai [2, 3]. Artemisinino, vaisto prieš maliariją atradimas parodė, kad tradiciniai vaistiniai augalai yra perspektyvus šaltinis naujiems vaistams atrasti ir vystyti [4]. Tačiau yra susiduriama su kliūtimis, nes: a) naudingų junginių kiekiai augaluose yra nedideli, molekulės randamos ppm lygiu, todėl vaistiniui preparatui pagaminti reikia didelio derliaus kiekio; b) ribotas antinių metabolitų prieinamumas iš retų, nykstančių, sunkiai augančių rūšių; c) cheminė junginių sintezė yra varginanti dėl daugybės chiralinių centrų molekulėse, trukdančių junginių panaudojimui medicinoje ir pramonėje [2, 4, 5]. Dėl šių priežasčių pastaraisiais metais didelis dėmesys skiriamas strategijoms, kurių tikslas pagerinti antrinių metabolitų gamybą augaluose. Vienintelis tvarus būdas greitai užpildyti rinkos paklausą yra taikyti biotechnologijas – vaistinių augalų ląsteles, audinius ir organų kultūras sutelkti ir regeneruoti *in vitro* sąlygomis. Siekiant, kad augalai *in vitro* sukauptų antrinius metabolitus, yra naudojami augimo stimulatoriai ir elicitoriai [2, 6, 7]. Šiame darbe atlikti tyrimai su *Lamiaceae* šeimos augalais, suformuotos jų kaliaus kultūros, kurios yra būtinos ląstelių suspensijų kultūroms ir ši nediferencijuotų ląstelių masė gali būti plačiai naudojama genų transformacijoje, metabolinių kelių manipuliacijoms ir biosintetinių būdų nustatymui [8], be to kaliaus kultūrų auginimas sumažina natūraliai vykstanti kintamumą, standartizuoja fitocheminį augalų profilį, kad šis atitiktų komercinius reikalavimus [9]. Naudojami fitohormonai turi įtakos aktyviųjų junginių biosintezėje, taip gaunami skirtingi cheminiai junginiai ir jų kiekiai, atsiranda ir kvapų skirtumas. *Lamiaceae* šeimos augalai turi daugybę specifinių veislių, porūšių ir hibridų, jie skiriasi morfologinėmis savybėmis, agronominiais bruožais, fitocheminiais ir aromatiniais profiliais ir visi šie augalai gali būti dauginami ir auginami [7, 10]. Šiame darbe pasirinkti pasaulyje, taip pat ir Lietuvoje, auginami augalai – vaistinė juozažolė (*Hyssopus officinalis* L.), vaistinis čiobrelis (*Thymus vulgaris* L.), prancūziška levanda (*Lavandula stoechas* L.) ir vaistinė levanda (*Lavandula angustifolia* L.).

Tikslas

optimizuoti bioaktyviųjų fitocheminių junginių kaupimą vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.), prancūziškos levandos (*Lavandula stoechas* L.) ir vaistinės levandos (*Lavandula angustifolia* L.) augaluose ir įvertinti biologinį aktyvumą *in vivo*, *in vitro* ir kaliaus kultūrose.

Darbo uždaviniai

1. tiriamuosiuose augaluose *in vitro* ir *in vivo* nustatyti:

- a) pigmentų (chlorofilo *a*, chlorofilo *b* ir karotinoidų) kiekius;
- b) antioksidacinį aktyvumą DPPH, FRAP ir redukcinių savybių nustatymo metodais;
- c) bendrą fenolinių junginių kiekį;
- d) flavonoidų kiekį;
- e) *L*-prolino kiekį;

2. nustatyti tiriamųjų augalų *in vitro* ir *in vivo* antioksidacinį fermentinį aktyvumą: superoksido dismutazės, katalazės ir askorbatperoksidazės kiekius;
3. įvertinti malondialdehido koncentraciją tiriamuosiuose augaluose;
4. nustatyti antibakterinį aktyvumą tiriamųjų augalų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktuose prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* ir *Listeria monocytogenes*;
5. nustatyti 3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propeno rūgšties (*Z,E*)-2-(3-4-dihidroksifenil)etenilesterio (mėlyno pigmento) kiekį vaistinės levandos (*Lavandula angustifolia* L.) ląstelių suspensijų kultūrose;
6. pateikti siūloma timolio gamybos iš vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) aparatūrinę schemą.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Augalų audinių kultūros *in vitro*

Augalų ląstelės, audiniai ir organų kultūros suformuojamos ir regeneruojamos *in vitro* sąlygomis – taip yra atveriamos naujos galimybės augalams panaudoti. Augalų audinių kultūros gali būti kelių tipų: gemalinės, kaliaus, organų, ląstelių [6]. Izoliuotos audinių kultūros yra vienos iš svarbiausių augalų biotechnologijos metodų, izoliuotos augalų audinių ląstelės auginamos ant maitinamųjų terpių steriliomis sąlygomis *in vitro*. Taip yra sudaroma kaliaus kultūra – antrinės meristemos masė, kuri susidaro pažeistoje augalo vietoje praplėsdama išorinio audinio sluoksnį ir formuojasi jo paviršiuje [11]. Taigi, iš esmės kaliaus kultūros susideda iš ląstelių grupės, kurios atsiranda dėl neorganizuotos augalų organų ląstelių proliferacijos. Kaliaus kultūrą galima gauti beveik bet kurioje augalo dalyje, nors dažniausiai dėl sužeidimo kaliaus kultūros formuojasi stiebo, šaknies gale. Kaliaus formavimosi iniciavimas atliekamas naudojant terpes su augimo reguliatoriais. Terpių papildymas fitohormonais skirstomas į tris būdus: tik auksinai, tik citokininai, abu auksinai ir citokininai. Auksinai inicijuoja ląstelių dalijimąsi, elongaciją, o naudojant mažomis koncentracijomis sukelia šaknų vystymąsi. Dažniausiai naudojami sintetiniai auksinai: NAR, 2,4-D, IAR, IBR ir kt. Citokininai yra adenino dariniai, jie skatina ląstelių dalijimąsi, skatina atžalų formavimąsi *in vitro*. Pagrindiniai citokininai – zeatinas, kinetinas, BAP. Auksino / citokino santykis turi svarbų vaidmenį morfogenezeje. Didelis santykis sukelia embriogenezę ir šaknų formavimąsi, o mažas pumpurų ir atžalų formavimąsi. Tarpinis santykis yra reikalingas kaliaus formavimuisi [6]. Augimo reguliatorių koncentracijos skiriasi priklausomai nuo augalo rūšies, individualaus augalo genotipo, amžiaus, mitybinės būklės. Kultūros formavimosi sąlygos, tokios kaip temperatūra, kieta terpė ar kietėjantis agaras, šviesa, taip pat yra svarbios kaliaus formavimuisi ir vystymuisi. Nėra universalios terpės gauti bet kokio augalo kaliaus kultūrą [12]. Augalų ląstelių formavimas *in vitro* sąlygomis yra alternatyva padidinti biomasės augimo tempą, stabilumą, fenolinių junginių ir kitų metabolitų gamybą. Be to *in vitro* auginimas leidžia keisti augimo kintamuosius, naudojant prekursorius arba / ir elicitorius, taip pat keisti junginių biosintezės būdus, optimizuoti jų gamybą [13].

Elicitoriai – tai junginiai, kurie gali būti natūralūs arba sintetiniai, jie inicijuoja arba pagerina specifinių metabolitų biosintezę. Jų mažomis koncentracijomis yra papildomos mitybinės terpės [13]. Elicitoriai gali būti fitohormonai (metilžazmonatas, salicilo rūgštis, žasmoninė rūgštis, efetonas, melatoninas), oligosacharidai (chitozanas, manitolis), aminorūgštys, organinės rūgštys (askorbo, folinė, pieno, citrinų rūgštys), polisacharidai, baltymai, riebalai, druskos, įvairūs fiziniai faktoriai (šviesa, ultragarsas, hipoksija, aukštas slėgis) [14]. Žazmonatai ir salicilo rūgštis yra signalo perdavimo molekulės, kurios reaguoja į biotinį ir abiotinį stresą. Šios molekulės gali būti naudojamos paskatinti specifinių fermentų gamybą, kurie yra susiję su fenolinių junginių biosinteze [13]. Žazmonatai, įskaitant JA ir MeJA, yra ciklopentanonų šeimos junginiai, jie moduluoja platų augalų atsaką ir veikia, kaip veiksmingi elicitoriai, didinantys antrinių metabolitų kiekį *in vitro* kultūrose. MeJA yra aktyvesnis darinys nei JA ir jis sukelia rozmarino rūgštis, terpenoidų, indolo alkaloidų, flavonoidų, fenilpropanoidų ir plumbagino aktyvesnę gamybą įvairiose ląstelių kultūrose. MeJA buvo naudojamas formuojant *Salvia miltiorrhiza* (*Lamiaceae* šeimos augalas) šaknų kultūras ir terpėse žymiai padidino tanshinono (diterpeno) kiekį [2, 15]. Taip pat buvo atliktas tyrimas su šalaviju (*Salvia virgata*), jo ūglių kultūroms formuoti buvo naudojami fitohormonai BAP ir IAR bei elicitoriai Ag⁺ jonai, mielių ekstraktas ir metilžazmonatas. Nustatyta, kad didžiausias kiekis regeneruotų ūglių gaunamas naudojant MS terpę su 2 ppm BAP ir 0,05 ppm IAR. Nustatyta, kad efektyviausi abiotiniai

elicitoriai yra Ag^+ jonai (iki 2,5 ppm). Naudojami terpėse jie pagerino fenolinių rūgščių gamybą ūgliuose (26 mg/g sauso svorio). Taip pat nustatyta, kad didžiausi kiekiai salvianolinės rūgšties (3,72 mg/g sauso svorio) ir kavos rūgšties (35,5 mg/g sauso svorio) randami, kai terpėse 3 augimo dieną naudojamas 11,2 ppm metilžazmonatas, o 5 augimo dieną 2,5 ppm Ag^+ jonai [16].

Ląstelių suspensijos kultūros, tai izoliuotų ląstelių auginimas skystoje terpėje. Ląstelės gali būti izoliuotos iš *in vivo* sąlygomis augusios augalinės medžiagos ar suformuotos kaliaus kultūros. Auginant ląstelių suspensijos kultūras turi būti užtikrintas suspensijos maišymas [6].

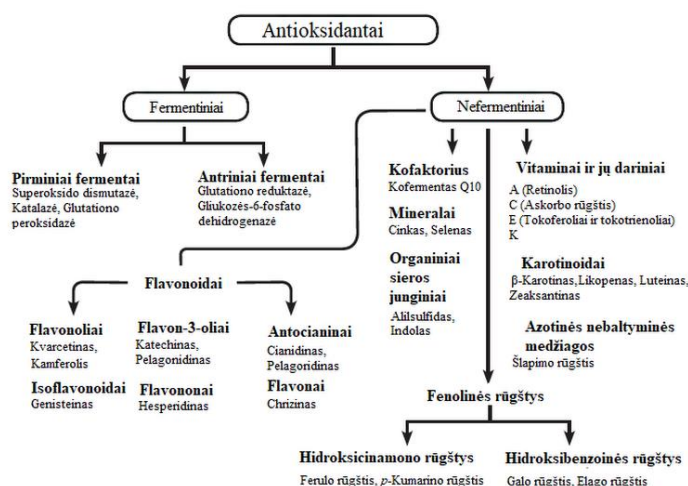
1.2 Augaluose susidarantys bioaktyvūs junginiai

1.2.1 Nefermentinis antioksidacinis aktyvumas

Augalai išvystę keletą mechanizmų pagal kuriuos antioksidaciniai fermentai užtikrina apsaugą nuo žalingo oksidacinio streso poveikio, kurį sukelia abiotiniai ir biotiniai šaltiniai [17]. Abiotiniai šaltiniai: sunkieji metalai, vandens perteklius, druskingumas, sausra, užšalimas, šiluma, didelis šviesos intensyvumas, ozonas, herbicidai. Biotiniai – patogenai, kenkėjų daroma žala, sužeidimai [18]. Pastebėta, kad kai augalai yra veikiami abiotinės ir biotinės aplinkos streso, pagreitėja ir padidėja ROS ir azoto rūšių gamyba [17]. ROS apima laisvuosius radikalus (superoksido radikalą ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilo radikalą ($\bullet\text{OH}$)) ir neradikalines molekules (singletinį deguonį ($^1\text{O}_2$) ir vandenilio peroksidą (H_2O_2)). Jie gali susidaryti kiekvienoje ląstelių organelėje, bet kadangi atsiradus stresinei aplinkai pirmiausia sutrikdomas pirminis metabolizmas (fotosintezė ir kvėpavimas), todėl daugiausia ROS susidaro chloroplastuose, mitochondrijose ir peroksisomose [17, 19]. Augaluose yra stiprių nefermentinių antioksidantų, tokių kaip askorbatas, glutationas, tokoferolis, karotinoidai, fenoliniai junginiai, šlapimo rūgštis, bilirubinas. Jie veikia kartu su fermentiniais antioksidantais (superoksido dismutaze, katalaze, glutationo peroksidaze) prieš ROS [17, 19, 20]. Ir tai padeda skatinti augalų augimą, vystymąsi, ląstelių ciklą, hormonų signalų perdavimą ir sustiprinti atsaką į abiotinius ir biotinius aplinkos veiksnius [17, 19]. Antioksidantai suteikia bendrą antioksidacinį aktyvumą. Jie sulaiko arba slopina oksidacinius procesus, kurie vyksta dėl atmosferinio deguonies arba reaktyvių deguonies rūšių susidarymo ląstelėse. Pagrindė antioksidantų savybė – tai gebėjimas surišti laisvuosius radikalus, pvz: peroksidus, hidroperoksidus, ir taip slopinti oksidacinius mechanizmus, kurie veda į degeneracines ligas. Laisvieji radikalai žmogaus organizme oksiduoja nukleino rūgštis, baltymus, lipidus. Antioksidantai sumažina lėtinių ligų dažnį, širdies ligas, mažina vėžio riziką [21]. Antioksidantų klasifikacija pateikta 1.1 paveiksle.

Fenoliniai junginiai – tai augalų antriniai metabolitai, kurie turi skirtingas struktūras ir funkcijas, tačiau paprastai turi aromatinių žiedų su vienu ar daugiau hidroksilo pakaitų. Šiuo metu yra žinoma daugiau kaip 8000 fenolinių struktūrų. Fenoliai tirpūs vandenyje, augalams suteikia spalvą, kvapą, skonį (kartumą) [22]. Fenoliniai junginiai yra sintetinami šikimo rūgšties keliu. Junginiai yra klasifikuojami į pogrupius: fenolinės rūgštis (hidroksicinamono, hidroksibenzoinės rūgštys), flavonoidai, taninai, stilbenai ir lignanai [22, 23]. Augalus fenoliai apsaugo nuo ultravioletinių spindulių, atbaido plėšrūnus ir parazitus, prisideda prie augalo spalvos, pritraukia apdulkintojus [22]. Naudojami su maistu pasižymi priešūždegiminiu poveikiu, priešvėžiniu poveikiu [23]. Taninai skirstomi į dvi grupes: hidrolizuotus ir kondensuotus taninus [22]. Hidrolizuoti taninai priklauso ne flavonoidiniams fenoliniams polimerams. Kondensuoti taninai dar vadinami proantocianidiniais, flavanais, flavantrioliais [24]. Fenoliai nėra aktyvūs antioksidantai, nebent substitucija *orto*- arba *para*- padėtyse turi padidinta elektronų tankį prie hidroksilo grupės ir sumažinta deguonies –

vandenilio ryšio energiją. Fenolinių junginių substitucija *meta*- padėtyje turi ribotą antioksidacinio aktyvumo efektą [25].



1.1 pav. Antioksidantų klasifikacija [27]

Flavonoidai – tai fenoliniams junginiams priklausantys, vandenyje tirpūs augalų pigmentai, susidedantys iš dviejų benzeno žiedų sujungtų heterocikliniu pirano žiedu [22, 27]. Jie yra skirstomi į šešis pogrupius: chalkonus, flavonus, flavonolius, flavondiolius, antocianinus ir proantocianidinus, kai kuriose rūšyse dar randama ir septintoji grupė – auronai. Skirtingi flavonoidai turi ir skirtingas funkcijas, dabar maždaug yra atrasta 6000 skirtingų flavonoidų [28]. Augaluose jie yra aptinkami beveik visose dalyse, bet daugiausiai fotosintetinačiose ląstelėse. Jie yra pagrindiniai komponentai suteikiantys spalvą žydintiems augalams. Taip pat augaluose jie dalyvauja kovoje su oksidaciniu stresu, reguliuoja augimo veiksnį, hormoną – auksiną. Šiuo metu yra didelis susidomėjimas flavonoidais, dėl jų antioksidacinio poveikio, antibakterinio, antivirusinio aktyvumo, kepenų veikos gerinimo savybių, priešušdegiminio poveikio, priešvėžinio aktyvumo [27].

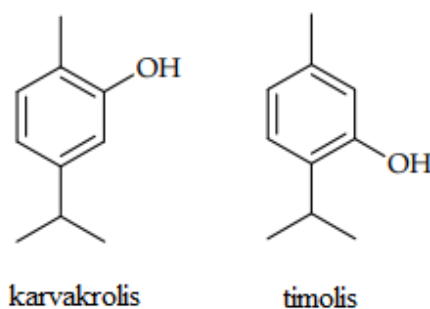
Terpenoidai dar yra žinomi, kaip izoprenoidai, klasifikuojami į hemiterpenoidus, monoterpenoidus (timolį, linaloolį, limoneną), sekvaterpenoidus, diterpenoidus, seseterpenoidus, triterpenoidus, tetraterpenoidus (karotinoidus), politerpenoidus [29]. Triterpenoidai yra viena iš gausiausių augaluose aptinkamų junginių klasių. Jie apsaugo augalus nuo patogenų ir žolėdžių, taip pat pasižymi priešušdegiminėmis, antibakterinėmis, antivirusinėmis ir citotoksinėmis savybėmis. Tyrimai parodė, kad ursolio rūgštis pasižymi citotoksinu aktyvumu prieš limfines leukemijos ląsteles, veikia, kaip stiprus inhibitorius pelės odos naviko vystymosi metu [30]. Karotinoidai suteikia oranžinę, geltoną, raudoną spalvas gėlėms, vaisiams ir šaknims [31]. Karotinoidai ir jų fermentinio ir oksidacinio skilimo produktai (apokarotinoidai) yra svarbūs įvairiems biologiniams procesams vykstantiems augaluose, pvz. fotosintezėje, fotoapsaugoje, augimo ir vystymosi reguliacijoje [32]. Karotinoidai atlieka ir svarbų vaidmenį žmonių mityboje, jie aprūpina provitaminu A. Šis vitaminas veikia, kaip antioksidantas prieš lėtines ligas, tokias kaip širdies, kraujagyslių ligas, vėžį ir su amžiumi susijusias akių ligas [31].

1.2.2 Timolis ir karvakrolis

Timolis (2-izopropil-5-metilfenolis) – bespalvis, kristalinis, natūralus monoterpeninis fenolis, susidarantis iš cimeno. Augalams suteikia stiprų skonį, malonų aromatą. Gerai tirpsta alkoholiuose, šarminiuose tirpaluose ir kituose organiniuose tirpikliuose [33, 34]. Randamas Notrelinių šeimos

(čiobrelis (*Thymus*), baziliko (*Ocimum*), raudonėlio (*Origanum*) ir monardų (*Monarda*)) augalų eteriniuose aliejuose. Šie eteriniai aliejai naudojami maisto pramonėje dėl savo kvapiųjų medžiagų ir apsauginių savybių, komerciniai preparatai naudojami, kaip uodų atbaidymo priemonės, taip pat naudojami kvapų terapijoje ir tradicinėje medicinoje nuo galvos skausmo, kosulio ir viduriavimo gydymui [35]. Čiobrelių eteriniuose aliejuose randamas timolio kiekis yra didesnis nei 60 % [36]. Literatūroje aprašoma, kad timolis turi įvairių farmakologinių savybių: veikia kaip antioksidantas, šalina laisvuosius radikalus, veikia prieš uždegimus, mažina skausmą, spazmus, pasižymi antibakteriniu (tiek prieš gramteigiamas (*Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *S. epidermidis*) ir prieš gramneigiamas (*E. coli*) bakterijas), priešgrybeliniu (prieš *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *A. flavus*, *A. ochraceus*), antiseptiniu, priešvėžiniu poveikiu [33, 34, 35]. Dėl savo bioaktyvumo timolis mažomis koncentracijomis (mažiau nei 1 mM) naudojamas: a) kosmetikos sudėtyje, kaip tirpiklis ir aromato ingredientas; b) maisto produktuose, kaip konservantas apsaugantis nuo mikroorganizmų, ir kaip aromato ingredientas; c) vaistuose; d) insekticiduose, fungiciduose ir kt. Tačiau timolio naudojimas vaistuose yra ribotas dėl jo vidutinio citotoksiškumo laipsnio, kurį parodė *in vitro* tyrimai su žmogaus ir gyvūnų ląstelėmis bei eksperimentiniais gyvūnais [35]. Todėl yra reikalingi detalesni tyrimai nusakantis timolio vartojimo būdą ir reikalingą dozę [34].

Karvakrolis (metil-5-(1-metiletil) fenolis) skystas monoterpenoidinis fenolis, jis yra timolio izomeras (žr. 1.2 pav.). Randamas raudonėlio (*Origanum vulgare*), čiobrelis (*Thymus vulgaris*), pipirnis (*Lepidium flavum*), laukinio bergamoto (*Citrus aurantium* var. *bergamia* Loisel) ir kitų augalų eteriniuose aliejuose. Komercinis karvakrolis sintetinamas cheminiais ir biotechnologiniais metodais. Pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš gramteigiamas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), gramneigiamas bakterijas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*), sporas, priešgrybeliniu poveikiu (prieš *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium rubrum*, *Trichoderma viride*). Taip pat pasižymi antioksidaciniu poveikiu: apsaugo DNR, pagerina imuninės sistemos atsaką. Iš visų eterinių aliejų komponentų karvakrolis pasižymi stipriausiu priešvėžiniu poveikiu: prieš žmogaus metastazavusias krūties vėžio ląsteles, plaučių vėžio ląsteles [37]. Čiobrelių eteriniuose aliejuose randamas mažas karvakrolis kiekis, maždaug 6 % [36].



1.2 pav. Karvakrolis ir timolio struktūrinės formulės [38]

1.2.3 Fermentinis antioksidacinis aktyvumas

Augaluose pagrindiniai ROS šalinimo fermentai yra SOD (superoksido dismutazė), CAT (katalazė), GPX (glutathiono peroksidazė), APX (askorbato peroksidazė), Prx (peroksiredoksinas), Trx (tiorredoksinas). ROS yra kenksmingos didelėmis koncentracijomis, kai ROS kiekis yra didesnis nei gynybos mechanizmų kiekis, sakoma, kad ląstelė yra „oksidacinio streso būsenoje“. ROS kelia grėsmę ląstelėms, sukelia lipidų peroksidaciją, baltymų oksidaciją, nukleorūgščių pažeidimus,

fermentų slopinimą, aktyvuoja užprogramuotą ląstelių žūtį, pripažįstama, kad ROS sumažina ir derliaus kiekį [17, 19].

Superoksido dismutazė (SOD) priklauso metalo – fermentų grupei ir katalizuoja reakciją, kai superoksido radikalai yra verčiamas į vandenilio peroksidą ir deguonį. SOD yra randama skirtinguose ląstelių komponentuose: chloroplastuose, mitochondrijose, peroksisomose, branduolyje, citoplazmoje, apoplastuose. SOD esanti chloroplastuose savo aktyviuosiuose centruose turi vario / cinko arba geležies, šis fermentas gali būti stromoje arba prisitvirtinęs prie tilakoido membranos. Tačiau yra atrasta, kad tik mitochondrijose yra Mn-SOD klasė, o peroksisomose aptinkama visi izofermentų tipai (CuZn-SOD, Mn-SOD ir Fe-SOD) [18, 17, 19]. Izofermentų tipų pasiskirstymas yra susijęs su ląstelinėmis vietomis, kur yra $O_2^{\bullet-}$ radikalai (šių fermentų substratas ir jo susidarymo vieta). $O_2^{\bullet-}$ pagrindinis šaltinis yra plazminėje membranoje lokalizuota NADPH oksidazė. SOD sukelia svarbius augalų apsaugos veiksnius nuo abiotinių sąlygų sukkelto oksidacinio streso, taip pat dalyvauja augalų ląstelių signalo perdavimo procesuose. Kita vertus SOD katalizuojamų reakcijų metu susidaro H_2O_2 kartu su molekuliniais deguonimi. H_2O_2 – tai stabili ROS forma su citotoksiškumo ir signalo perdavimo funkcijomis. Atlikta daug tyrimų apie galimus pavojus susijusius su vandenilio peroksido kaupimu, nes vandenilio peroksidas yra labai reaktyvi deguonies forma (ROS), todėl gali pakenkti ląsteliniams komponentams, augalų augimas gali sulėtėti [17].

Katalazė aptinkama augalų peroksisomose ir kituose aerobiniuose organizmuose. Tai pagrindinis fermentas, kuris dalyvauja dviejų H_2O_2 molekulių neutralizavime į vandenį ir deguonį [17]. Yra nustatyti trys katalazių tipai: I klasė yra fotosintetinančiuose audiniuose ir priklauso nuo šviesos. II klasė yra kraujagyslių audiniuose. III klasė yra sėklose ir jaunuose daiguose [19]. Tyrimai parodė, kad katalazės aktyvumas yra kaip antioksidacinė apsauga augaluose atsakanti į nepalankias augimo sąlygas, į abiotinį stresą. Taip pat galima daryti prielaidą, kad be katalazės aktyvumo padidėjimo augalų augimas gali būti sudėtingesnis. Pavyzdžiui, agurkuose katalazės aktyvumas padidėja atsakant į karštį arba į šaltį, osmosinį ir druskingumo stresą, tai rodo, kad yra bendra reguliacinė sistema (biocheminė ir molekulinė). Mechanizmas sukelia katalazės indukciją arba viso rinkinio pasikeitimus, įskaitant visas likusias antioksidacinės apsaugos priemones. Tačiau šis veikimo mechanizmas nėra pilnai ištirtas. Paprastai katalazės aktyvumas padidėja esant abiotiniam stresui, tačiau yra tyrimų, kurie nustatė, kad fermentų aktyvumas augaluose sumažėjo po kai kurių abiotinio streso sąlygų. Todėl abejojama ar katalazės aktyvumą galima naudoti, kaip abiotinio streso žymeklį [17]. Taip pat katalazė turi mažesnę giminingumą vandenilio peroksidui nei askorbato peroksidazė [19].

APX katalizuoja vandenilio peroksido redukciją į vandenį naudojant askorbatą, kaip elektronų donorą. Aukštesniuose augaluose APX izoformos pasiskirsto tarp citozolio, chloroplastų (stomos ir tilakoido membranos), mitochondrijos ir peroksisomų. Jei nebūtų šios izoformos augalai negalėtų efektyviai naudoti askorbato H_2O_2 neutralizavimui, tai paaiškina, kodėl augalai gamina didelį kiekį askorbato [17, 19].

ROS gali veikti ir kaip „signalinės molekulės“, gali kontroliuoti įvairius fiziologinius procesus, atsaką į stresą, augimą ir vystymąsi. Pavyzdžiui, keletas oksidazių tokių, kaip NADPH oksidazė, gamina ROS viduląstelinėje erdvėje ir naudoja signalo perdavimui. Balansas tarp ROS veikimo, kaip citotoksinių molekulių, ir signalo perdavimo molekulių yra lemiamas veiksnys, kaip augalas atsakys į stresą [17, 19].

1.3 Antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodų apibūdinimas

Spektrofotometriniais metodais galima tirti biomolekulių fizikines ir chemines būsenas, stebėti cheminius vyksmus ląstelėse ir gyvuose audiniuose, nes šio metodo metu tiriama medžiaga nėra pažeidžiama ar suardoma. Spektrofotometrinės analizės būdu galima tirti medžiagas absorbuojančias UV šviesą. Fenoliniai junginiai savo struktūroje turi vieną ar kelis aromatinius žiedus, kurie absorbuoja UV šviesą, todėl šiuo metodu galime įvertinti bendrą antioksidacinį aktyvumą, fenolinių junginių kiekį ir flavonoidinius junginius [39].

Antioksidacinis aktyvumas gali būti nustatomas įvairiais metodais. Vienas iš populiariausių ir dažniausiai naudojamų metodų yra DPPH, dėl savo paprastumo, greito atlikimo, jautrumo ir stabilaus DPPH• radikalo naudojimo [40]. Atliktas tyrimas, kurio metu buvo nustatyta, kaip antriniai metabolitai vieni ir mišiniuose veikia prieš DPPH• radikalą. Nustatyta, kad karvakrolis ir timolis pasižymi silpnu veikimu prieš DPPH radikalą, reakcija gali būti grįžtama. Taip pat timolis ir karvakrolis su *o*-difenoliais (kvarcetinu, rutinu, (+)-katechinu ir rozmarino rūgštimi) pasižymi antagonistiniu poveikiu t.y. veikia priešiška, susilpnina veikimą prieš DPPH radikalą. Tačiau kiti eterinių aliejų junginiai (timokuinonas, *p*-cimenas, γ -terpinenas) neturi įtakos polifenolių antioksidaciniam aktyvumui [41].

Geležies redukcijos antioksidacinio aktyvumo (FRAP) metodas taip pat nustato bendrą antioksidacinį aktyvumą bandinyje, jis paremtas Fe³⁺ jonų redukcija į Fe²⁺ jonus, kaip reakcijos rodiklis yra naudojamas spalvos pokytis. Šis tyrimas gali būti pritaikytas įvairiems mėginių tipams, reagentai yra stabilūs mažai toksiški, metodas jautrus ir tikslus. Antioksidantai, kurie reaguoja FRAP tyrime, gali redukuoti Fe³⁺-TPTZ druską į mėlynos spalvos Fe²⁺-TPTZ formą. Tokie antioksidantai yra askorbo rūgštis, α -tokoferolis, šlapimo rūgštis, bilirubinas, polifenoliniai junginiai (katechinas) ir kiti flavonoidai randami augaluose ir maisto produktuose [42]. Tačiau neredukuoja vandenilio peroksidas, fruktozė, gliukozė ir tiolio grupės (baltymai, aminorūgštys, glutationas, cisteinas). Tiolio turintys junginiai nereaguoja su oksidatoriumi, nes yra naudojama rūgštinė terpė, kurioje tioliai yra protonizuoti ir nereaguoja su geležies kompleksais [42, 43]. Taip pat nustatyta, kad šviesos sugertis 593 nm bangos ilgyje gali padidėti net po kelių valandų dėl polifenolių, tokių kaip kavos rūgštis, tanino rūgštis, ferulo rūgštis, askorbo rūgštis ir kvercetinas. Be to redukcijos galia yra susijusi su junginyje esančių hidroksilo grupių skaičiumi [44].

Bioaktyvių junginių redukcinis pajėgumas atspindi elektronų donoristės pajėgumą ir yra susijęs su antioksidaciniu aktyvumu. Bioaktyvus junginiai turintys antioksidacinį poveikį gali būti reduktoriais ir inaktyvuoti oksidatorius. Redukcinių sąvybių nustatymo metodo metu antioksidaciniai junginiai redukuoja Fe³⁺-fericianido kompleksą į geležies Fe²⁺ formą. Mėlynos / žalios spalvos kompleksas susidaro pridėjus FeCl₃ ir Fe³⁺ forma konvertuojasi į Fe²⁺. Šiame tyrime tyrimojo tirpalo spalva pasikeičia į žalią ar mėlyną priklausomai nuo antioksidanto redukcinės gebos. Didesnė absorbcija parodo didesnę geležies redukcijos galią. Augalų Fe³⁺ į Fe²⁺ redukcijos geba priklauso nuo juose esančių bioaktyvių junginių redukcinės gebos, pvz.: kavos rūgšties redukcinė geba – 2,77 (20 μ g/ml), tanino rūgšties – 2,43 (30 μ g/ml), propolio – 0,83 (20 μ g/ml), melatonino – 0,18 (30 μ g/ml), eugenolio – 1,18 (30 μ g/ml). Augalų ekstraktų redukcinė geba: *Lavandula stoechas* – 0,51 (20 μ g/ml), *Melissa officinalis* – 1,41 (20 μ g/ml), palyginimui: aviečių ekstrakto – 0,66 (20 μ g/ml), kivių ekstrakto – 0,23 (20 μ g/ml) [25].

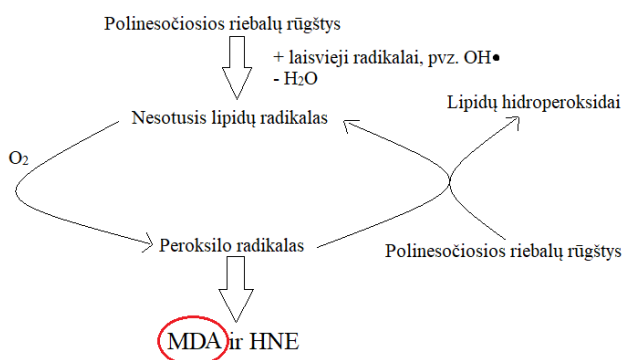
1.4 Baltymai ir *L*-prolinas

Augalų baltymus galima suskirstyti mažiausiai į dvi dideles grupes: pagal paplitimą (sėklų atsarginius baltymus) ir biochemines savybes (funkcinius vegetatyvinių organų baltymus). Biochemines savybes turintys baltymai apima fermentines sistemas, kurios yra atsakingos už plačius metabolinius procesus [45]. Be baltymų, taip pat ir aminorūgštys dalyvauja daugelyje ląstelėse vykstančių reakcijų, daro įtaką fiziologiniams procesams tokiems, kaip augimas, vystymasis, pH reguliavimas, atsparumas abiotiniam ir biotiniam stresui [46].

Viena iš aminorūgščių, kurią augalai sukaupia stresinėmis sąlygomis yra *L*-prolinas [47, 48]. Ji yra sintezuojama iš glutamato. Augaluose atlieka keletą funkcijų. Pirmiausia, apsaugo viduląstelines struktūras ir makromolekules nuo osmosinio streso. Antra, veikia, kaip molekulinis šaperonas ir apsaugo baltymus, sustiprina įvairių fermentų veiklą. Trečia, veikia, kaip antioksidantas, slopina singletinį deguonį. Įrodyta, kad prolino naudojimas gali sumažinti ROS kiekį grybuose ir mielėse, užkirsti kelią ląstelių mirčiai, o žmogaus organizme ląsteles gali apsaugoti nuo oksidacinio streso, vėžinių ląstelių susidarymo. Ketvirta, augaluose prolinas veikia, kaip signalinė molekulė, kontroliuoja augalų vystymąsi [48].

1.5 Lipidų peroksidacija ir malondialdehidas (MDA)

Lipidai esantys augalų membranose turintys nesočiąsias jungtis yra pirminiai taikiniai oksidaciniams procesams [49]. Polinesočiųjų riebalų rūgščių peroksidacijos metu išsiskiria malondialdehidas (MDA) ir 4-hidroksinonenas (HNE) [49, 50]. Lipidų peroksidacija – tai procesas, kurio metu oksidantas, laisvas radikalas ar ne radikaline cheminė medžiaga atakuoja anglies – anglies dvigubą ryšį. Šis procesas apima vandenilio nukreipimą nuo anglies atomo ir deguonies įterpimą, rezultate susidaro peroksilo radikalas, lipidų hidroperoksidai, MDA ir HNE. Minėtų aldehydų susidarymas pateiktas 1.3 paveiksle [50].



1.3 pav. MDA susidarymas iš polinesočiųjų riebalų rūgščių [50]

MDA yra sudarytas iš trijų anglies atomų, daugiausiai yra enolinės formos vandeniniuose ir organiniuose tirpaluose [51]. *In vitro* gali paveikti baltymus, DNR, RNR ir daugelį kitų biomolekulių [52]. Aldehydai turi didelį cheminį reaktyvumą, tačiau žinduoliai turi fermentinį rinkinį, kuris juos paverčia mažiau reaktyviomis cheminėmis medžiagomis. MDA ir HNE gali redukuoti į alkoholius naudojant aldo-keto reduktazę arba alkoholio dehidrogenazę, arba gali oksiduoti į rūgštis naudojant aldehido dehidrogenazę. Tačiau MDA ir HNE gali paveikti keletą signalo perdavimo procesų, šis poveikis priklauso nuo jų gebėjimo kovalentiškai prisijungti prie baltymų ir DNR. Šis prisijungimas

gali prisidėti prie apoptozės sukėlimo, kuri gali būti pastebima senėjimo metu osteoblastuose, raumenų ląstelėse, timocituose, hematopoetinėse ląstelėse [50].

1.6 Notrelinių (*Lamiaceae*) šeimos augalai

1.6.1 Vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.) charakteristika

Hyssopus officinalis L. augalas priklauso *Lamiaceae* šeimai, dar vadinamas *Thymus hyssopus*, gimtinė – Viduržemio ir Kaspijos jūros regionai, natūraliai auga Pietų Europoje, vidurio rytų šalyse, centrinėje Azijoje, šiaurės Afrikoje, šiaurės Amerikoje, naudojama kulinarijoje, dekoravimui ir medicininiais tikslais [53]. Vaistinė juozažolė daugiametis augalas, turintis mėtų / šalavijo kvapą, auga 0,2 – 0,6 metrų aukščio, lapai žali padengti plonais plaukais, kurie turi eterinių aliejų gamybos liaukas, žiedai – mėlyni, rožiniai, šviesiai violetiniai, žydi nuo liepos iki rugsėjo mėnesio [53, 54]. Vaistinės juozažolės nuotraukos pateiktos 1.4 paveiksle. Dėl gaminamų eterinių aliejų juozažolė naudojama gydant gerklės skausmą, bronchitą, astmą, kitas kvėpavimo ligas, pasižymi tonizuojančiu poveikiu, gali būti gydomos nervų sistemos ligos, nerimo būsenos, isterija, depresija, gali slopinti žmogaus imunodeficitą virusą (ŽIV), naudojama gydant žaizdas, lėtines opas [55]. Pasižymi antimikoziniu aktyvumu prieš *Candida* genties mikroskopinius grybus (*Candida albicans*, *C. Krusei* ir *C. Tropicalis*) [54]. Tyrimai parodė, kad eterinis aliejus pasižymi ir antibakteriniu poveikiu prieš *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli* [56]. Dažniausiai augale aptinkami junginiai: polifenoliai, rūgštys (chlorogeninė, *p*-hidroksibenzoinė, ferulo, siringistinė, vanilino, *p*-koumaristinė, rozmarino, kavos), flavonoidai (diosminas ir hesperidinas), polisacharidai (hisopinas), taninai, terpenai (pinokamparas, *izo*-pinokamparas (49,7–57,7%) ir β -pinenas (5.7–9.3%)) bei pigmentai ir dervos [9, 53, 57].



1.4 pav. Vaistinė juozažolė (*Hyssopus officinalis* L.)

Vaistinė juozažolė (*Hyssopus officinalis* L.) auginama ir *in vitro* sąlygomis naudojant augimo reguliatorius. Atlikti tyrimai auginant juozažolės kaliaus kultūras naudojant įvairius auksinus (IAR, NAR, IBR) ir citokininą (BAP). Nustatyta, kad palankiausias augimo reguliatorius yra IBR, lapai ir stiebai jį naudojant pastebėti mažiau modifikuotos histoanatominijos [58]. Taip pat sukurta nauja optimizuota *in vitro* vegetatyvinio dauginimo procedūra, kuri susideda iš dviejų dalių. Kultivuojama 4 savaites naudojant 1,0 μ M BAP (skatinama greita ūglių proliferacija), vėliau 10 μ M IBR (skatinama šaknų indukcija). Šio tyrimo metu buvo pasiekta, kad 60 % augalų įsišaknijo, ši mikropropagavimo sistema tinka didelės apimties gamybai, visi maži įsišakniję augalai gali būti aklimatizuojami į *ex vitro* aplinką, tokia sistema gali būti naudinga genetiniams tyrimams ir šios rūšies išsaugojimui [9]. Pakseresht ir kolegų atliktame tyrime aprašoma, kad didžiausia kaliaus indukcija ir augimo greitis gautas naudojant 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP, 0,5 mg/l, NAR ir 1 mg/l BAP fitohormonus MS terpėse, o didesnis antrinių metabolitų kiekis pasiektas naudojant elicitorius: salicilo rūgštį, citrinų rūgštį,

mielių ekstraktą. Didžiausias *beta*-pineno kiekis gautas naudojant 16 mg/l salicilo rūgštį, o 1,8 – cineolio didžiausias kiekis gautas naudojant 2 mg/l citrinų rūgštį [59]. Triterpenoidų kiekio padidėjimas pastebėtas juozažolės ląstelių suspensijų kultūrose, kai terpėse buvo naudoti 2,4-D ir IAR [20]. *Hyssopus officinalis* ląstelių kultūrose, kurios buvo augintos, naudojant 1 mg/l NAR ir 0,2 mg/l BAP, buvo nustatyti junginiai: β -sitosterolis, stigmasterolis, oleino rūgštis, ursolio rūgštis [30]. Naudojant tokią pačią terpę kiti autoriai nustatė, kad ląstelių kultūrose juozažolė sukauptė rozmarino rūgštis – $3,32 \pm 0,11$ % [60]. MS terpėje su 2,4-D ir NAR vaistinės juozažolės ląstelių kultūros gamino sterolius [61].

1.6.2 Vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) apibūdinimas

Thymus L. gentis priklauso *Lamiaceae* šeimai ir susideda iš 928 rūšių, paplitusių Europoje, Azijoje, Pietų Amerikoje, Australijoje. Šiai genčiai priklausantys augalai pasižymi antibakteriniu aktyvumu: augalai sintetina įvairias antimikrobines medžiagas, kurios augalus apsaugo nuo UV spinduliuotės, sausros, aukštų ir žemų temperatūrų, dirvožemio druskingumo pasikeitimų bei mikroorganizmų, vabzdžių ir žolėdžių [62]. Viena iš žinomiausių ir svarbiausių *Thymus* L. genties rūšių yra *Thymus vulgaris* L. (žr. 1.5 pav.), tai daugiametis augalas, žydintis šviesiai rožiniais žiedais, turintis 30 chromosomų ($2n = 30$), dauginamas sėklomis ir stiebagumbiais [63]. Šis augalas naudojamas maisto (švieži ir džiovinti lapai), kosmetikos ir farmacijos (žiedų ir lapų eteriniai aliejai) pramonės šakose [62, 64]. Dermatologijoje visos augalo dalys naudojamos gydant žaizdas, opas, hepatomą [55]. Čiobreliai sukaupia tokias medžiagas, kaip monoterpenus, taninus, kavos rūgštį (1,8 %), chlorogeno rūgštį (1,1 %), oleanolio rūgštį (0,6 %), ursolio rūgštį (1,7 %), saponinus, timolį (15 – 62 %), karvakrolį (2 – 44 %), *p*-cimeną, γ -terpineną, liuteoliną, apigeniną, apigenin-7-glikozidą, liuteolin-7-gliukozidą, liuteolin-7-digliukozidą ir kitus antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių [7, 63].



1.5 pav. Vaistinis čiobrelis (*Thymus vulgaris* L.)

Atliktas tyrimas naudojant dujų chromatografiją – masių spektrofotometriją parodė, kad lauko sąlygomis „Kagavos“ universitete užauginti čiobreliai sukauptė šiuos lakius junginius: timolį (46,1 %), karvakrolį (3,4 %), linaloolį (1,7 %), 1-okten-3-olį (1,2 %), trans-sabineno hidratą (1,1 %), terpinen-4-olį (0,7%), borneolį (0,5%), kamparą (0,2%) ir 3-oktanolį (0,1 %) [7]. Vienas iš naujausių mokslinių straipsnių aprašo R. Pavel ir kitų grupės mokslininkų atliktą tyrimą, kurio metu atlikta čiobrelių eterinių aliejų analizė. Atlikti tyrimai parodė, kad eterinio aliejaus susidarymo kiekiui įtakos turi skirtingos tręšimo sąlygos (naudojant tręšimą per lapus, apipurškiant lapus azoto, fosforo oksido, kalio oksido ir salicilo rūgštis tirpalu). Didesnis kiekis eterinių aliejų išskirtas tik naudojant tręšimą nuo 5 iki 8 dienos, vėliau didelio skirtumo su netręšiamų augalų, sudaromu eterinio aliejaus kiekiu, nebuvo. Nustatant junginius, esančius eteriniame aliejuje, pastebėta, kad apdorotuose augaluose timolio kiekis yra nuo 62,1% iki 64,1%, o nepaveiktuose augaluose šis kiekis svyravo nuo 53,1% iki 62,7%. Taip pat didesnis kiekis paveiktuose augaluose rastas γ -terpineno ir *p*-cimeno, o kitų junginių

(α -pineno, mirceno, linaloolio, borneolio, karvakrolio, trans-karofileno) kiekiai skyrėsi nežymiai [65]. *Thymus vulgaris* augalo eteriniame aliejuje ir ekstrakte, taip pat nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis (atitinkamai: 3,00 mg/g; 44,16 mg/g), flavonoidų (0,36 mg/g; 17,86 mg/g), taninų (0,00 mg/g; 21,49 mg/g), triterpenoidų (208,66 mg/g; 108,80 mg/g), sulfatinių polisacharidų (0,00 mg/g; 40,99 mg/g) [66].

Čiobreliai, taip pat yra auginami ir laboratorinėmis sąlygomis, kuriomis siekiama parinkti palankiausias sąlygas ląstelių (kaliaus) kultūroms ir nustatyti jų sukaujamus antioksidacinius junginius ir jų kiekį bei antimikrobinį aktyvumą [6]. Mokslininkų grupė *Thymus vulgaris* L. augalus užaugino *in vitro* sąlygomis naudodami MS terpes su skirtingų koncentracijų hormonais ir užaugintuose augaluose nustatė lakių junginius. Visuose bandiniuose buvo rasta γ -terpineno, *p*-cimeno ir timolio. Svarbu paminėti, kad 1,0 μ M koncentracijos augimo reguliatoriai padidino timolio kiekį augaluose: 315 % (IAR), 200 % (BAP), lyginant su čiobreliais užaugintais MS terpėse be fitohormonų [10]. Užauginus *Thymus vulgaris* L. naudojant MS terpę su NAR ir kinetino arba 2,4-D ir kinetino hormonais, augaluose buvo rasti aštuoni terpenai (β -chamigrenas, nerolidolis, geranilacetonas, β -guaienas, cuparenas, γ -cuprenenas, β -elemenas ir timolis). Tiek lauke augintuose čiobreliuose, tiek *in vitro* sąlygomis buvo rasti tik du tokie patys junginiai: timolis ir β -elemenas. Auksino ir citokinino koncentracijos terpėje turi įtakos lakių junginių sukaupimui: timolio prirtakas biosintezėje yra γ -terpinenas, kuris gali būti transformuojamas į *p*-cimeną, o tada į timolį, fermentai reikalingi timolio biosintezėi yra aptinkami kaliaus kultūrose. Svarbu paminėti, kad timolis pasižymi ypatingai dideliu antioksidaciniu aktyvumu (žr. 1.22 poskyrį) [7]. *Thymus persicus* kaliaus kultūros 100 % susiformavimas pasiektas MS terpėse, naudojant 2 mg/l NAR ir 0,5 mg/l kinetiną, didesnis atžalų formavimasis ir dauginimosi dažnis pasiektas terpėse, naudojant BAP ir NAR derinius, o didžiausias ūglių skaičius gautas naudojant 2 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR. Auksino tipas ir koncentracija žymiai pakeičia šaknų formavimąsi, nustatyta, kad efektyviausias yra IBR [67]. Kitame tyrime formuojant *Thymus* L. kaliaus kultūras buvo naudoti 2 mg/l 2,4-D ir 1 mg/l kinetinas bei 150 mg/l ZnO nanodalelės, nustatyta, kad naudojant šias nanodaleles kaliaus kultūrose padidėjo timolio (22,8 mg/l) ir karvakrolio (0,68 mg/l) kiekiai [68].

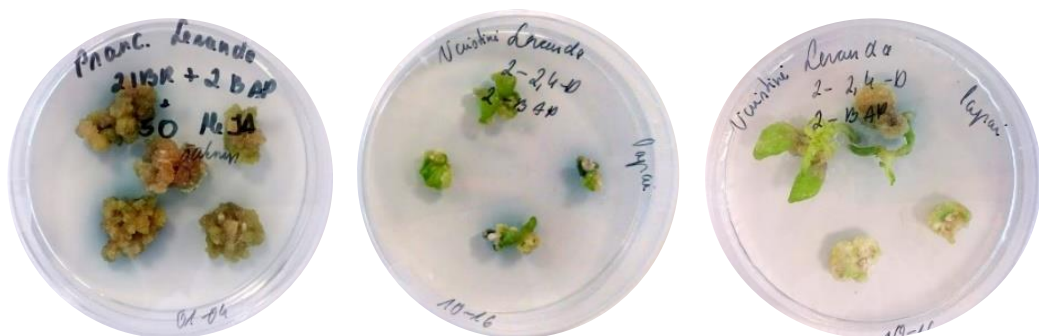
1.6.3 Levandos (*Lavandula* L.) charakteristika

Levanda (*Lavandula* L.) – tai dekoratyvinis, aromatinis augalas, dažnai naudojamas maisto, parfumerijos, farmacijos pramonėse [69]. Augalas gamina eterinius aliejus, kurie susideda iš 60 skirtingų junginių, tokių kaip linaloolas, linalilo acetatas, 1,8-cineolas, burneolis, terpenas ir kamparas [8]. Eteriniai aliejai pasižymi antibakteriniu (prieš *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*) [70], antioksidaciniu (lemia fenoliniai junginiai) poveikiais ir naudojami gydant leišmaniozę, slopina *Leishmania* rūšies pirmuonis (junginiai lemiantys šią savybę nenustatyti) [71], taip pat eterinius aliejus pasižymi raminančiu poveikiu yra naudojamas depresijos gydymui [8]. Levandų eterinis aliejus yra naudojamas gaminant vaistą „Silexan“ ir yra manoma, kad šis vaistas yra lygiavertis cheminiam antidepresantui „Lorazepam“ [8]. Dermatologijoje *Lavandula angustifolia* naudojama gydant mėlynės, nudegimus, žaizdas, plaukų slinkimą, opas [55].

Siekiant pagerinti augalus, padidinti naudingų antrinių metabolitų gamybą yra naudojami mikropropagavimo procesai grindžiami meristemų proliferacija ir organogeneze, pasitelkiant genetinius tyrimus ir ląstelių kultūras [8, 72]. *Lavandula angustifolia* turi daug naudingų vaistinių

komponentų tokių, kaip linaloolas ir linalilo acetatas. Ši augalo rūšis yra laikoma viena iš svarbiausių vaistinių augalų rūšių pasaulyje, naudojama skausmui malšinti, pasižymi priešgrybeliniu, antibakteriniu poveikiu, naudojamas gydant nudegimus, vamzdžių įkandimus. Mokslininkų Keykha, Khadem ir kt. darbe buvo atliktas tyrimas su šia levandų rūšimi, kurio metu buvo siekta suformuoti didžiausią kiekį kaliaus kultūrų keičiant tokias sąlygas, kaip apšvietimą (auginta tamsoje ir šviesoje), skirtingas augalo dalis (lapus, šaknis, stiebus), naudojant skirtingus fitohormonus MS terpėse. Didžiausias kiekis kaliaus kultūrų buvo suformuotas iš lapų naudojant fitohormonus 2 mg/l 2,4-D ir 2 mg/l BAP, tamsoje [8]. *Lavandula angustifolia* taip pat buvo auginama *in vitro* sąlygomis naudojant MS terpę ir organogenezė buvo pasiekta, naudojant papildomus augimo stimulatorius BAP ir GA₃ [69, 72]. Kitame tyrime aprašoma, kad *Lavandula angustifolia* kaliaus kultūras pavyko suformuoti naudojant MS terpę su 0,002 mg/l BAP, 0,1 mg/l IAR, 0,2 mg/l 2,4 D fitohormonais [73]. Geriausia terpė *Lavandula coronopifolia* mikroatžalų proliferacijai MS su 0,5 mg/l BAP, didžiausias įsišaknijimo dažnis gautas su 1 mg/l IBR, o didžiausias kaliaus kultūrų kiekis suformuotas iš lapų naudojant 1 mg/l NAR ir 0,5 mg/l BAP, tamsoje. Šiose kaliaus kultūrose buvo nustatyti fenolinių junginių kiekiai: kavos rūgštis (37 μg/g), rozmarino rūgštis (40 μg/g), rutinas (2,7 μg/g), kvercetas (0,6 μg/g), luteolinas (160 μg/g), hesperidinas (8 μg/g), tačiau nustatyti fenolinių junginių kiekiai buvo didesni *in vivo* augaluose, išskyrus kavos rūgštį [74].

Levandų kaliaus kultūros auginamos *in vitro* sąlygomis pasižymi tuo, kad gamina mėlyną pigmentą (ang. *blue pigment*). Dažniausiai jį gamina *Lavandula vera*, *Lavandula angustifolia*, *L. spica* rūšys [75, 76]. Į terpę išskiriamas junginys yra geltonos spalvos – 3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propeno rūgšties (Z,E)-2-(3-4 dihidroksifenil)etenilesteris, šis esteris reaguoja su terpėje esančiais Fe⁺² (geležies vaidmuo pigmento gamybai nėra aiškus) jonais ir susidaro mėlynos spalvos junginys (žr. 1.6 pav.) [77]. Junginys yra ksantino oksidazės inhibitorius (slopina šlapimo rūgšties gamybą žmogaus organizme; gydoma podagra ir hiperurikemija) [78]. Šis pigmentas yra gaunamas tik *in vitro* kultūroje, *in vivo* nėra aptinkamas. Auginant tamsoje susidaro rudos spalvos junginys. Mėlynas pigmentas gali būti naudojamas maisto (kaip dažas), farmacijos, kosmetikos pramonėse, tačiau gamybos metu produktyvumas yra mažas ir nėra pasiekiamas stabilumas. Optimizuojant procesą yra manipuluojama terpės sudėtimis (anglies šaltiniu, azotu, fosforu, Fe⁺², fitohormonais, sąlygomis (inokulianto kiekiu), naudojamas ląstelių imobilizavimas [77]. Pigmento pirmtakai L-cisteinas arba sieros turintys junginiai [78].



1.6 pav. Levandų kaliaus kultūros gaminamas „mėlynas pigmentas“

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1 Tyrimų objektas

Tyrimai buvo atlikti Kauno technologijos universiteto, Cheminės technologijos fakulteto, Biotechnologijos laboratorijoje. Tirti augalai – vaistinė juozažolė (*Hyssopus officinalis* L.), vaistinis čiobrelis (*Thymus vulgaris* L.), prancūziška levanda (*Lavandula stoechas* L.) ir vaistinė levanda (*Lavandula angustifolia* L.).

Vaistinės juozažolės sėklos buvo sterilintos – 12 min 0,1 % gyvsidabrio chlorido tirpale, po to 3 kartus perplautos steriliu distiliuotu vandeniu. Vaistinio čiobrelio sėklos sterilintos laikant jas 90 s 70 % etanolio tirpale, 10 min 0,1 % gyvsidabrio chlorido tirpale ir tris kartus perplautos steriliu distiliuotu vandeniu. Levandos sėklos sterilintos 1 min 70 % etanolio tirpale, 10 min 0,1 % gyvsidabrio chlorido tirpale, 10 min 1,5 % natrio hipochlorido tirpale ir tris kartus perplautos steriliu vandeniu. Sėklų sodinimas ir kaliaus formavimas atliktas steriliomis sąlygomis laminare. Laminaras sterilizuotas ultravioletiniais spinduliais ir 70 % etanoliumi. Sterilintos sėklos perkeltos į standartinę MS terpę [79], daigintos po liuminescencinėmis lempomis apšviestoje aplinkoje (fotoperiodas – 24 valandos), 20 – 23 °C temperatūroje. Sudygsusių sėklų nuotraukos pateiktos 2.1 pav. Dalis užaugusių ir sudžiovintų augalų naudoti tyrimams, o likę augalai kaliaus kultūroms suformuoti.



2.1 pav. *In vitro* augalai: 1 – *Lavandula stoechas*; 2 – *Hyssopus officinalis*; 3 – *Lavandula angustifolia*

2.2 Įranga, priemonės ir medžiagos

Atliekant tyrimus buvo naudota įranga: spektrofotometras (Shimadzu UV-1280), centrifugos (Hettich Universal 320R; neoLab Mini Centrifuge D-6015), pH – metras (WinLab), autoklavas, laminarai (Telstar V-100;), svarstyklės (Shinko Denshi AJ-220CE; ATX84), termostatas (Binder), purtyklė (Biosan ES-20), vandens vonelės (Memmert; Biosan BWT-U), automatinės mikropipetės (Piper4u; Epperndorf); filtrinis popierius (WinLab), pincetai, skalperiai, spiritinės lemputės, kilpelės.

Naudotos cheminės medžiagos (gamintojas, šalis): geležies (III) chlorido heksahidratas („Reachem“, Slovakija); 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas („Sigma – Aldrich“, Vokietija); nastro karbonatas („Reachem“, Slovakija); 2 N Folino – Kiokalto fenolinis reagentas („Sigma – Aldrich“, Vokietija); makro druskos; mikro druskos; organiniai priedai; sacharozė („Reachem“, Slovakija); agaras; Fe – EDTA; auksinai: 2,4-D, IBR, NAR; citokininai: kinetinas, BAP; etanolis („Stumbras“, Lietuva); acetonas („Reachem“, Slovakija); vandenilio chloridas („Reachem“, Slovakija), etilo acetatas („Reachem“, Slovakija), aliuminio chloridas („Reachem“, Slovakija), metanolis („Reachem“, Slovakija), kalio heksacianoferatas („Alfa Aesar“, JAV), trichloracto rūgštis („Reachem“, Slovakija), albuminas, Bradfordo reagentas („Sigma – Aldrich“, Vokietija), L – prolinas, ninhidrinas, fosforo rūgštis („Reachem“, Slovakija), acto rūgštis („Reachem“, Slovakija), ditiotritolis („Sigma – Aldrich“, Vokietija), fenilmetilsulfonilfluoridas („Sigma – Aldrich“, Vokietija), dimetilsulfoksidas

(„Reachem“, Slovakija), polivinilpirolidas („Sigma – Aldrich“, Vokietija), Tris – HCl buferinis tirpalas, tritonas X - 100, nitromėlynojo tetrazolis, L - metioninas, riboflaminas, vandenilio peroksidas („Reachem“, Slovakija), askorbo rūgštis, EDTA, tiobarbiturinė rūgštis, natrio chloridas, triptofanas, mielių ekstraktas („Roth“, Vokietija), mikro agaras („Merck“, US ir Kanada), Tryptic Soy Broth („Fluka Analytical“), natrio hidroksidas („Reachem“, Slovakija).

2.3 Mitybinių terpių gamyba

Po sterilinimo sėklos perkeltos į MS terpę [79], kurios sudėtis pateikta 2.1 lentelėje, o reikalingų reagentų kiekiai pateikti 2.2 lentelėje. Pagaminus reikiamą kiekį terpės, nustatytas pH = 5,7. Maitinamoji terpė sterilinta autoklave 120 °C, esant 0,75 – 1 atm slėgiui 15 min.

2.1 lentelė. Maitinamosios Murashige ir Skoog (MS) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale, mg/l	Koncentracija terpėje
Makroelementai ^b		
NH ₄ NO ₃	33000	1650
KNO ₃	38000	1900
CaCl ₂ •2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ •7H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai ^c		
KJ	166	0,82
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ •4 H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ •7 H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ •2 H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ •5 H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ •6 H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis ^c		
FeSO ₄ •7 H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA•2 H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai ^c		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas - HCl	100	0,5
Tiaminas - HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Sacharozė		30000
Agar - agaras		5

b – 50 ml pilta į terpę

c – 5 ml pilta į terpę

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

Reagentai	Reagentų kiekis reikalingas 1 l terpės
Makrodruskos	50 ml
Mikrodruskos	5 ml
Fe - EDTA	5 ml
Sacharozė	30 g
Agaras	5 g
Organiniai priedai	5 ml

MS terpė naudota kaliaus kultūroms formuoti papildyta augimo reguliatoriais. Fitohormonų pradinis tirpalas pagaminamas 0,1 mg/ml koncentracijos. Pirmiausia pasverta 10 mg augimo reguliatoriaus ir užpilta 2 – 5 ml tirpiklio, visiškai junginiui ištirpus įpiltas dvigubas kiekis distiliuoto vandens, išmaišius tirpalą pripilta vandens iki 100 ml (tirpalas ruošiamas 100 ml matavimo kolboje). Reikalingas paimti tirpalo tūris apskaičiuotas (1) formule. Gautas tūris praskiestas iki 100 ml.

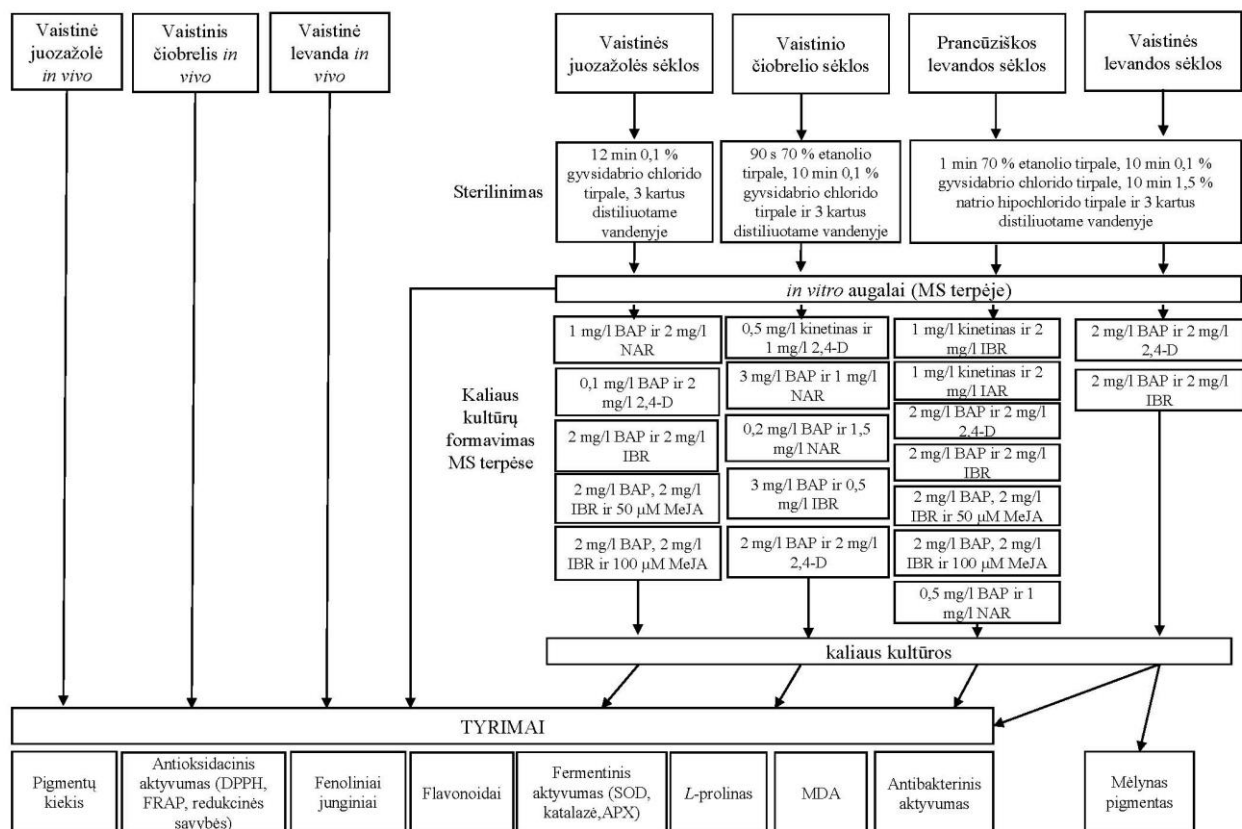
$$\text{reikalingas fitohormono kiekis, ml} = \frac{\text{norima fitohormono koncentracija, mg/ml} \times \text{terpės tūris, l}}{\text{turima fitohormono koncentracija, mg/ml}} \quad (1)$$

2.3 lentelė. Kaliaus kultūroms suformuoti MS terpėse naudoti fitohormonai ir elicitoriai ir jų koncentracijos

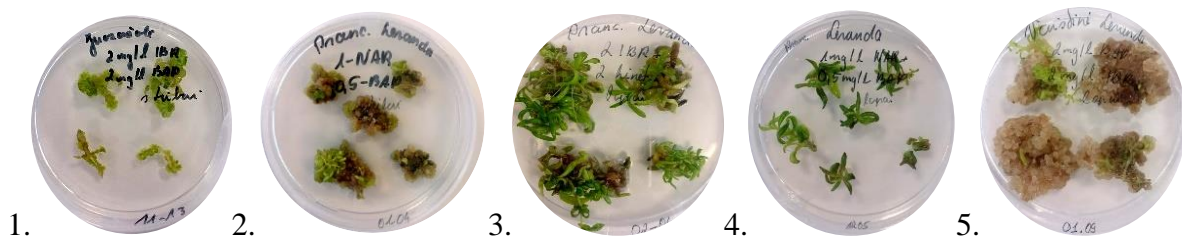
Augalas	MS terpėse naudoti fitohormonai ir elicitoriai, jų koncentracijos
Vaistinė juozažolė (<i>Hyssopus officinalis</i> L.)	1 mg/l BAP ir 2 mg/l NAR
	0,1 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D
	2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR
	2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 50 µM MeJA
	2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 100 µM MeJA
Vaistinis čiobrelis (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D
	3 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR
	0,2 mg/l BAP ir 1,5 mg/l NAR
	3 mg/l BAP ir 0,5 mg/l IBR
	2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D
Prancūziška levanda (<i>Lavandula stoechas</i> L.)	1 mg/l kinetinas ir 2 mg/l IBR
	1 mg/l kinetinas ir 2 mg/l IAR
	2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D
	2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR
	2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 50 µM MeJA
	2mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 100 µM MeJA
	0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR
Vaistinė levanda (<i>Lavandula angustifolia</i> L.)	2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D
	2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR

Kaliaus kultūros formuotos iš skirtingų augalo dalių (šaknų, stiebų ir lapų) MS terpėse su fitohormonais ir elicitoriais. Kiekvienam augalui remiantis literatūros apžvalga parinkti įvairūs ir

skirtingų koncentracijų fitohormonai ir elicitoriai, jie pateikti 2.3 lentelėje. Tyrimų atlikimo eiga pateikta 2.2 pav. Suformuotų kaliaus kultūrų nuotraukos pateiktos 2.3 paveiksle.



2.2 pav. Tyrimų atlikimo eiga



2.3 pav. Kaliaus kultūros *in vitro*: 1 – *Hyssopus officinalis*; 2, 3, 4 – *Lavandula stoechas*; 5 – *Lavandula angustifolia*

2.7 Pigmentų kiekio įvertinimas

Karotinoidų, chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* nustatymas vaistiniuose augaluose paremtas šviesos sugerties nustatymu, esant skirtingiems bangų ilgiams (karotinoidų – 441 nm; chlorofilo *a* – 662 nm; chlorofilo *b* – 644 nm). 0,5 g susmulkintos augalinės medžiagos buvo užpilta 20 ml 96 % etanolio, viskas susmulkinta iki vientisos masės ir centrifuguota. Ekstraktų tūris išmatuotas cilindru. Išmatuota tirpalų šviesos sugertis ties 441 nm, 662 nm, 644 nm bangos ilgiais. Pigmentų koncentracija apskaičiuota (2, 3, 4, 5) formulėmis. Pigmentų kiekis mg/100g perskaičiuotas (6) formule [80].

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija mg/l: } c_a = 9,784D_{662} - 0,99D_{644}; \quad (2)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija mg/l: } c_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662}; \quad (3)$$

$$c_a + c_b = 5,134D_{662} + 20,346D_{644}; \quad (4)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija mg/l: } c_{\text{karotinoidai}} = 4,695D_{441} - 0,268(c_a + c_b); \quad (5)$$

$$X = \frac{c \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000}; \quad (6)$$

čia:

C – pigmentų koncentracija, mg/l; V – pradinis ekstrakto tūris, ml; V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui; V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml; n – augalinė masė, g.

2.5 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

2.5.1 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas įvertintas nustatant, kiek procentų stabilus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH •) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai. DPPH • radikalas yra violetinės spalvos, absorbcijos maksimumas yra 520 nm bangos ilgyje. Reakcijos metu antioksidantas atiduoda vandenilį ir taip nuslopina laisvuosius radikalus ir jie tampa stabiliais DPPH – H tipo junginiais, violetinė spalva išnyksta, absorbcija sumažėja [20, 81].

Tyrimams buvo naudotas 0,2 g susmulkintos augalinės žaliavos, kuri užpilta 2 ml metanolio ir buvo homogenizuota 10 min, centrifuguota 9000 aps/min 10 min ir supernatantas surinktas. Į mėgintuvėlį įpilta 0,077 ml surinkto supernatanto ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Palyginamasis tirpalas paruoštas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml metanolio ir 3 ml DPPH etaloninio tirpalo. Mėgintuvėlių turinys sumaišytas ir 15 min laikytas tamsoje, išmatuota šviesos sugertis 515 nm bangos ilgyje. Etaloninis DPPH tirpalas paruoštas 0,0024 g DPPH ištirpinus 100 ml metanolio. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuotas (7) formule [82].

$$\% \text{ slopinimas} = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \cdot 100; \quad (7)$$

čia:

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.5.2 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Metodas remiasi antioksidantų gebėjimu sumažinti Fe⁺³ jonus: Fe⁺³ – TPTZ komplekso pasikeitimu į Fe⁺² – TPTZ kompleksą. Fe⁺² prijungimas prie ligando suteikia intensyvią mėlyną spalvą, todėl galima išmatuoti absorbciją. Absorbcija matuojama 593 nm bangos ilgyje [20, 83].

Paruošti tirpalai: 300 mM acetatinis buferis (pH = 3,6); 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/l HCl, 20 mmol/l FeCl₃•6 H₂O. 0,1 g augalinės žaliavos užpilta 5 ml metanolio, ekstrahuota 45 °C 30 min, ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min 10 min. Paruoštas FRAP reagentas: 25 ml 300 mM acetatinio buferio, 2,5 ml TPTZ, 2,5 ml FeCl₃•6 H₂O. 100 ml augalo ekstrakto sumaišyta su 3 ml FRAP reagento. Reakcijos mišinys matuotas naudojant spektrofotometrą 593 nm bangos ilgyje.

Kalibracinės kreivės mėginiai paruošti iš 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/l}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Tirpalų sugertis išmatuojama 593 nm bangos ilgyje. Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas apskaičiuotas pagal kalibracinę kreivę, rezultatai pateikti: $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ $\mu\text{mol/l}$ 100 mg sauso svorio [84].

2.5.3 Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas

Šis metodas remiasi kalio fericianido redukcija. Absorbcijos padidėjimas siejasi su antioksidantų redukcine geba. Junginiai su antioksidaciniu aktyvumu reaguoja su kalio fericianidu susidaro kalio ferocianidas. Šis reaguoja su geležies trichloridu, gaunamas geležies ferocianidas, mėlynos / žalios spalvos kompleksas, kurio absorbcija matuojama 700 nm bangos ilgyje [20].

0,1 g augalinės medžiagos užpilta 5 ml metanolio, ekstrahuota 45 °C 30 min, ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min 10 min. Į 0,5 ml skirtingų koncentracijų augalų ekstraktus įpilta 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,25 ml $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, sumaišyta ir inkubuota 50 °C 20 min. Po to pridėta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, sumaišyta ir centrifuguota 9000 aps/min 10 min. 2,5 ml supernatanto sumaišyta su 2,5 ml distiliuoto vandens ir 0,5 ml 0,1 % FeCl_3 . Mėginių absorbcija išmatuota 700 nm bangos ilgyje. Pagal šviesos sugerties dydį sprendžiama apie antioksidacines augalų savybes, kuo didesnė šviesos sugertis tuo antioksidacinė geba yra didesnė [85].

2.6 Fenolinių junginių kiekio įvertinimas

0,05 g susmulkintos augalinės medžiagos užpilta 10 ml 70 % acetono ir maišyta 20 min kambario temperatūroje termostuojamajame kratytuve, centrifuguota 9000 aps/min 10 min 4 °C temperatūroje. Paimama ekstrakto 25, 50, 100 μl ir praskiesta distiliuotu vandeniu iki 500 μl . Įpilta 250 μl Folino – Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato. Kalibravimo kreivė ruošta iš 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μl standartinio tanino rūgšties tirpalo, tirpalai praskiesti vandeniu iki 500 μl . Į tirpalus pridėta 250 μl Folino – Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato. Tirpalai laikyti tamsoje 40 min, sumaišyti ir išmatuotas optinis tankis 725 nm bangos ilgyje. Bendras fenolinių junginių kiekis mg/100mg apskaičiuota (8) formule [86].

$$X = aV \cdot \frac{100}{n \cdot V_1}; \quad (8)$$

čia:

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V_1 – pradinis ekstrakto tūris paimtas praskiedimui, ml;

n – augalinė masė, mg.

2.7 Flavonoidų kiekio įvertinimas

Į apvaliadugnę kolbą įberta 2 g susmulkintos augalinės medžiagos, įpilta 20 ml acetono, 2 ml 28 % HCl tirpalo ir virinta 30 min su grįžtamu šaldytuvu. Atvėsęs hidrolizatas buvo filtruotas į 100 ml matavimo kolbą. Nuosėdos gražintos į kolbą ir užpiltos 20 ml acetonu, virinta dar 10 min ir filtruota į tą pačią kolbą. Kolba pripildyta acetonu iki brūkšnio. 20 ml ekstrakto praskiesta 20 ml distiliuotu vandeniu ir ekstrahuota etilo acetatu: 1 kartą – 15 ml, 3 kartus – 10 ml. Surinkta viršutinė fazė praplauta vandeniu 2 kartus po 40 ml. Gautas tirpalas filtruotas į 50 ml kolbą, iki brūkšnio užpildyta etilo acetatu. Paruošti du tirpalai tiriamasis ir palyginamasis. Tiriamasis: 10 ml tirpalo sumaišyta su 2 ml 20 g/l aliuminio chlorido tirpalo ir pripildyta acto rūgšties ir metanolio tirpalo (1:19) iki 25 ml.

Palyginamasis tirpalas: 10 ml tirpalo praskiesta acto rūgštis ir metanolio mišiniu iki 25 ml. Abu tirpalai 30 min laikyti tamsoje ir išmatuota tirpalo šviesos sugertis 426 nm bangos ilgyje. Flavanoidų kiekis (%) apskaičiuotas (9) formule [87].

$$X = \frac{A \cdot k}{m}; \quad (9)$$

čia:

A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

k – perskaičiuotas koeficientas hiperozidui (k = 1,25);

m – augalinės žaliavos masė, g.

2.8 Fermentinio aktyvumo įvertinimas

2.8.1 Superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos baltymų ekstrakcija vykdyta 4 ml 0,066 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH=7,4), turinčiame 1mM ditiotritolio, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido, ištirpinto DMSO, ir 1 mg polivinilpirolido. Mėginai maišyti 15 min kambario temperatūroje termostuojamajame kratytuve ir centrifuguoti 15 min 9000 aps/min. Reakcijos mišinys paruoštas iš 40 µl fermentinio preparato, 400 µl Tris – HCl buferinio tirpalo (pH = 7,8), 500 µl 0,025 % tritono X - 100, 200 µl nitromėlynojo tetrazolio, 200 µl L-metionino, 20 µl riboflamino, 620 µl H₂O. Kontrolinis mėginys ruošiamas be fermentinio preparato, naudojant 40 µl H₂O. Reakcija vykdyta apšviečiant mėginius 30 min liuminescencinėmis lempomis. Šviesos sugertis išmatuota 560 nm bangos ilgyje. Fermentinis aktyvumas apskaičiuotas (10) formule.

$$A = \frac{\log \frac{E_K}{E_T}}{\log 2 \times m}; \quad (10)$$

čia:

A – SOD aktyvumas vnt/ml;

E_K – šviesos sugertis kontrolinio mėginio;

E_T – šviesos sugertis tiriamojo mėginio;

m – baltymo masė preparato tūryje mg/ml (apskaičiuota pagal *Bradfordo* metodą, nurodyta 2.9).

2.8.2 Katalazės aktyvumo įvertinimas

0,1 g susmulkintoje augalinėje žaliavoje baltymų ekstrakcija vykdyta 4 ml 0,05 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH=7,8), turinčiame 1mM ditiotritolio, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido, ištirpinto DMSO, ir 1 mg polivinilpirolido. Mėginai maišyti 15 min kambario temperatūroje termostuojamajame kratytuve ir centrifuguoti 15 min 9000 aps/min. Reakcijos mišinys ruoštas iš 100 µl fermentinio preparato, 3900 µl 0,05 M K/Na fosfatinio buferio ir 0,2 ml 0,1 M vandenilio peroksido. Vandenilio peroksidas į bendrą mišinį įpiltas prieš matavimą, šviesos sugerties matavimo dinamika registruota 3 min 240 nm bangos ilgyje, naudojamos kvarcinės kiuvetės. Fermento aktyvumas apskaičiuotas (11) formule.

$$A = \frac{1000 \times \Delta E \times V}{k \times m}; \quad (11)$$

čia:

A – sunaudoto vandenilio peroksido greitis per 1 min/1 mg baltyminio preparato;
 ΔE – vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;
V – bendras mišinio tūris, ml;
k – molinis ekstinkcijos koeficientas (32,57);
m – baltymo masė preparato tūryje mg/ml (apskaičiuota pagal *Bradfordo* metodą, nurodyta 2.9).

2.8.3 Askorbatperoksidazės įvertinimas

0,1 g susmulkintoje augalinėje žaliavoje baltymų ekstrakcija vykdyta 4 ml 0,1 M fosfatiniame buferyje (pH=7), turinčiame 1mM ditiotritolio, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido, ištirpinto DMSO, ir 1 mg polivinilpirolido. Mėginai maišyti 15 min kambario temperatūroje termostuojamajame kratytuve ir centrifuguoti 15 min 9000 aps/min. Reakcijos mišinys ruoštas iš 0,2 ml fermentinio preparato, 3 ml fosfatinio buferio (pH=7), 0,6 ml askorbo rūgšties, 0,06 ml EDTA, 0,06 ml vandenilio peroksido. Reakcija prasidėjo pridėjus vandenilio peroksido, šviesos sugertis matuota 3 min 290 nm bangos ilgyje. Fermento kiekis apskaičiuojamas (12) formule.

$$A = \frac{\Delta E \times \left(\frac{V_1}{1000} + V_2 + V_3 \right)}{k \times m}; \quad (12)$$

čia:

A – askorbatperoksidazės aktyvumas, mmol/mg;
 ΔE – vidutinė šviesos sugerties reikšmė per 1 min;
 V_1 – pavyzdžio tūris, μ l;
 V_2 – buferio tūris, μ l;
 V_3 – vandenilio peroksido tūris, ml;
k – molinės ekstinkcijos koeficientas (2,8 nmol/cm);
m – baltymo masė preparato tūryje mg/ml (apskaičiuota pagal *Bradfordo* metodą, nurodyta 2.9).

2.9 Baltymų kiekio įvertinimas

Baltymų kiekis augalinėje medžiagoje buvo nustatymas remiantis *Bradfordo* metodu. Pirmiausia buvo sudaryta albumino kalibracinė kreivė. Paruoštas albumino tirpalas: 25 mg albumino ištirpinta 25 ml vandens. Pasiruošti skirtingų koncentracijų albumino tirpalai: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,12; 0,14 mg/ml. Į mėgintuvėlį įpilta 0,2 ml pasiruošto albumino tirpalo ir 2 ml *Bradfordo* reagento. Mėginiai buvo sumaišyti ir tirpalo šviesos sugertis išmatuota 595 nm bangos ilgyje. Kontroliniam mėginiui naudota: 0,2 ml distiliuoto vandens ir 2 ml *Bradfordo* reagento.

Baltymų kiekis augalinėje žaliavoje: 0,1 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilta 4 ml buferinio tirpalo (tirpalas priklauso nuo fermento aktyvumo nustatymo metodikoje naudojamo buferinio tirpalo). Mėginys maišytas 15 min kambario temperatūroje termostuojamajame kratytuve ir centrifuguotas 15 min 9000 aps/min. Baltymų kiekis nustatytas iš albumino kalibracinės kreivės (mg/ml) [88].

2.10 Prolino kiekio įvertinimas

Pirmiausia buvo sudaryta prolino kalibracinė kreivė. Atsverta 0,0011 g *L*-prolino ir ištirpinta 10 ml H₂O. Paruoštos koncentracijos: 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 mM. Į mėgintuvėlius įpilta 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrino tirpalo, mėgintuvėliai kaitinti 1 val verdančio vandens vonelėje. Skirtingų

koncentracijų tirpalų šviesos sugertis išmatuota 520 nm bangos ilgyje. Iš gautų rezultatų sudaryta kalibracinė kreivė.

0,1 g susmulkintos augalinės medžiagos užpilta 4 ml distiliuotu vandeniu. Mėgintuvėliai su augaline žaliava buvo užvirti 3 kartus ir atšaldyti. Ekstraktas centrifuguotas 10 min 9000 aps/min ir praskiestas iki 6 ml distiliuotu vandeniu. Paruoštas tiriamasis mėginys: 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento (1,25 g ninhidrino, 20 ml 6M H₃PO₄, 30 ml acto rūgšties) ir virtas 1 val verdančio vandens vonelėje. Kontrolinis mėginys buvo paruoštas vietoje 1 ml ekstrakto paimant 1 ml distiliuoto vandens. Šviesos sugertis buvo matuota 520 nm bangos ilgyje. Prolino kiekis apskaičiuotas, naudojantis kalibracine kreive, (13) formule [89].

$$C_x = \frac{E \times k \times V_1}{V_2 \times m}, \quad (13)$$

čia:

C_x – prolino koncentracija μmol/g;

E – tirpalo šviesos sugertis;

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

V₁ – bendras ekstrakto tūris, ml;

V₂ – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.

2.11 Malondialdehido kiekio įvertinimas

Pirminių lipidų hidroperoksidų kiekybinis nustatymas yra sudėtingas, todėl dažniausiai lipidų peroksidacijos laipsnis apskaičiuojamas nustatant antrinių skilimo produktų koncentracijas iš pradinių hidroperoksidų [49]. Dažniausiai, kaip oksidacinio streso matas naudojamas MDA, nes peroksidacijos metu jo susidaro daugiau [50]. Aldehido kiekis gali būti nustatomas naudojant tiobarbitūro rūgštį, efektyviają skysčių chromatografiją, masių spektroskopiją, dujų chromatografiją, imunologinius metodus [49, 51]. Šiame darbe MDA nustatymas atliktas naudojant tiobarbitūro rūgštį. MDA ir tiobarbitūro rūgštis sudaro rožinės spalvos fluorescuojantį MDA – tiobarbitūro rūgšties kompleksą. Šis metodas turi trūkumų, nes tiobarbitūro rūgštis gali reaguoti ne tik su MDA, bet ir su kitais junginiais (angliavandeniais, aminorūgštimis, piridiniais, kitais antriniais lipidų peroksidacijos produktais). Dėl to gali būti nustatytas per didelis MDA kiekis [51].

0,1 g susmulkintos augalinės medžiagos homogenizuota 1,5 ml 20 % trichloracto rūgštimi 15 min kambario temperatūroje termostuojamajame kratytuve ir centrifuguoti 10 min 9000 aps/min 4 °C. 0,3 ml supernatanto sumaišyta su 1,2 ml 0,5 % tiobarbitūro rūgštimi, ištirpinta 20 % trichloracto rūgštyje, ir inkubuota 95 °C temperatūroje 30 min. Mišinys atšaldytas ir centrifuguotas 15 min 9000 aps/min. Tirpalų šviesos sugertis išmatuota 532 ir 600 nm bangų ilgiuose. Malondialdehido kiekis apskaičiuotas (14) formule [90].

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \times V_1 \times 2}{k \times m \times V_2}, \quad (14)$$

čia:

C_x – MDA kiekis, μmol/l;

E – tirpalo šviesos sugertis;

V₁ – ekstrakto tūris, ml;

V_2 – ekstrakto tūris analizei, ml;

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

m – bandinio masė, ekstrakcijai, g.

2.12 Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

2.12.1 Augalų ekstraktų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Antibakterinis vaistinių augalų aktyvumas buvo nustatytas prieš gramneigiamas bakterijas: *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* ir prieš gramteigiamą bakteriją – *Listeria monocytogenes*. Aktyvumas buvo nustatytas agaru difuziniu metodu [91]. Buvo naudota LB terpė [92], jos sudėtis pateikta 2.4 lentelėje. *Listeria monocytogenes* bakterijų terpė pateikta 2.5 lentelėje.

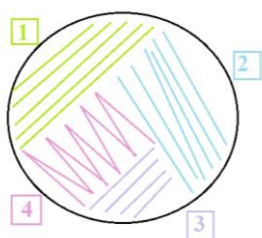
2.4 lentelė. LB terpės sudėtis *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* bakterijoms

Reagentai	Reagentų kiekis reikalingas 1 l terpės
NaCl	10 g
Triptofanas	10 g
Mielių ekstraktas	5 g
Mikro agaras	10g

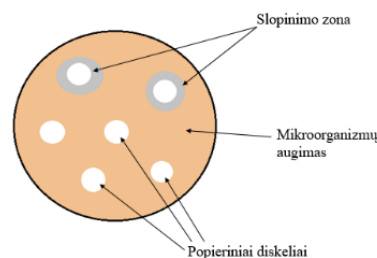
2.5 lentelė. Terpės sudėtis *Listeria monocytogenes* bakterijoms

Reagentai	Reagentų kiekis reikalingas 1 l terpės
Tryptic Soy Broth	30 g
Mielių ekstraktas	3 g
Agaras	6 g

Terpė sterilinta autoklave $120 \text{ }^\circ\text{C}$, esant $0,75 - 1 \text{ atm}$ slėgiui 15 min, atvėsusi terpė išpilstyta į *Petri* lėkšteles. Po kelių dienų, pilnai sustingus terpei, atliktas bandymas. Į *Petri* lėkštes įpilta $50 \mu\text{l}$ bakterijų suspensijos ($0,1 \text{ Abs}$) ir bakterijos lėkštelėje išsklaidytos 2.4 paveiksle nurodyta technika. Ant tepės paviršiaus uždėti 6 popieriniai diskeliai ir ant jų užpilta $25 \mu\text{l}$ augalų ekstrakto. *Petri* lėkštelės inkubuotos $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje termostate 24 val. Po inkubavimo stebėtas antibakterinis aktyvumas, išmatuota slopinimo zona (mm), zonos pavyzdys pateiktas 2.5 paveiksle.



2.4 pav. Bakterijų užsėjimas *Petri* lėkštelėse



2.5 pav. Bakterijų slopinimo zona *Petri* lėkštelėje

Vaistinių augalų ekstraktas antibakteriniam aktyvumui nustatyti buvo ruošiamas naudojant DMSO (dimetilsulfoksido) tirpalą. Į 1 g susmulkintos augalinės žaliavos buvo įpilta 10 ml DMSO. Paruošti 100 mg/ml koncentracijos tirpalai.

2.12.2 Antibiotikų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Rezultatų palyginimui taip pat nustatytas skirtingų koncentracijų antibiotikų gentamicino (50 µg/ml, 100 µg/ml), cezalono (300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml) ir levofloksacino (12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* bakterijas, agar difuziniu metodu. Visi šie antibiotikai veikia prieš gramneigiamas bakterijas, išskyrus levofloksaciną, jis veikia ir prieš gramteigiamas bakterijas. Todėl prieš *Listeria monocytogenes* naudotas 25 µg/ml koncentracijos levofloksacinas.

2.13 Statistinė analizė

Rezultatai buvo įvertinti statistiškai, kiekvienas matavimas kartotas tris kartus, rezultatuose pateiktas vidurkis ir standartinės paklaidos (vidurkis ± SE).

2.14 3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propeno rūgšties (Z,E)-2-(3-4 dihidroksifenil)etenilesterio (mėlyno pigmento) kiekio įvertinimas

Mėlyno pigmento kiekis buvo nustatytas vaistinės levandos ląstelių kultūroje, skysta terpė buvo papildyta 2 mg/l 2,4-D ir 2 mg/l BAP fitohormonais. Kultūra auginta 17 dienų, kas 5 dienos buvo matuotas ląstelių ir mėlyno pigmento kiekis.

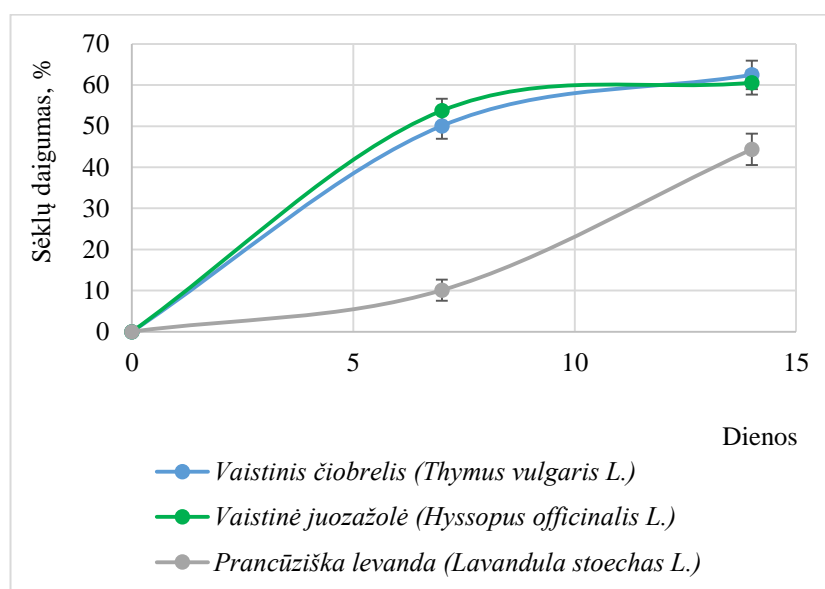
Ląstelių kiekis matuotas, kaip sausas svoris. Paimta 3 ml ląstelių suspensijos, perfiltruota per žinomo svorio filtrą. Ląstelės 70 °C temperatūroje išdžiovintos iki pastovios masės.

Mėlyno pigmento kiekis nustatytas paėmus 3 ml mėginio iš kultūros terpės, centrifuguota 10 000 g 5 min. Supernatantas nupiltas ir pridėta 3 ml parūgštinto metanolio (1 % HCl), centrifuguota, pridėta 0,2 ml 3 M NaOH. Mėlyno pigmento absorbcija nustatyta 600 nm bangos ilgyje (maksimali absorbcija mėlyno pigmento šarminiame pH). Pigmento kiekis išreikštas absorbcijos vienetais (A_{600}) 1 g sausos masės [77].

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Sėklų daigumo įvertinimas MS terpėje

Vaistinės juozažolės, paprastojo čiobrelio ir prancūziškos levandos sėklos buvo daigintos MS terpėje, stebėtas daigumas po 7 ir 14 dienų. Gauti rezultatai pateikti 3.1 paveiksle grafiškai. Vaistinės juozažolės po 7 dienų buvo sudygę – $53,8 \pm 2,9$ % sėklų, po 14 dienų – $60,6 \pm 2,9$ %. Paprastojo čiobrelio po 7 dienų buvo sudygę – $50,1 \pm 3,1$ % sėklų, po 14 dienų – $62,5 \pm 3,5$ % sėklų. Prancūziškos levandos po 7 dienų – $10,09 \pm 2,5$ % sėklų, po 14 dienų – $44,35 \pm 3,8$ % sėklų.



3.1 pav. Vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir prancūziškos levandos (*Lavandula stoechas* L.) sėklų daigumas MS terpėje

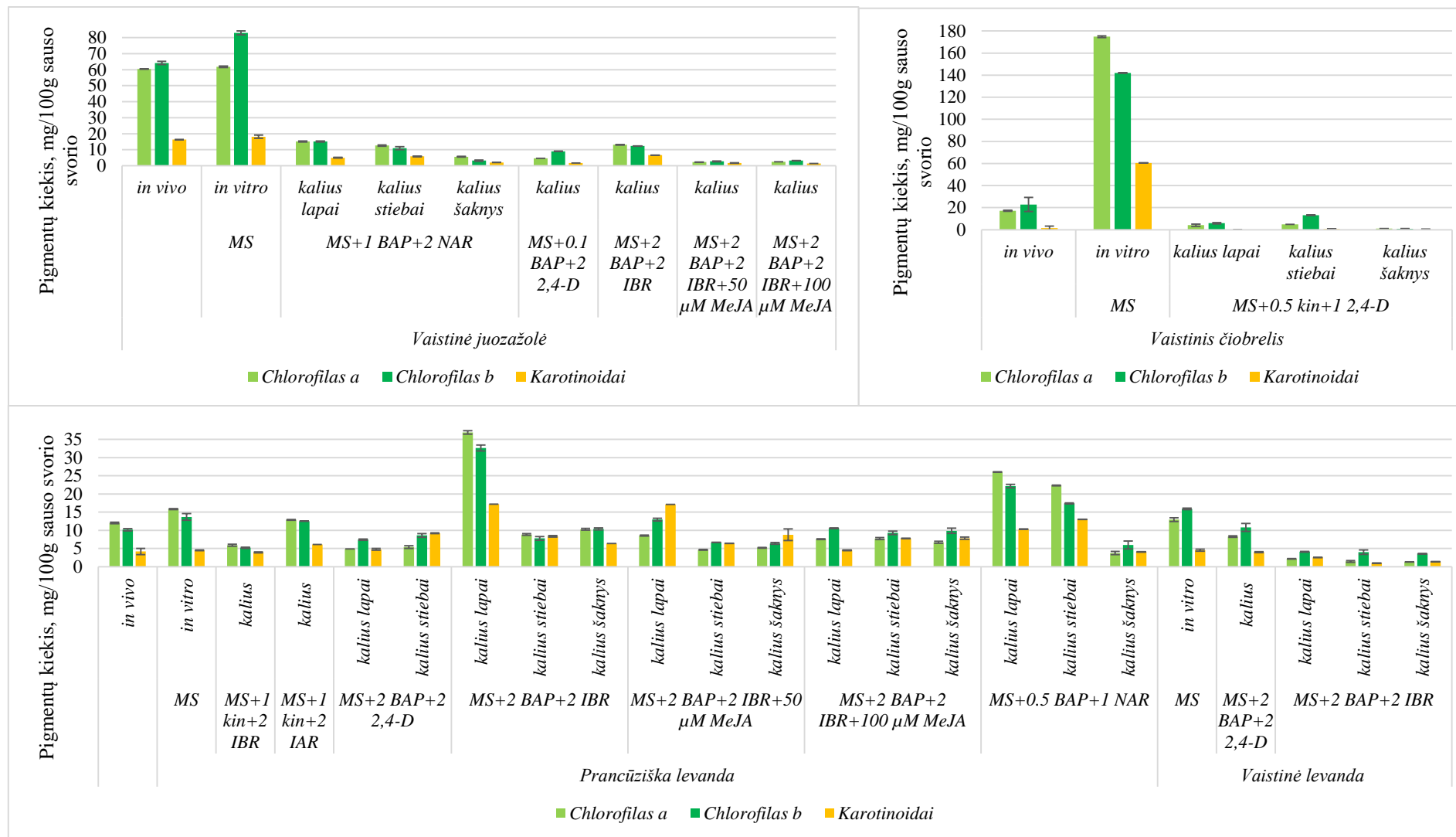
3.2 Pigmentų kiekio įvertinimas

Pigmentų (chlorofilo *a*, *b* ir karotinoidų) kiekio nustatymui naudoti vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.), prancūziškos levandos (*Lavandula stoechas* L.) ir vaistinės levandos (*Lavandula angustifolia* L.) augalai užauginti *in vivo*, *in vitro* sąlygomis (MS terpėje) ir suformuotos kaliaus kultūros naudojant skirtingus fitohormonus.

Įvertinus pigmentų kiekį (žr. 3.2 pav.) nustatyta, kad vaistinė juozažolė didžiausią pigmentų kiekį sukaupe *in vitro* sąlygomis MS terpėje (chlorofilo *a* – $61,8 \pm 0,4$ mg/100g, chlorofilo *b* – $82,9 \pm 1,2$ mg/100g ir karotinoidų – $18,2 \pm 1,02$ mg/100g). Didesnio kiekio pigmentų kaliaus kultūrose vaistinė juozažolė nesukaupe.

Vaistinis čiobrelis didžiausią pigmentų kiekį sukaupe *in vitro* sąlygomis MS terpėje (chlorofilo *a* – $174,8 \pm 0,8$ mg/100g, chlorofilo *b* – $141,9 \pm 0,3$ mg/100g ir karotinoidų – $60,5 \pm 0,1$ mg/100g). Didesnio kiekio pigmentų kaliaus kultūrose vaistinis čiobrelis nesukaupe.

Prancūziška levanda didžiausią kiekį pigmentų sukaupe kaliaus kultūrose iš lapų, kai buvo naudoti 2mg/l BAP ir 2 mg/l IBR fitohormonai (chlorofilo *a* – $39,9 \pm 0,47$ mg/100g, chlorofilo *b* – $32,6 \pm 0,8$ mg/100g ir karotinoidų – $17,18 \pm 0,02$ mg/100g), taip pat didelį kiekį sukaupe, kai buvo naudoti 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR fitohormonai (chlorofilo *a* – $26,02 \pm 0,07$ mg/100g, chlorofilo *b* – $22,15 \pm 0,48$ mg/100g ir karotinoidų – $10,34 \pm 0,06$ mg/100g).



3.2 pav. Pigmentų kiekis vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula L.*) augaluose augintuose *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis bei suformuotose kaliaus kultūrose

Didelį kiekį karotinoidų sukaupė kaliaus kultūros iš stiebų ($13,02 \pm 0,03$ mg/100g), kai buvo naudoti 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR fitohormonai, ir kaliaus kultūros iš lapų ($17,13 \pm 0,03$ mg/100g), kai buvo naudoti 2mg/l BAP ir 2 mg/l IBR fitohormonai ir 50 μ M MeJA. Vaistinė levanda didžiausią pigmentų kiekį sukaupė *in vitro* sąlygomis MS terpėje (chlorofilo *a* – $12,96 \pm 0,52$ mg/100g, chlorofilo *b* – $15,88 \pm 0,21$ mg/100g ir karotinoidų – $4,54 \pm 0,27$ mg/100g). Didesnio kiekio pigmentų kaliaus kultūrose vaistinė levanda nesukaupė.

3.3 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

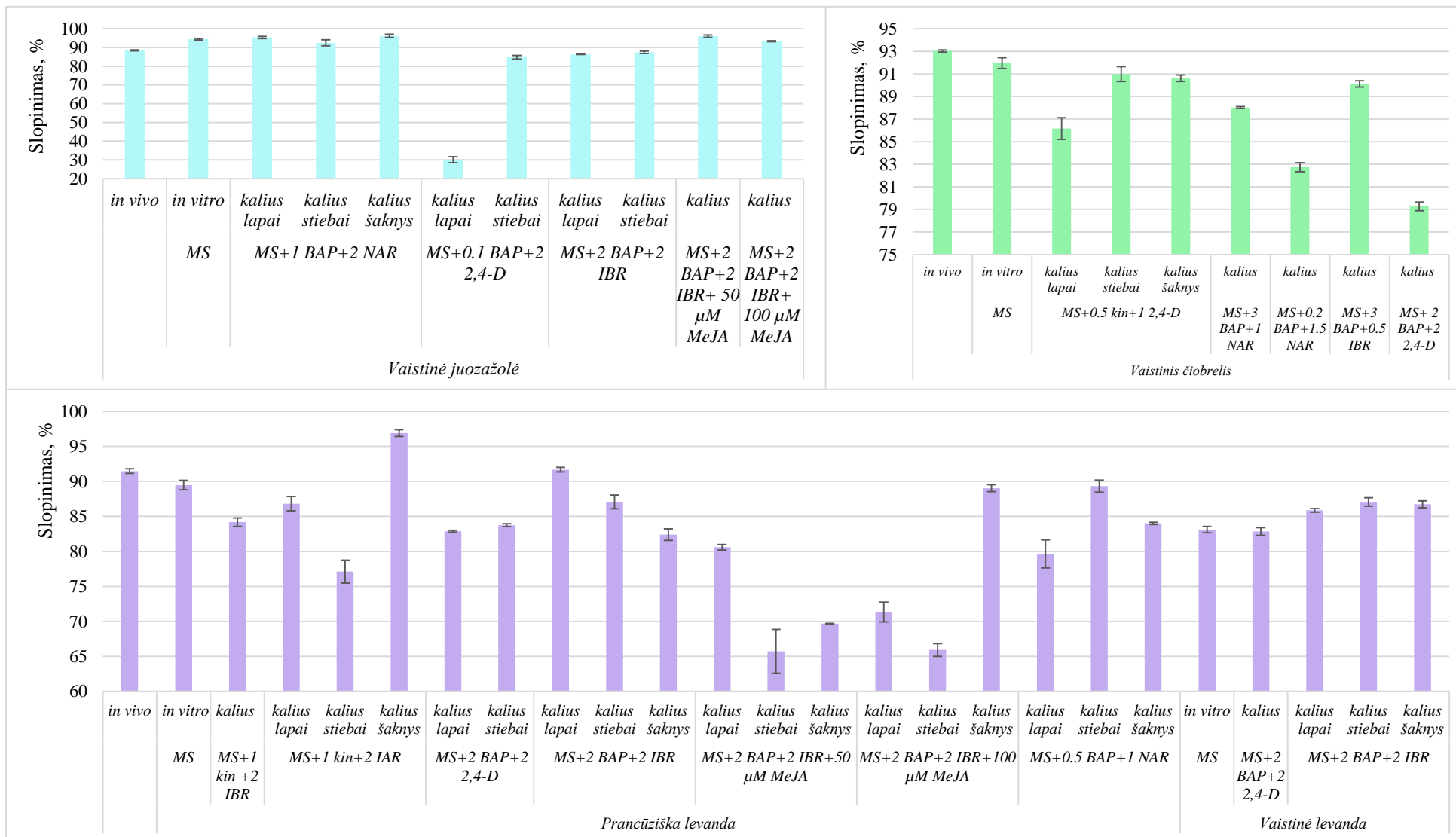
3.3.1 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu

Darbo metu buvo atliktas antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu. Gauti rezultatai išreikšti DPPH radikalo slopinimu (%) 100 mg sauso svorio augalų metanolio ekstraktuose ir pateikti 3.3 paveiksle.

Didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas vaistinės juozažolės kaliaus kultūrose suformuotose iš šaknų ($96,2 \pm 0,84$ %), kai buvo naudoti 1 mg/l BAP ir 2 mg/l NAR. Taip pat didelis aktyvumas nustatytas kaliaus kultūrose ($96,02 \pm 0,6$ %), kai terpėje buvo naudoti 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR fitohormonai ir 50 μ M MeJA. Gautas slopinimas yra didesnis nei *in vivo* sąlygomis augintuose augaluose ($88,48 \pm 0,25$ %).

Didžiausias antioksidacinis aktyvumas vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrose ($90,99 \pm 0,66$ %) nustatytas, kai kultūra buvo suformuota iš stiebų ir terpėje buvo naudoti 0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D. Tačiau slopinimas gautas mažesnis nei *in vitro* ($91,97 \pm 0,48$ %) augaluose ir augaluose augintuose *in vivo* sąlygomis ($93,04 \pm 0,1$ %).

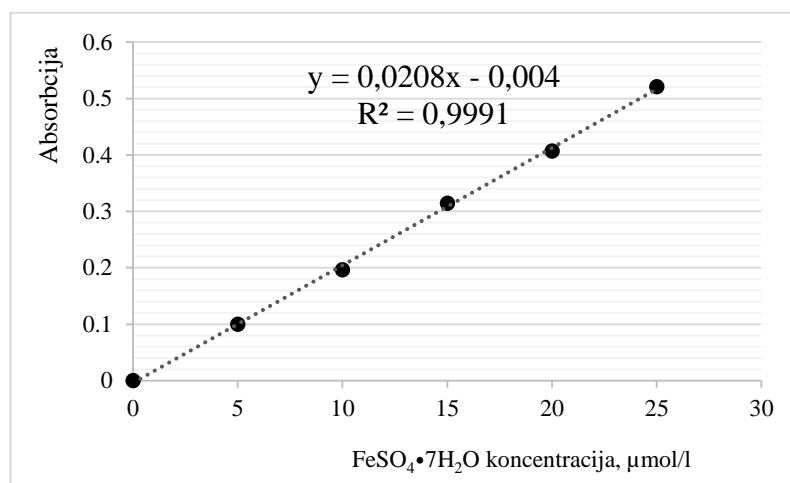
Didžiausias antioksidacinis aktyvumas prancūziškos levandos kaliaus kultūrose ($96,91 \pm 0,49$ %) nustatytas, kai kultūra buvo suformuota iš šaknų ir MS terpėje buvo naudoti 1 mg/l kinetinas ir 2 mg/l IAR. Slopinimas gautas didesnis nei augaluose augintuose *in vivo* sąlygomis ($91,48 \pm 0,33$ %). Vaistinės levandos kaliaus kultūrose didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas, kai kultūra buvo suformuota iš stiebų ir terpėse buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR fitohormonai ($87,07 \pm 0,59$ %). Khateeb ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, kad *L. coronopifolia* kaliaus kultūros suformuotos MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR DPPH slopino – 30 %, *in vitro* (MS terpė su 0,5 mg/l BAP) augalai – 23 % [74].



3.3 pav. DPPH metodu nustatytas antioksidacinis aktyvumas vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis bei suformuotose kaliaus kultūrose

3.3.2 Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas ir FRAP metodu, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną. Siekiant nustatyti aktyvumą, buvo sudaryta $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ skirtingų koncentracijų tirpalų kalibracinė kreivė, ji pateikta 3.4 paveiksle.

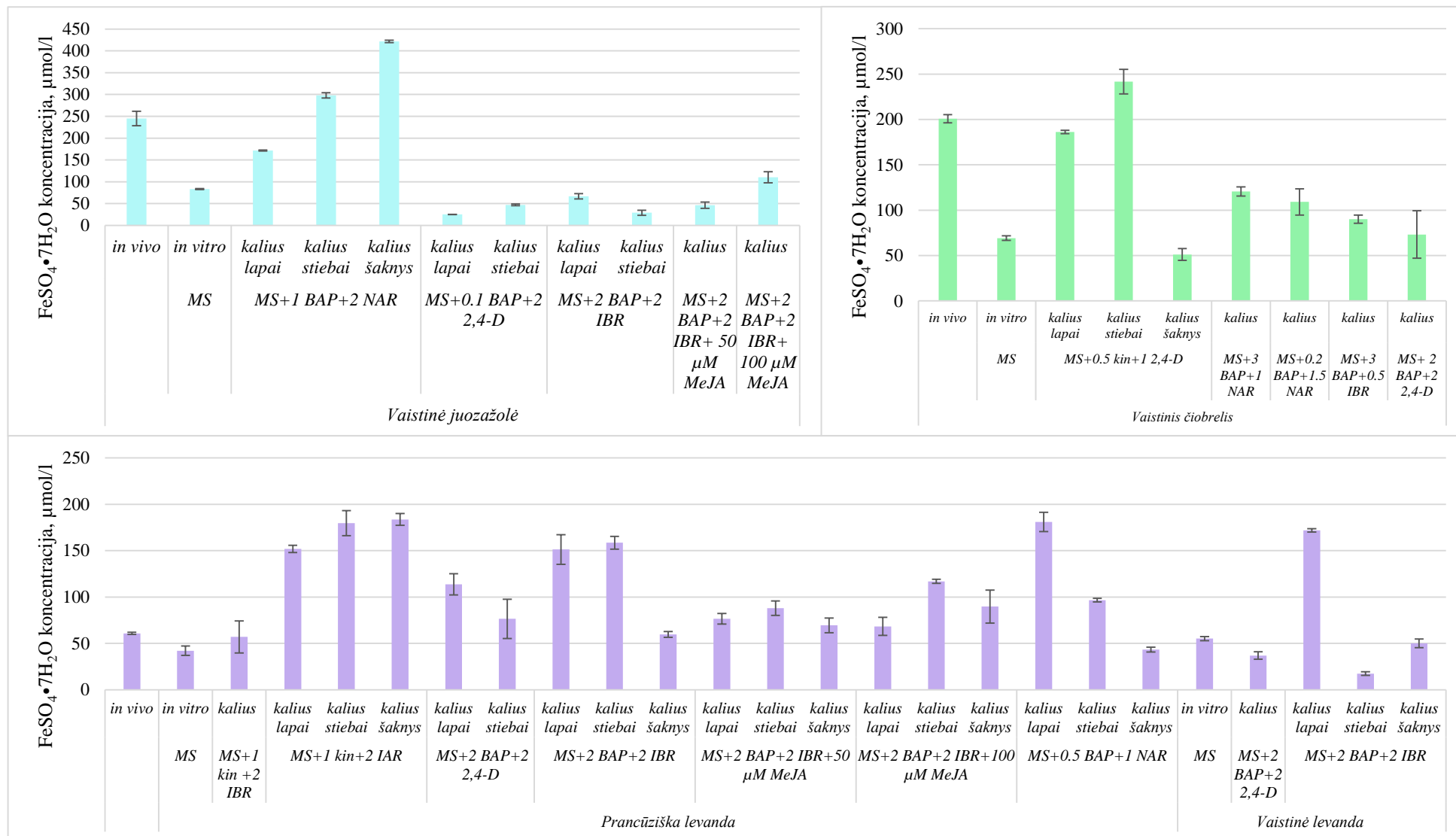


3.4 pav. $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ kalibracinė kreivė naudota antioksidaciniam aktyvumui nustatyti

Naudojant FRAP metodą (žr. 3.5 pav.) didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas vaistinės juozažolės kaliaus kultūrose gautose iš šaknų – $421,47 \pm 2,74 \mu\text{mol/l}$ ir stiebų – $298,08 \pm 6,01 \mu\text{mol/l}$, kai terpėje buvo naudoti 1 mg/l BAP ir 2 mg/l NAR fitohormonai. Aktyvumas nustatytas didesnis nei augaluose *in vivo* ($245,19 \pm 16,65 \mu\text{mol/l}$).

Paprastojo čiobrelio augaluose didžiausias aktyvumas nustatytas kaliaus kultūrose iš stiebų – $241,67 \pm 13,46 \mu\text{mol/l}$, kai terpėje buvo naudoti 0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D fitohormonai. Aktyvumas nustatytas didesnis nei augaluose *in vivo* ($113,22 \pm 4,58 \mu\text{mol/l}$).

Prancūziškos levandos augaluose didžiausias aktyvumas nustatytas kaliaus kultūrose iš šaknų – $183,65 \pm 6,38 \mu\text{mol/l}$, kai terpėje buvo naudoti 1 mg/l kinetinas ir 2 mg/l IAR fitohormonai. Taip pat didelis aktyvumas gautas ir kaliaus kultūrose suformuotose iš lapų ($151,92 \pm 3,89 \mu\text{mol/l}$) ir stiebų ($179,57 \pm 13,46 \mu\text{mol/l}$). Naudojant kitus fitohormonus taip pat didelis aktyvumas gautas su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR kaliaus kultūrose suformuotose iš lapų ($151,28 \pm 15,96 \mu\text{mol/l}$) ir stiebų ($158,49 \pm 6,8 \mu\text{mol/l}$), naudojant 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR, iš lapų ($181,01 \pm 10,41 \mu\text{mol/l}$). Vaistinės levandos kaliaus kultūrose didžiausias aktyvumas nustatytas iš lapų suformuotose kultūrose ($171,88 \pm 1,8 \mu\text{mol/l}$), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR. Šiose kaliaus kultūrose aktyvumas nustatytas didesnis nei augaluose *in vivo* ($60,77 \pm 1,11 \mu\text{mol/l}$).



3.5 pav. Antioksidacinis aktyvumas nustatymas FRAP metodu vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis bei suformuotose kaliaus kultūrose

3.3.3 Redukcinių savybių įvertinimas

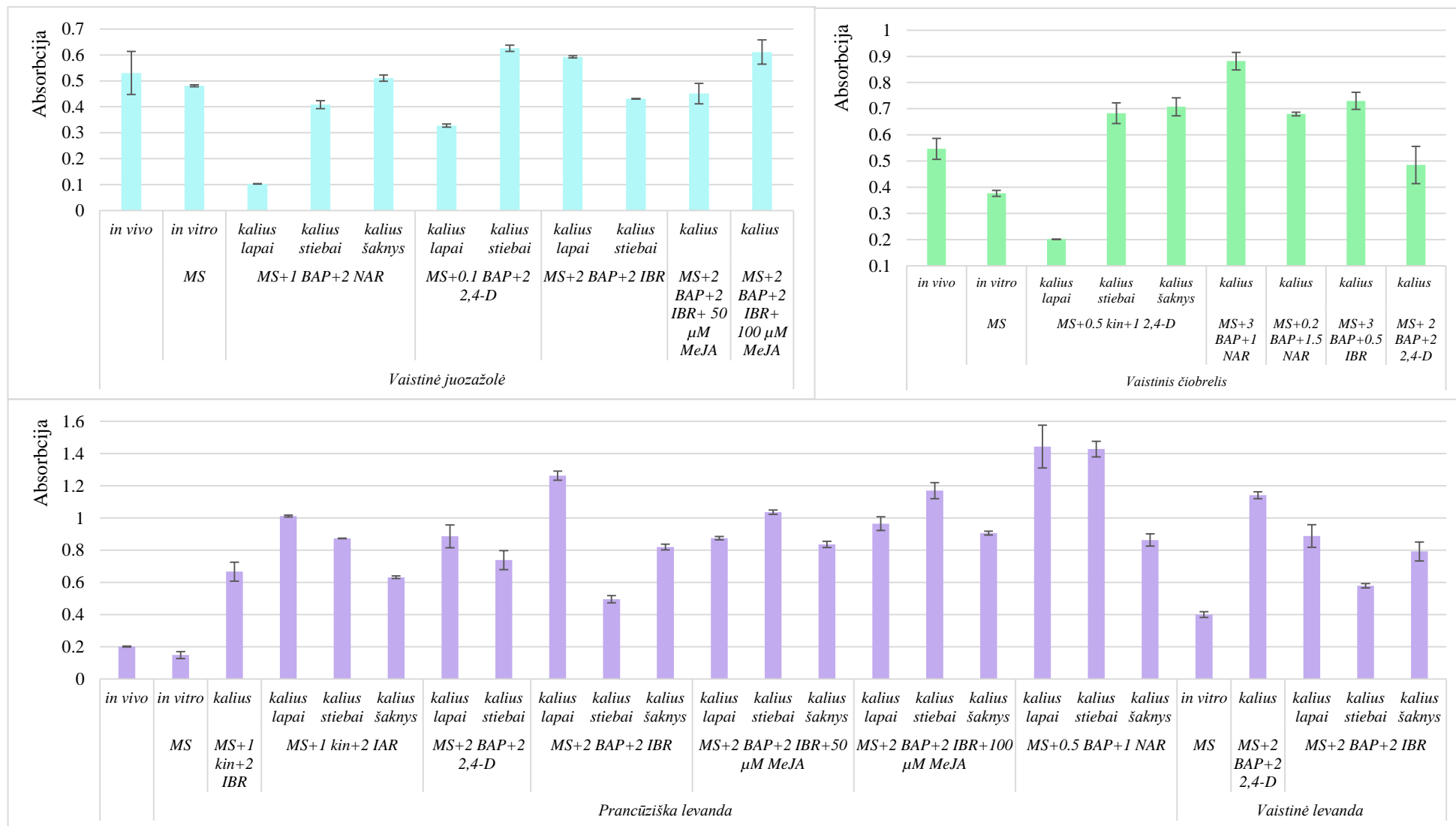
Antioksidacinėms savybėms nustatyti buvo naudotas redukcinių savybių nustatymas, kai augalinės žaliavos buvo paimta 0,00125 g sauso svorio (žr. 3.6 pav.).

Didesnis redukcinis aktyvumas vaistinės juozažolės augaluose nei *in vivo* ($0,531 \pm 0,08$ Abs) augaluose nustatytas kaliaus kultūrose iš stiebų – $0,625 \pm 0,01$ Abs, kai terpėse buvo naudoti 0,1 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D ir iš lapų – $0,593 \pm 0,004$ Abs, kai naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR, taip pat ir kai šioje terpėje dar buvo naudotas 100 μ M MeJA – $0,611 \pm 0,046$ Abs.

Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrose ($0,882 \pm 0,033$ Abs) didžiausias antioksidacinis aktyvumas nustatytas naudojant 3 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR. Nustatytas kiekis didesnis nei *in vivo* augaluose ($0,546 \pm 0,04$ Abs).

Didžiausios redukcinės savybės prancūziškos levandos kaliaus kultūrose nustatytos naudojant 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR iš lapų ($1,443 \pm 1,33$ Abs) ir iš stiebų ($1,428 \pm 0,048$ Abs). Vaistinės levandos kaliaus kultūrose didžiausios redukcinės savybės nustatytos ($1,14 \pm 0,02$ Abs), kai MS terpėje buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D. Tai didesnis kiekis nei *in vivo* augaluose ($0,202 \pm 0,002$ Abs).

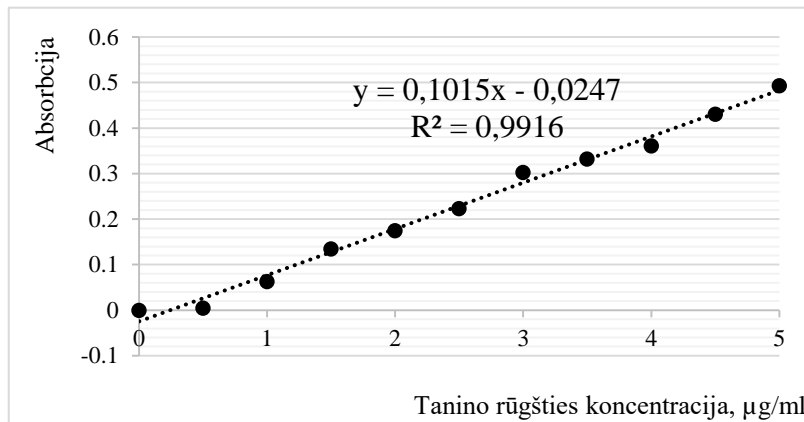
Palyginus visus tris antioksidacinio aktyvumo metodus nustatyta, kad visuose trijuose metoduose didelį antioksidacinį aktyvumą parodė vaistinės juozažolės kaliaus kultūros suformuotos, naudojant 1 mg/l BAP ir 2 mg/l NAR, iš šaknų (94,5 % DPPH metodu, 421,47 μ mol/l FRAP metodu ir 0,511 Abs redukcinių savybių metodu). Vaistinio čiobrelio kaliaus kultūros, kai buvo naudoti 0,5 mg/l kinetinas, 1 mg/l 2,4-D iš stiebų (90,9 % DPPH metodu, 241,67 μ mol/l FRAP metodu ir 0,683 Abs redukcinių savybių metodu). Prancūziškos levandos kaliaus kultūros, kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR iš lapų (91,67 % DPPH metodu, 151,28 μ mol/l FRAP metodu ir 1,263 Abs redukcinių savybių metodu).



3.6 pav. Redukcinės savybės vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis bei suformuotose kaliaus kultūrose

3.4 Fenolinių junginių kiekio įvertinimas

Darbo metu buvo nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis Folino – Kiokalto metodu. Kiekiui nustatyti buvo pagaminti skirtingų koncentracijų tanino rūgšties tirpalai, sudaryta kalibracinė kreivė, pagal kurią buvo apskaičiuotas fenolinių junginių kiekis. Kalibracinė kreivė pateikta 3.7 paveiksle. Pasinaudojus kalibracine kreive buvo apskaičiuotas bendras fenolinių junginių kiekis augalų ekstraktuose, rezultatai pateikti 3.8 paveiksle.



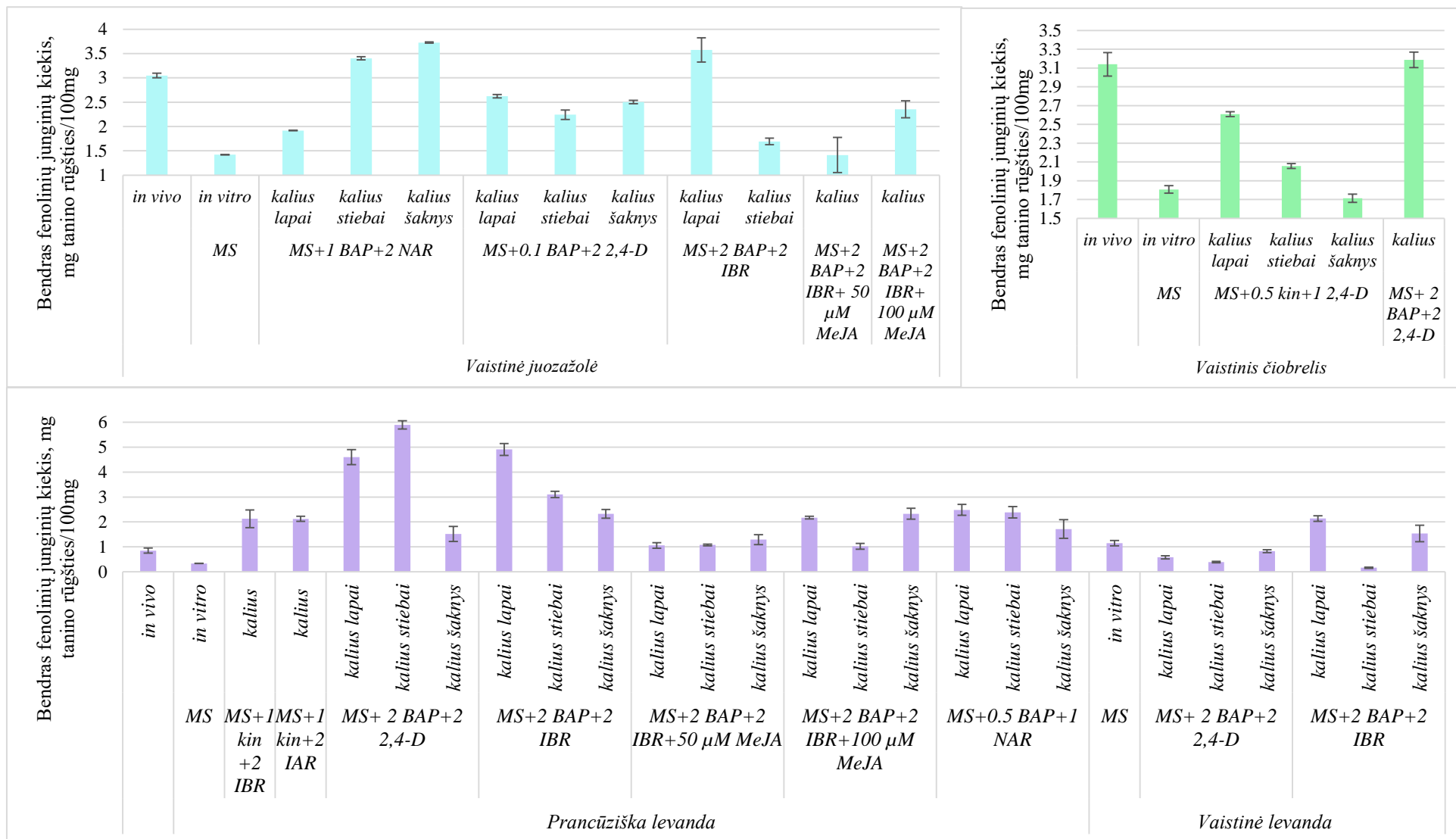
3.7 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

Didžiausias fenolinių junginių kiekis vaistinės juozažolės augaluose nustatytas kaliaus kultūrose iš šaknų ($3,73 \pm 0,01$ mg/100 mg), kai buvo naudoti 1 mg/l BAP ir 2 mg/l NAR, ir iš lapų ($3,56 \pm 0,25$ mg/100 mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR. Tai didesnis kiekis nei *in vivo* augaluose ($3,05 \pm 0,05$ mg/100 mg).

Didžiausias fenolinių junginių kiekis vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrose ($3,18 \pm 0,08$ mg/100 mg) nustatytas, kai naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D, tačiau *in vivo* augaluose nustatytas panašus kiekis ($3,14 \pm 0,12$ mg/100 mg).

Didžiausias fenolinių junginių kiekis prancūziškos levandos kaliaus kultūrose nustatytas iš stiebų ($5,89 \pm 0,17$ mg/100 mg), kai naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D, taip pat didelį kiekį sukaupe kaliaus kultūros iš lapų ($4,91 \pm 0,24$ mg/100 mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR. Šie kiekiai yra didesni nei augalų augintų *in vivo* ($0,85 \pm 0,1$ mg/100 mg) sąlygomis. Vaistinė levandos kaliaus kultūros sukaupe mažesnę kiekį fenolinių junginių nei prancūziškos levandos, kiekiai svyruoja nuo 0,16 iki 2,14 mg/100 mg. Khateeb ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, kad *L. coronopifolia* kaliaus kultūros suformuotos MS terpėse su 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR fenolinių junginių sukaupe – 0,04 mg/100mg, *in vitro* augalai (MS terpė su 0,5 mg/l BAP) – 0,21 mg/100 mg [34].

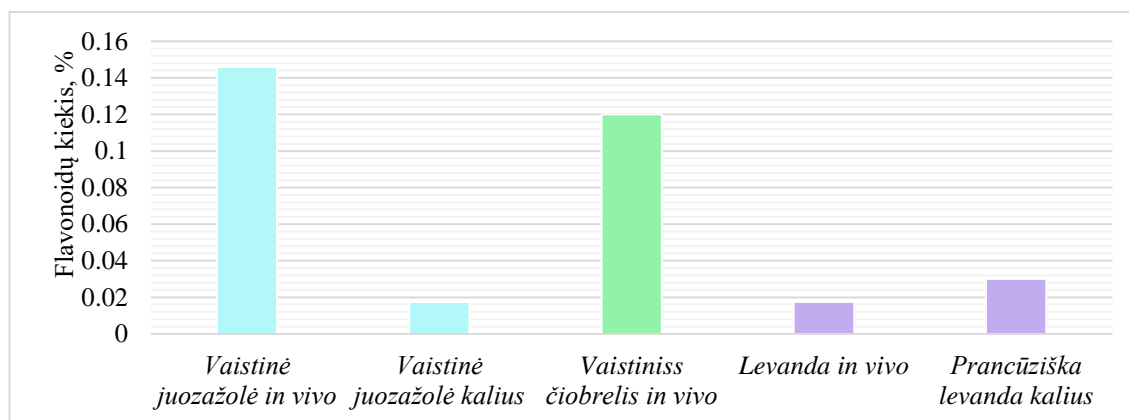
Vertinant visų augalų rezultatus nustatyta, kad didžiausią kiekį fenolinių junginių sukaupia prancūziškos levandos kaliaus kultūros. Palankiausia terpė, siekiant sukaupti didžiausius fenolinių junginių kiekius, Notrelinių šeimos augalų kaliaus kultūroms, yra MS su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D fitohormonais.



3.8 pav. Bendras fenolinių junginių ir taninų kiekis vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* ir *in vitro* sąlygomis bei suformuotose kaliaus kultūrose

3.5 Flavonoidų kiekio įvertinimas

Darbo metu nustatytas flavonoidų kiekis vaistinės juozažolės, paprastojo čiobrelio ir levandos augaluose, rezultatai pateikti 3.9 paveiksle. Didžiausias kiekis buvo gautas vaistinės juozažolės augaluose užaugintuose *in vivo* sąlygomis – 0,146 %.



3.9 pav. Flavonoidų kiekis vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose

3.6 Fermentinio antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

3.6.1 Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Darbo metu buvo nustatytas fermento superoksido dismutazės aktyvumas ir gauti rezultatai pateikti 3.10 pav. Nustatyta, kad vaistinės juozažolės augalai didžiausią fermentų kiekį sukaupia kaliaus kultūrose iš stiebų ($19,25 \pm 0,14$ vnt/mg), kai naudojami 2 mg/l BAP ir 2mg/l IBR fitohormonai. Tai žymiai didesnis kiekis nei augaluose *in vivo* ($7,05 \pm 0,09$ vnt/mg).

Vaistinis čiobrelis didžiausią kiekį taip pat sukaupė kaliaus kultūrose suformuotose iš stiebų ($10,95 \pm 0,24$ vnt/mg), kai buvo naudoti 0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D fitohormonai. Tai didesnis kiekis nei augaluose *in vivo* ($3,76 \pm 0,06$ vnt/mg).

Prancūziškos levandos augalai didžiausią kiekį sukaupė kaliaus kultūrose iš lapų ($16,8 \pm 0,21$ vnt/mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D, taip pat didelį kiekį sukaupė irgi kaliaus kultūros iš lapų ($15,17 \pm 1,39$ vnt/mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2mg/l IBR. Vaistinė levanda didžiausia kiekį sukaupė kaliaus kultūrose iš lapų ($15,79 \pm 1,89$ vnt/mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2mg/l IBR fitohormonai. Tai didesnis kiekis nei augaluose *in vivo* ($2,19 \pm 0,2$ vnt/mg).

Pagal gautus rezultatus matyti, kad geriausią Notrelinių šeimos augalų kaliaus kultūras formuoti naudojant MS terpę su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR fitohormonais siekiant, kad augalai sukaupytų didelį kiekį SOD.

3.6.2 Katalazės aktyvumo įvertinimas

Taip pat darbo metu buvo nustatytas ir katalazės aktyvumas tiriamuosiuose augaluose, kurio rezultatai pateikti 3.11 pav. Nustatyta, kad vaistinės juozažolės augalai didžiausią katalazės kiekį sukaupė

kaliaus kultūrose iš lapų ($3788,6 \pm 25,1$ vnt/mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2mg/l IBR. Tai didesnis kiekis nei augaluose *in vivo* ($490,45 \pm 24,03$ vnt/mg).

Vaistinis čiobrelis kaliaus kultūrose ($464,01 \pm 46,38$ vnt/mg) didesnio kiekio nei *in vivo* ($511,58 \pm 33,3$ vnt/mg) augaluose katalazės nesukaupe.

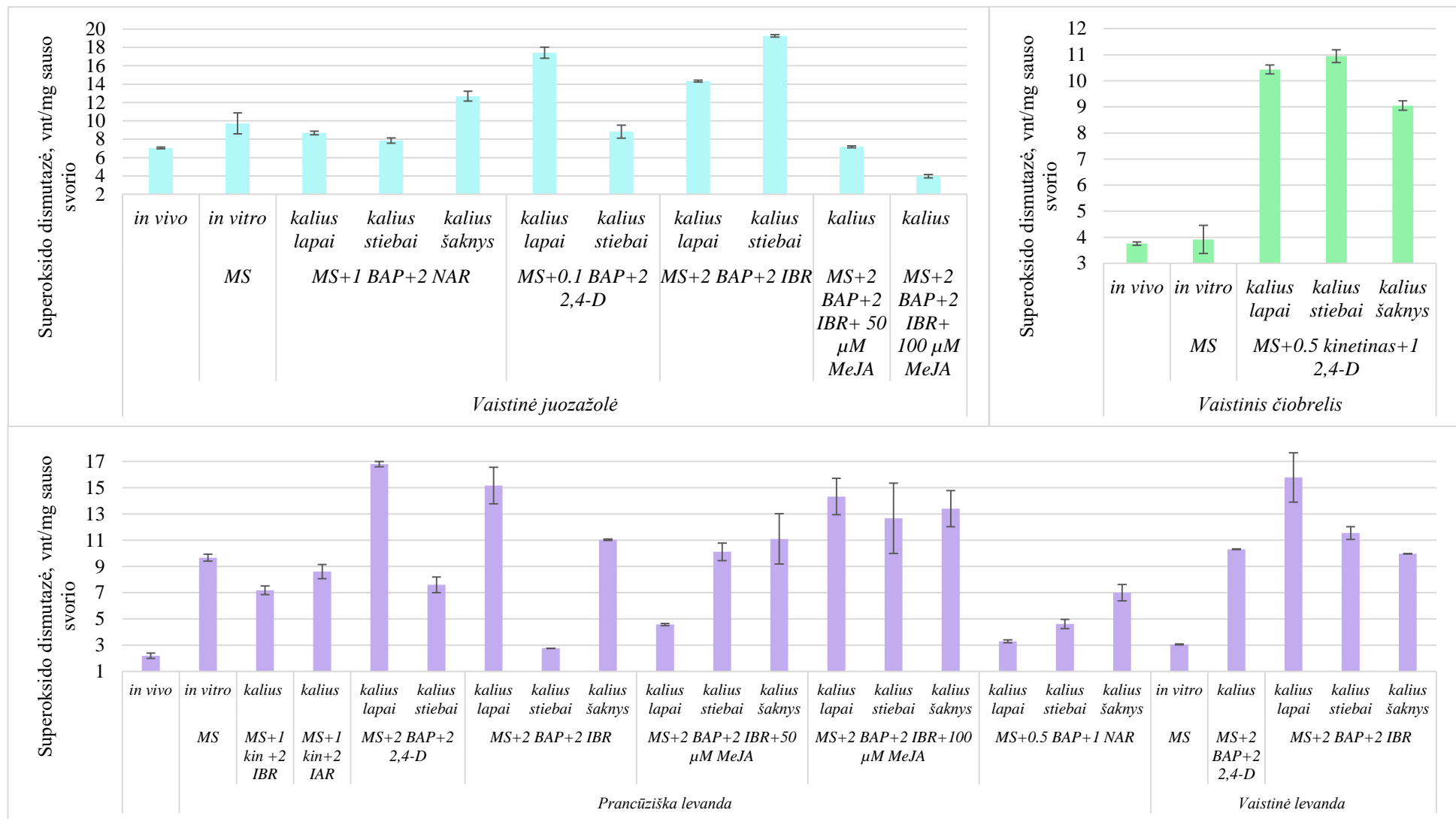
Prancūziškos levandos didžiausią katalazės kiekį sukaupe kaliaus kultūrose iš lapų ($4352,5 \pm 516,36$ vnt/mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 100 μ M MeJA. Vaistinė levanda didžiausią kiekį sukaupe kaliaus kultūrose iš šaknų ($3783,41 \pm 60,92$ vnt/mg), kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR. Kaliaus kultūrose katalazės aktyvumas nustatytas didesnis nei *in vivo* augaluose ($528,92 \pm 66,4$ vnt/mg).

3.6.3 Askorbatperoksidazės aktyvumo įvertinimas

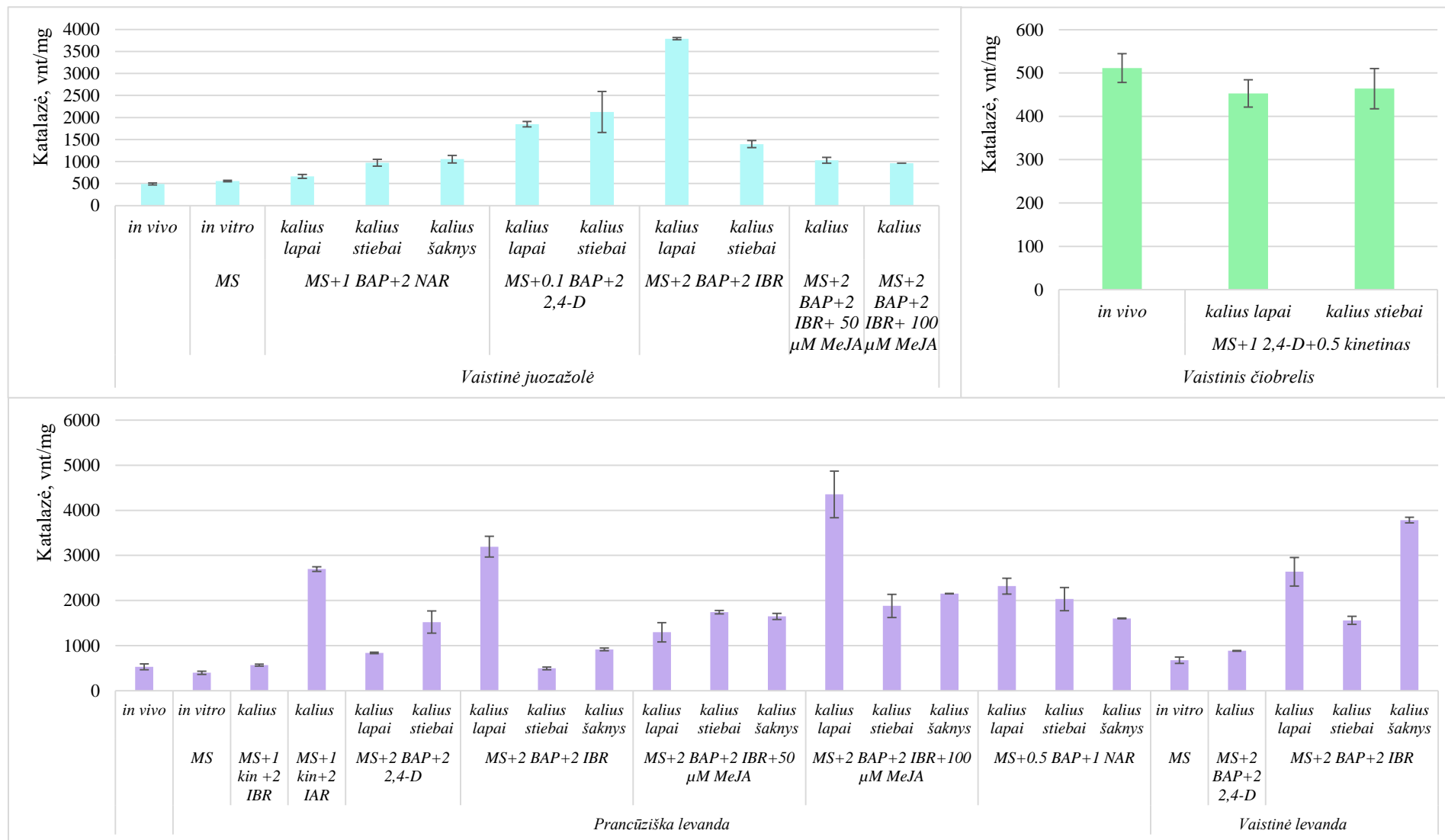
Tyrimo metu buvo nustatytas askorbatperoksidazės aktyvumas mėginiuose (žr. 3.12 pav.). Didžiausias aktyvumas nustatytas vaistinės juozažolės kaliaus kultūrose ($56,43 \pm 0,58$ mmol/mg), suformuotose naudojant 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 50 μ M MeJA. Gautas didesnis aktyvumas nei *in vivo* augaluose ($19,9 \pm 0,93$ mmol/mg).

Vaistinio čiobrelio augaluose didžiausias aktyvumas nustatytas kaliaus kultūrose iš lapų ($29,79 \pm 1,38$ mmol/mg), kai buvo naudoti 0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D fitohormonai. Gautas kiekis didesnis, nei augaluose *in vivo* ($16,79 \pm 0,88$ mmol/mg).

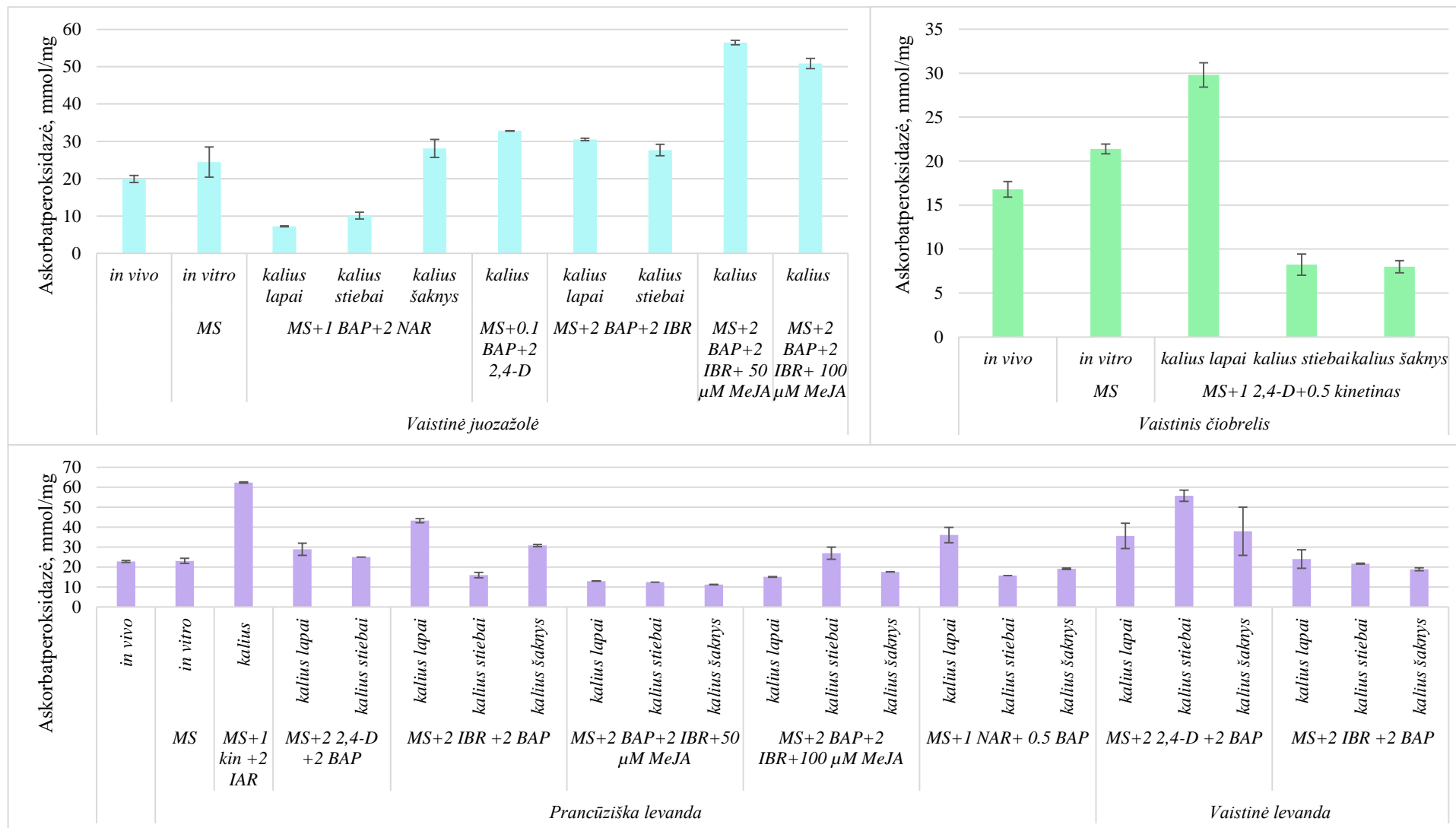
Prancūziškos levandos augaluose didžiausiu askorbatperoksidazės aktyvumu pasižymi kaliaus kultūros ($62,32 \pm 0,3$ mmol/mg), kurios suformuotos naudojant 1 mg/l kinetiną ir 2 mg/l IAR. Vaistinės levandos didžiausiu askorbatperoksidazės aktyvumu pasižymėjo kaliaus kultūros iš stiebų ($55,7 \pm 2,84$ mmol/mg), suformuotos naudojant 2 mg/l 2,4-D ir 2 mg/l BAP. Aktyvumas gautas didesnis nei augaluose *in vivo* ($22,75 \pm 0,48$ mmol/mg).



3.10 Fermento superoksido dismutazės aktyvumas vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose



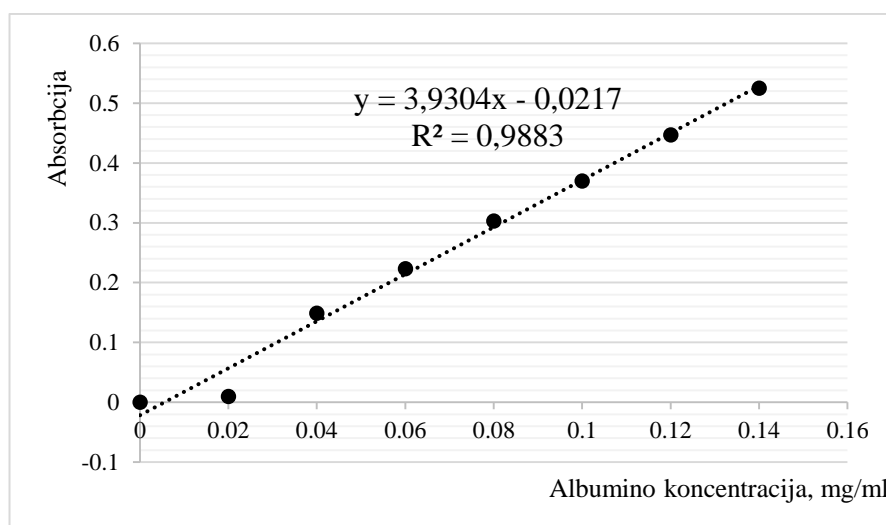
3.11 Fermento katalazės aktyvumas vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose



3.12 Fermento askorbatperoksidazės aktyvumas vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kalium kultūrose

3.7 Baltymų kiekio įvertinimas

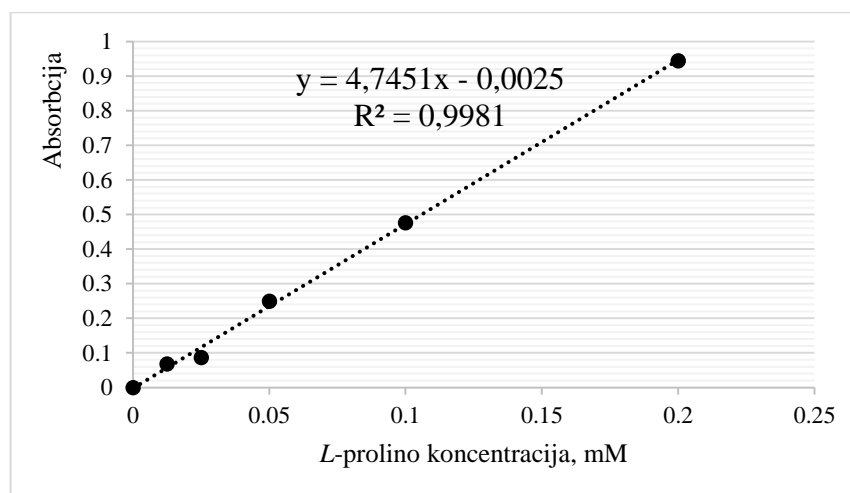
Prieš nustatant fermentų aktyvumą augalinėje žaliavoje, nustatytas baltymų kiekis. Baltymų kiekis nustatytas *Bradfordo* metodu. 3.13 paveiksle pateikta albumino kalibracinė kreivė, pagal kurią buvo nustatytas baltymų kiekis augalinėje žaliavoje.



3.13 Albumino kalibracinė kreivė

3.8 L-prolino kiekio įvertinimas

Siekiant nustatyti aminorūgšties *L*-prolino kiekį augaluose sudaryta *L*-prolino kalibracinė kreivė (žr. 3.14 pav.). Rezultatai pateikti 3.15 pav.



3.14 pav. *L*-prolino kalibracinė kreivė

Didžiausias *L*-prolino kiekis vaistinės juozažolės kaliaus kultūrose nustatytas, kai buvo naudoti MS terpėje fitohormonai 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR, 50 μ M MeJA ($17,1 \pm 2,53$ mM/g) ir 100 μ M MeJA ($15,26 \pm 1,2$ mM/g). Nustatytas didesnis kiekis nei *in vivo* ($13,4 \pm 0,15$ mM/g) augaluose.

Didžiausias *L*-prolino kiekis nustatytas vaistinio čiobrelio *in vivo* ($13,6 \pm 0,73$ mM/g) augaluose, kaliaus kultūros didesnio kiekio nesukaupė.

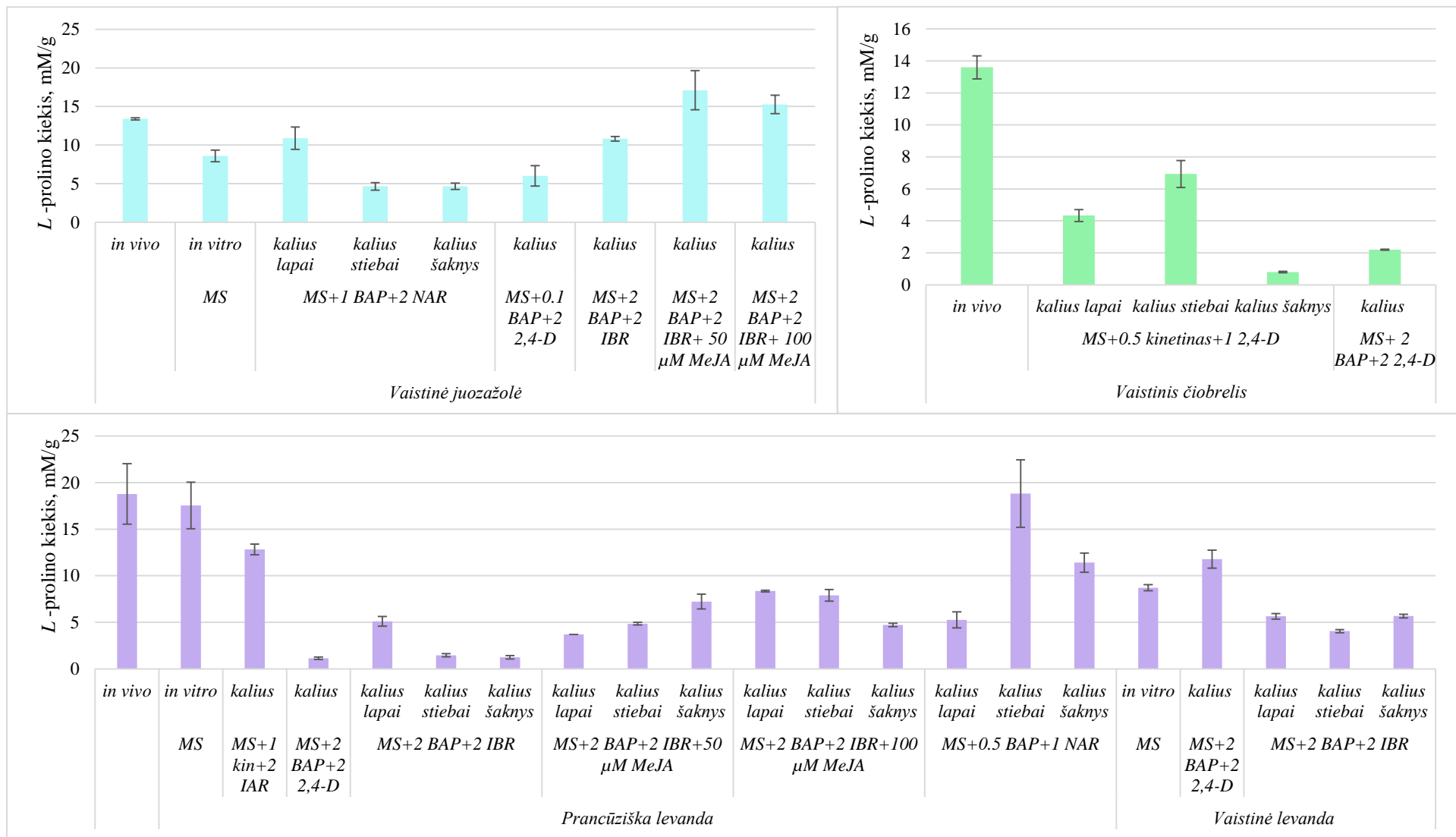
Levandos didesnę *L*-prolino kiekį nei *in vivo* ($18,77 \pm 3,24$ mM/g) augaluose sukaupė prancūziškos levandos kaliaus kultūrose, kai buvo naudoti 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR, iš stiebų ($18,83 \pm 3,6$ mM/g).

3.9 Malondialdehido koncentracijos įvertinimas

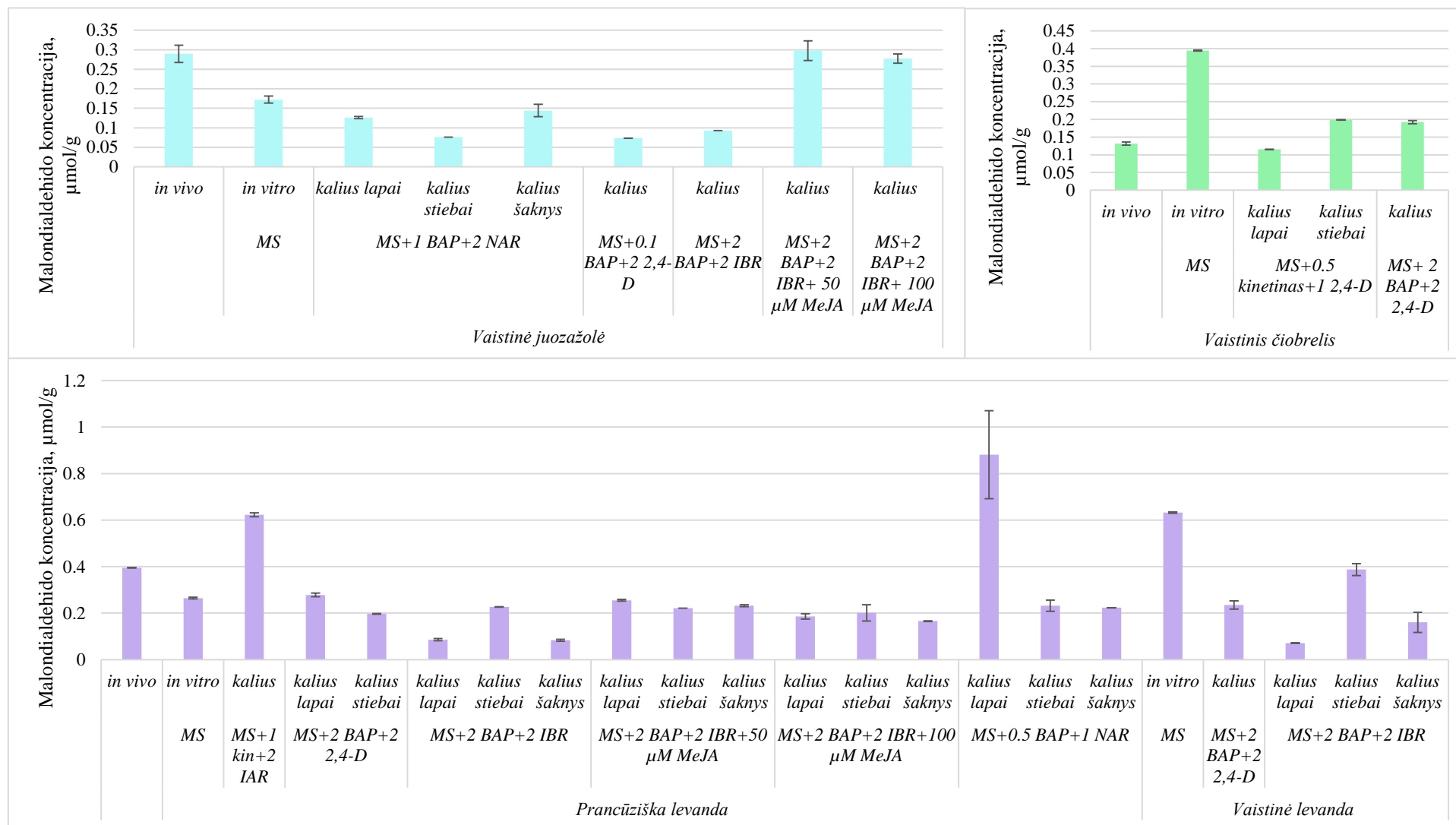
Šio tyrimo metu buvo nustatyta malondialdehido koncentracija, rezultatai pateikti 3.16 pav. Didžiausias malondialdehido kiekis vaistinės juozažolės augaluose buvo nustatytas *in vivo* ($0,29 \pm 0,02$ μmol/g) sąlygomis augintuose augaluose ir kaliaus kultūrose, kai buvo naudoti fitohormonai 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 50 μmol MeJA elicitorius ($0,29 \pm 0,03$ μmol/g), ir 100 μmol MeJA elicitorius ($0,27 \pm 0,01$ μmol/g).

Didžiausia malondialdehido koncentracija vaistinio čiobrelio augaluose nustatyta *in vitro* ($0,39 \pm 0,001$ μmol/g).

Didžiausia malondialdehido koncentracija prancūziškos levandos augaluose nustatyta kaliaus kultūrose, kai buvo naudoti 1 mg/l kinetinas ir 2 mg/l IAR ($0,62 \pm 0,008$ μmol/g), ir kai buvo naudoti 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR, iš lapų ($0,88 \pm 0,19$ μmol/g). Didžiausias malondialdehido kiekis vaistinės levandos augaluose nustatytas *in vitro* ($0,63 \pm 0,002$ μmol/g).



3.15 L-prolino kiekis vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose

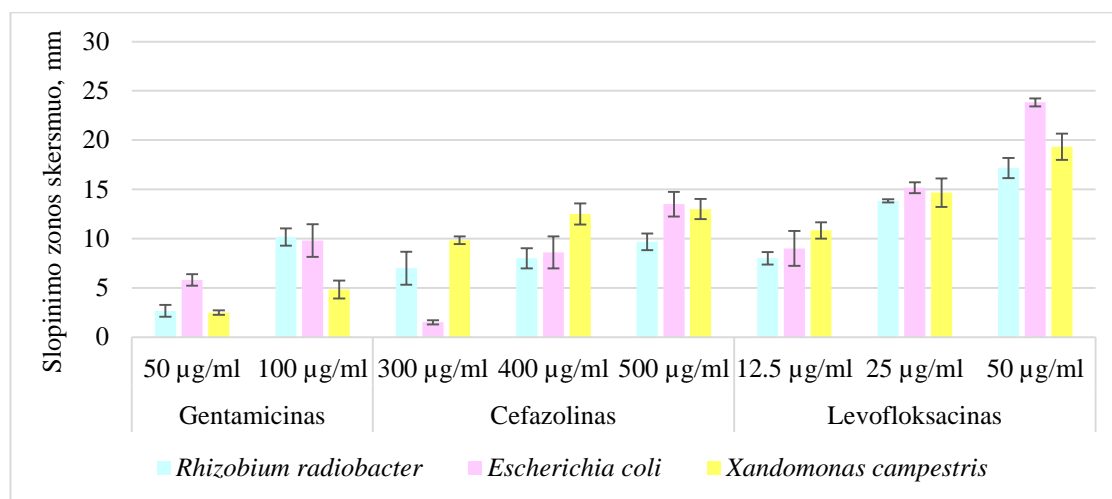


3.16 Malondialdehido koncentracija vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kalium kultūrose

3.10 Antibakterinio aktyvumo įvertinimas

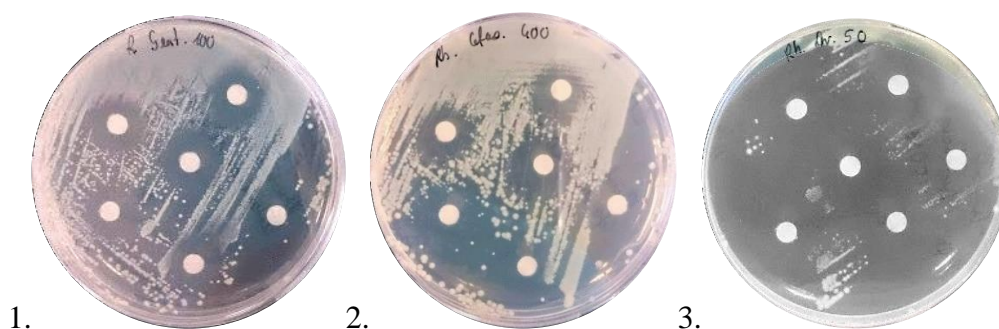
3.10.1 Prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris*

Antibakterinis aktyvumas antibiotikų ir tiriamųjų augalų buvo įvertinimas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris* bakterijas. Skirtingų koncentracijų antibiotikų gentamicino, cefazolino ir levofloksacino aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris* bakterijas pateiktas 3.17 pav.



3.17 pav. Antibiotikų gentamicino, cefazolino ir levofloksacino skirtingų koncentracijų aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris*

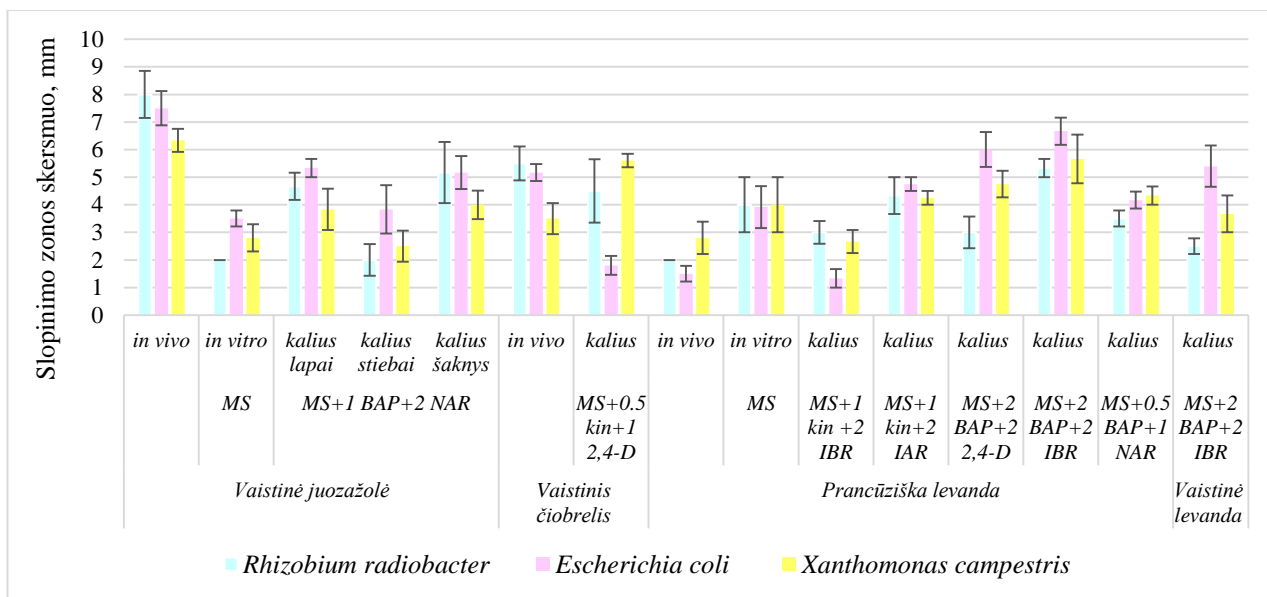
Visi antibiotikai parodė aktyvumą prieš tiriamąsias bakterijas. Didžiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo levofloksacinas (25 µg/ml koncentracijos levofloksacinas prieš *Rhizobium radiobacter* – $13,8 \pm 0,17$ mm; prieš *Escherichia coli* – $15,17 \pm 0,54$ mm; prieš *Xanthomonas campestris* – $14,67 \pm 1,45$ mm). Prieš *Rhizobium radiobacter* bakterijas aktyvumas: gentamicino (100 µg/ml) – $10,16 \pm 0,87$ mm; cefazolino (400 µg/ml) – $8 \pm 1,03$ mm ir levofloksacino (50 µg/ml) – $17,17 \pm 1,01$ mm (žr. 3.18 pav.).



3.18 pav. Antibiotikų: 1 – gentamicino (100 µg/ml); 2 – cefazolino (400 µg/ml); 3 – levofloksacino (50 µg/ml) aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*

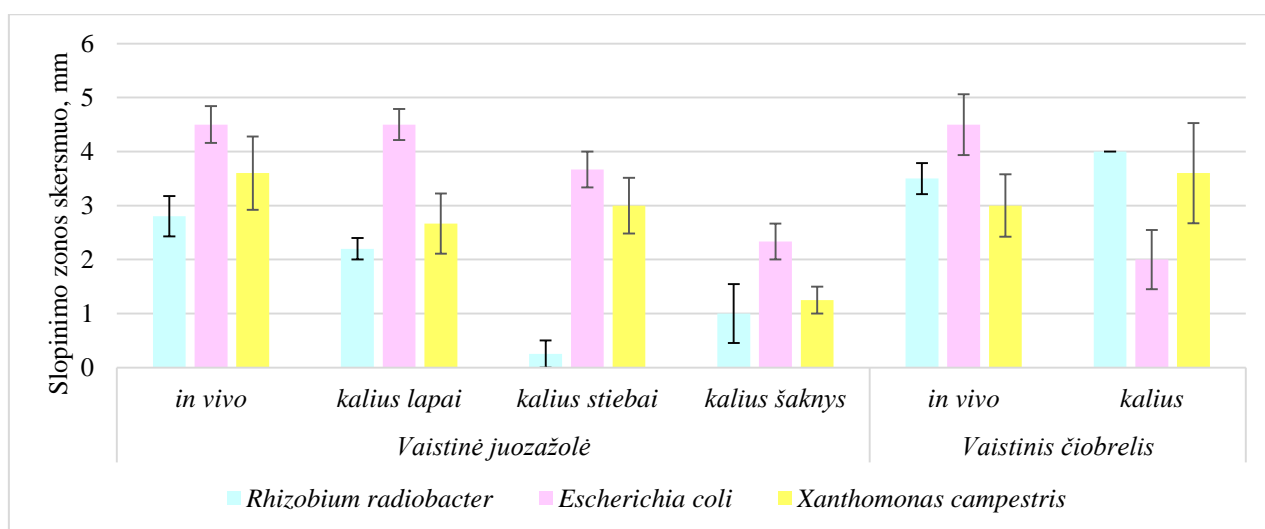
Taip pat tyrimas atliktas naudojant 100 mg/ml ir 50 mg/ml tiriamųjų augalų ekstraktų koncentracijas, rezultatai pateikti 3.19 ir 3.20 paveiksluose. Nustatyta, kad didžiausiu antibakteriniu aktyvumu pasižymėjo vaistinės juozažolės augalai auginti *in vivo* sąlygomis (prieš *Rhizobium radiobacter* – $8 \pm 0,86$ mm, *Escherichia coli* – $7,5 \pm 0,62$ mm ir *Xanthomonas campestris* – $6,3 \pm 0,3$ mm). Lyginant

kaliaus kultūras, didžiausią antibakterinį aktyvumą parodė prancūziškos levandos kaliaus kultūros suformuotos MS terpėje, naudojant 2 mg/l BAP ir 2 mg/l IBR (prieš *Rhizobium radiobacter* – $5,3 \pm 0,33$ mm, *Escherichia coli* – $6,67 \pm 0,49$ mm ir *Xanthomonas campestris* – $5,67 \pm 0,88$ mm).

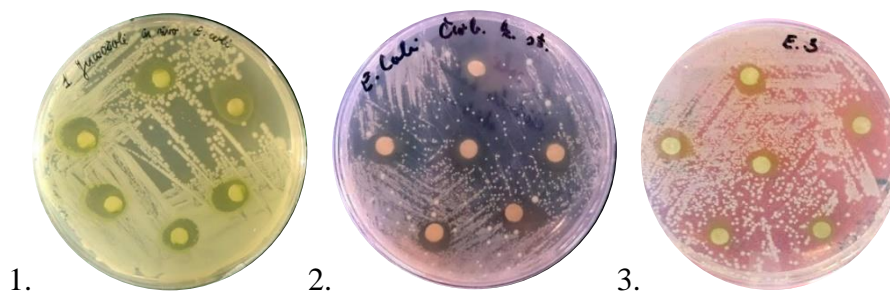


3.19 pav. Vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augalų, užaugintų *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose, antibakterinis aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris*, kai augalų ekstraktų koncentracija 0,1 g/ml

Antibakterinis aktyvumas prieš *Escherichia coli* (žr. 3.21 pav.) vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.) *in vivo* – $7,5 \pm 0,62$ mm; vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) kaliaus kultūrų (MS ir 0,5 mg/l kinetino, 1 mg/l 2,4-D) – $1,8 \pm 0,34$ mm, prancūziškos levandos (*Lavandula stoechas* L.) kaliaus kultūrų (MS ir 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l NAR) – $4,17 \pm 0,31$ mm.



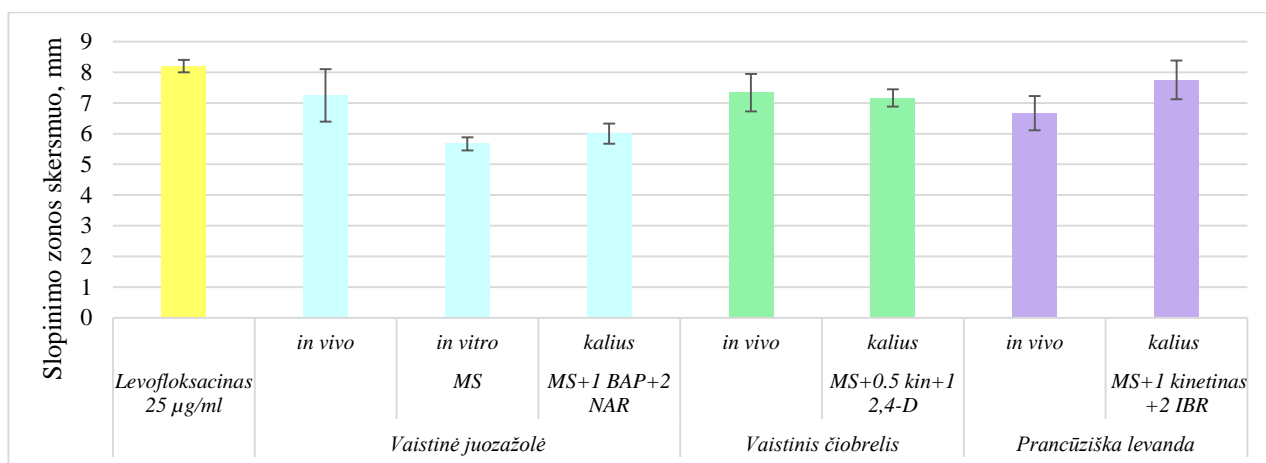
3.20 pav. Vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.) ir paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) augalų, užaugintų *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose antibakterinis aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris*, kai augalų ekstraktų koncentracija 0,05 g/ml



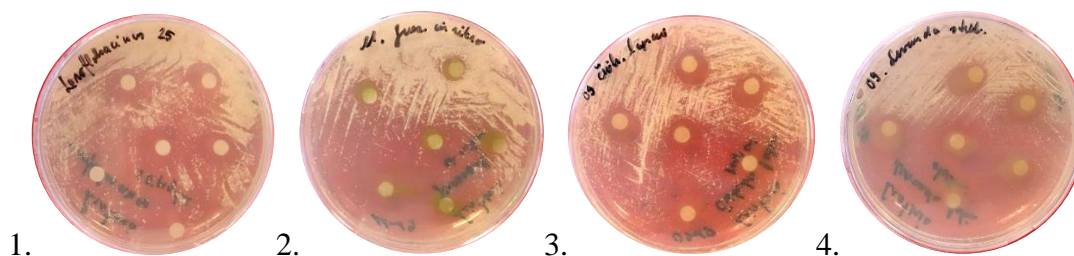
3.21 pav. 1 – *Escherichia coli* bakterijos paveiktos vaistinės juozažolės ekstraktu *in vivo*; 2 – *Escherichia coli* bakterijos paveiktos vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų ekstraktu, 3 – *Escherichia coli* bakterijos paveiktos prancūziškos levandos kaliaus kultūrų ekstraktų

3.10.2 Prieš *Listeria monocytogenes*

Antibakterinis aktyvumas buvo nustatytas prieš *Listeria monocytogenes* (žr. 3.22 pav. ir 3.23 pav.). Didžiausią aktyvumą parodė prancūziškos levandos kaliaus kultūros suformuotos naudojant 1 mg/l kinetiną ir 2 mg/l IBR – $7,75 \pm 0,63$ mm, palyginimui levofloksacinas (25 μ g/ml) – $8,2 \pm 0,2$ mm.



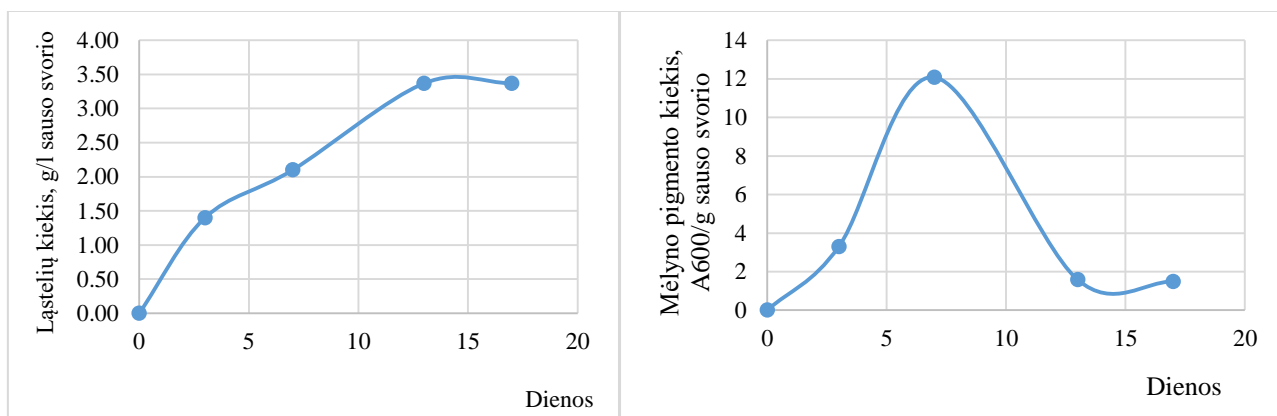
3.22 pav. Vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir prancūziškos levandos (*Lavandula stoechas* L.) augalų, užaugintų *in vivo* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose, antibakterinis aktyvumas prieš *Listeria monocytogenes*, kai augalų ekstraktų koncentracija 0,1 g/ml



3.23 pav. *Listeria monocytogenes* bakterijos paveiktos: 1 – 25 μ g/ml levofloksacinu; 2 – vaistinės juozažolės *in vitro* ekstraktu; 3 – vaistinio čiobrelio kaliaus kultūrų ekstraktu; 4 – prancūziškos levandos kaliaus kultūrų ekstraktu

3.11 3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propeno rūgšties (Z,E)-2-(3-4 dihidroksifenil)etenilesterio (mėlyno pigmento) kiekio įvertinimas

Vaistinė levanda buvo auginama skystoje terpėje naudojant 2 mg/l 2,4-D ir 2 mg/l BAP fitohormonus. Ląstelių ir mėlyno pigmento kiekis buvo nustatomas kas 3 dienas, 17 dienų, gauti rezultatai pateikti 3.24 pav. Didžiausias mėlyno pigmento kiekis gautas 7 auginimo dieną – 12,08 A600/g sauso svorio. Kitų tyrėjų tyrimuose aprašoma, kad didžiausias mėlyno pigmento kiekis (3,61 A600/g) sukaupiamas *Lavandula spica* ląstelių kultūrose 6 auginimo dieną MS terpėje su 2,5 mM PO_4^{3-} , 14,1 mM NO_3^- , 1 mM Fe^{2+} , kai inokulianto dydis 10 g/l, sacharozės kiekis – 90 g/l [77]. Šis mėlyno pigmento kiekis yra mažesnis nei pavyko sukaupti šiame tyrime ląstelių kultūrose, naudojant 2 mg/l 2,4-D ir 2 mg/l BAP fitohormonus.



3.24 Skystoje terpėje auginamų levandos (*Lavandula angustifolia* L.) ląstelių ir mėlyno pigmento kiekis kultūrose

4. Rekomendacijų dalis

Atrinktos optimalios terpės augalų kaliaus kultūroms formuoti toliau gali būti naudojamos augalų ląstelių suspensijų kultūrose ir bioreaktoriuose, siekiant išgauti bioaktyviuosius fitocheminius junginius. Prieš atliekant bandomuosius gamybinius tyrimus, rekomenduojame atlikti kaliaus kultūrose esančių junginių kokybinę ir kiekybinę analizę naudojant dujų chromatografiją – masių spektrofotometriją.

Šiame darbe remiantis atliktais tyrimais ir literatūra pateikta principinė aparatūrinė schema timolio gavimui iš čiobrelių (*Thymus vulgaris* L.) (žr. 4.1 pav.). Aparatūrinę schemą sudarančių įrenginių sąrašas su paaiškinimais pateiktas 4.1 lentelėje. Schema apima du etapus: čiobelio ląstelių suspensijos kultūrų auginimą bioreaktoriuje ir antrinio metabolito timolio išskyrimą.

Pirmiausia, MS terpėse su agaru sudauginamos sterilintos čiobrelių (*Thymus vulgaris* L.) sėklos, toliau formuojamos kaliaus kultūros *Petri* lėkštelėse MS agarizuotose terpėse su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D fitohormonais. Suformuotos kaliaus kultūros naudojamos ląstelių suspensijų kultūroms formuoti, kaliaus kultūros perkeliama į 250 ml kolbą (KL – 1), kurioje naudojama MS skysta terpė su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D fitohormonais. Užaugusi biomasė rankiniu būdu perpilama į bioreaktorių (B – 1). Bioreaktorių papildomas MS skysta terpė su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D fitohormonais, terpė laikoma T – 1 talpoje ir sterilinama autokalve (A – 1). Bioreaktoriuje 20 – 23 °C temperatūrai palaikyti naudojamas termostatinis gaubtuvas. Į bioreaktorių oras patenka per filtrą (F – 1) ir oro kompresorių (K – 1).

Užaugusių ląstelių suspensijų kultūros siurbliu (S – 1) patenka į sedimentacinę centrifugą (C – 1), kur yra atskiriamos ląstelės nuo skysčio. Supernatantas patenka į atliekas, o ląstelės siurbliu (S – 2) pagalba per sraigtinį transporterį patenka į juostinį praplovimo transporterį (JPT – 1) ir į džiovyklą (D – 1). Džiovykloje biomasė yra išdžiovinama iki 10 % drėgmės ir toliau juostinio transporterio pagalba (T – 2) patenka į šaldomą malūną (M – 1), kur yra susmulkinama iki mažesnių nei 250 μm dydžio dalelių. Siurblio pagalba (S – 3) 275 g/l biomasė patenka į juostinį transporterį ir į ekstraktorių (E – 1), kur superkritinių skysčių ekstrakcijos metu išskiriami eteriniai aliejai. Čiobrelių eterinis aliejus paprastai gaunamas naudojant distiliavimą garais arba kieta fazė – skystis ekstrakcija. Šie metodai yra paprasti, tačiau turi trūkumų: ilgas ekstrakcijos laikas ir didelis tirpiklio sunaudojimas [38]. Šioje technologinėje schemoje siūlome naudoti superkritinių skysčių ekstrakciją, nes šis metodas neturi pagrindinių tradicinių ekstrakcijos metodų trūkumų. Ekstrakcija vykdoma 15 MPa slėgyje, 40 °C temperatūroje, 4 valandas, CO₂ tekėjimo greitis – 60 – 70 g/min, kosolventas – 10 % metanolis. Superkritinių skysčių ekstrakcija atliekama su įrenginiu, kuris turi 2 l ekstrakcijos talpą (E – 1), dvejus aukšto slėgio pompas, vieną CO₂ (S – 4) ir kitą kosolventui (S – 5), cikloninį separatorių (SE – 1). CO₂ (esantis balione BL – 1) aušinamas su šilumokaičiu (Š – 2), teka per srovės matuoklį (SM – 1), kuris matuoja praeinančio CO₂ kiekį, pumpuojamas aukšto slėgio siurbliu (S – 4) mažesne nei 5 °C temperatūroje 5 MPa slėgyje. Metanolis taip pat pumpuojamas su aukšto slėgio siurbliu (S – 5), per vožtuvą (V – 3) patenka į srauto kelių maišyklę (SKM – 2), kur sumaišomas su CO₂. Mišinys patenka į šilumokaitį (Š – 3), kur pakeliama temperatūra iki 40 °C (CO₂ pasiekia superkritinio skysčio būseną), ir patenka į ekstraktorių (E – 1). Ekstraktoriuje palaikomas 15 MPa slėgis ir 40 °C temperatūra (termostatinio gaubtuvo pagalba). Vožtuvai (V – 2; V – 3) reaguoja ir išlaiko slėgį esant skirtingiems srautams. Eteriniai aliejai iš ekstraktoriaus (E – 1) patenka į cikloninį separatorių (SE – 1), iš jo į garintuvą (G – 1), kur metanolis yra išgarinamas. Komponentų atskyrimui yra

naudojamas tiesioginis (angl. *on – line*) metodas, kai visos superkritinių skysčių ekstrakcijos metu išekstrahuotos medžiagos patenka į chromatografinį prietaisą, naudojant tokį ekstrahavimo metodą nėra reikalingas specialus mėginio paruošimas chromatografijai, taip yra išvengiama klaidų, metodas jautresnis. Ekstraktai patenka į atvirkščių fazių efektyviają skysčių chromatografiją, čia yra atskiriamas timolis. Efektyviosios skysčių chromatografijos kolonėlė – atvirkščių fazių C₁₈, mobili fazė – acetonitrilo ir vandens mišinys (50:50). Timolis liofilizuojamas (L – 1) ir gauti milteliai išpilstomi į stiklinius buteliukus.

Po ekstrahavimo CO₂ ir metanolis atskiriami nuo ekstrakto, surenkami ir vėl naudojami. CO₂ recirkuliuojamas iš separatoriaus per V – 1 vožtuvą, šilumokaityje (Š – 1) atšaldomas ir per kompresorių K – 2, vožtuvą VO – 2 patenka į srauto kelių maišyklė SKM – 1. Metanolis atskiriamas nuo išekstrahuotų junginių išgarinant garintuve G – 1 ir gražinamas į procesą. 5 % metanolio prarandama, prieš pakartotinį panaudojimą metanolis atšaldomas Š – 3 ir patenka į srauto kelių maišyklė SKM – 3. Superkritinių skysčių ekstrakcijos įrenginyje temperatūra ir slėgis yra užtikrinami valdiklio ir indikatorių pagalba (TI – temperatūros indikatorius; PI – slėgio indikatorius).

4.1 lentelė. Principinėje aparatūrinėje schemoje naudojami prietaisai

Prietaiso žymėjimas	Prietaisas
T – 1	MS su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D terpės talpa
A – 1	autoklavas
KL – 1	250 ml kolba
F – 1	oro filtras
K – 1, K – 2	oro kompresorius
B – 1	bioreaktorius
S – 1; S – 2; S – 3; S – 6	išcentriniai siurbliai
C – 1	centrifuga
T – 1; T – 2; T – 3	straigtinis transporteris
JPT – 1	juostinis praplovimo transporteris
D – 1	džiovyklė
M – 1	malūnas
E – 1	ekstraktorius
SE – 1	cikloninis separatorius
S – 4; S – 5	aukšto slėgio siurbliai
Š – 1; Š – 2; Š – 3	vamzdinis šilumokaitis
V – 1; V – 2; V – 3; V – 4	rankinis vožtuvas
VO – 1; VO – 2	vožtuvas
SM – 1	srovės matuoklis
SKM – 1; SKM – 2; SKM – 3	srauto kelių maišyklė
T – 2	10 % metanolio talpa
BL – 1	CO ₂ dujų balionas
PI	slėgio indikatorius
TI	temperatūros indikatorius
G – 1	garintuvas
CH – 1	atvirkščių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos kolonėlė
L – 1	liofilizatorius

Išvados

1. Vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.), vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir levandos (*Lavandula* L.) augaluose, augintuose *in vivo*, *in vitro* sąlygomis ir suformuotose kaliaus kultūrose:

a) didžiausius kiekius chlorofilo *a*, chlorofilo *b* ir karotinoidų sukaupė vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.) ir vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) augalai, auginti *in vitro* sąlygomis. Levandų (*Lavandula* L.) augaluose didžiausią kiekį sukaupė prancūziškos levandos iš lapų suformuotos kaliaus kultūros, augintos MS terpėje su 2 mg/l IBR ir 2 mg/l BAP.

b) didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu DPPH ir FRAP metodais pasižymėjo vaistinės juozažolės iš šaknų suformuotos kaliaus kultūros, augintos MS terpėje su 2 mg/l NAR ir 1 mg/l BAP. Didžiausiomis redukciniėmis savybėmis – kaliaus kultūros iš stiebų, kai terpėje buvo naudoti 0,1 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu DPPH metodu pasižymėjo vaistinio čiobrelio *in vivo* augalai; FRAP metodu – kaliaus kultūros iš stiebų, kai terpėje naudoti 0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D; didžiausios redukcinės savybės – kaliaus kultūrose, kai terpėje naudoti 3 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR. Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu levandų augalai DPPH ir FRAP metodais pasižymėjo prancūziškos levandos kaliaus kultūros suformuotos iš šaknų, kai naudoti 1 mg/l kinetinas ir 2 mg/l IAR, o didžiausiomis redukciniėmis savybėmis – kaliaus kultūros iš lapų, kai terpėje naudoti 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR.

c) vaistinės juozažolės augaluose didžiausią fenolinių junginių kiekį sukaupė iš šaknų suformuotos kaliaus kultūros, augintos MS terpėje su 2mg/l NAR ir 1 mg/l BAP. Vaistinio čiobrelio augaluose didžiausią kiekį sukaupė kaliaus kultūros, kai naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D. Prancūziškos levandos augaluose didžiausią kiekį sukaupė iš stiebų suformuotos kaliaus kultūros, augintos MS terpėje su 2 mg/l 2,4- D ir 2 mg/l BAP.

d) didžiausias flavonoidų kiekis rastas vaistinės juozažolės augaluose augintuose *in vivo* sąlygomis.

e) vaistinės juozažolės augaluose didžiausias *L*-prolino kiekis rastas kaliaus kultūrose, kai MS terpėje naudoti 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 50 μM metilžasmonatas. Vaistinio čiobrelio augaluose didžiausias kiekis buvo *in vivo* augaluose. Levandos augalai didžiausią kiekį sukaupė prancūziškos levandos kaliaus kultūrose iš stiebų, kai naudoti 0,5 mg/l BAP ir 1 mg/l NAR.

2. Didžiausiu superoksido dismutazės aktyvumu pasižymėjo vaistinės juozažolės augalų iš stiebų suformuotos kaliaus kultūros, naudojant MS terpę su 2 mg/l BAP ir 2mg/l IBR, o didžiausias katalazės aktyvumas, kai kaliaus kultūros buvo suformuotos iš lapų. Didžiausias askorbatperoksidazės aktyvumas – kaliaus kultūrose, kai terpėje buvo naudoti 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 50 μM metilžasmonatas. Vaistinio čiobrelio augaluose didžiausias superoksido dismutazės aktyvumas buvo kaliaus kultūrose suformuotose, kai buvo naudoti 0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D; katalazės aktyvumas didžiausias *in vivo* auugaluose; askorbatperoksidazės aktyvumas didžiausias kaliaus kultūrose iš lapų, kai terpėje buvo naudoti 0,5 mg/l kinetinas ir 1 mg/l 2,4-D. Prancūziškos levandos augaluose didžiausias superoksido dismutazės aktyvumas nustatytas kaliaus kultūrose iš lapų, kai buvo naudoti 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D; katalazės aktyvumas kaliaus kultūrose iš lapų, kai buvo naudoti 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBR ir 100 μM metilžasmonatas; askorbatperoksidazės – kaliaus kultūrose, kurios suformuotos naudojant 1 mg/l kinetino ir 2 mg/l IAR.

3. Malondialdehido koncentracija suformuotose kaliaus kultūrose buvo mažesnė nei *in vivo* sąlygomis augintuose augaluose. Tačiau prancūziškos levandos iš lapų suformuotose kaliaus kultūrose, naudojant 1 mg/l NAR ir 0,5 mg/l BAP fitohormonus, kaliaus kultūrose suformuotose, naudojant 1 mg/l kinetiną ir 2 mg/l IAR, ir vaistinės levandos *in vitro* augaluose malondialdehido kiekiai gauti didesnis.
4. Didžiausią antibakterinį aktyvumą prieš *Rhizobium radiobacter*, *Escherichia coli* ir *Xanthomonas campestris* rodė vaistinė juozažolė, užauginta *in vivo* sąlygomis. Didžiausią antibakterinį aktyvumą prieš *Listeria monocytogenes* rodė prancūziškos levandos ekstraktas išgautas iš suformuotos kaliaus kultūros, naudojant 1 mg/l kinetiną ir 2 mg/l IBR fitohormonus.
5. Didžiausias 3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propeno rūgšties (*Z,E*)-2-(3-4-dihidroksifenil)etenilesterio (mėlyno pigmento) kiekis vaistinės levandos ląstelių suspensijos kultūrose sukaupiamas 7 auginimo dieną.
6. Pateikta siūloma timolio gamybos iš vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.), auginto terpėse su 2 mg/l BAP ir 2 mg/l 2,4-D fitohormonais, aparatūrinė schema.

Literatūros sąrašas

1. PICHERSKY, E. and D. R. GANG. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends in plant science*. 2000, Vol. 5, no. 10, p. 439–445.
2. JAMWAL, K., S. BHATTACHARYA, and S. PURI. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*. 2017, vol. 9, p. 26-38. ISSN 2214-7861.
3. PAUR I., M. H. CARLSEN, B. L. HALVORSEN et al. *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. CRC Press/Taylor & Francis, 2011, 2nd edition. ISBN 9781439807132.
4. CHEN, X. Y. and Z. XU. Artemisinin and plant secondary metabolism. *Science bulletin*. Science China press, 2016, Vol. 61, no. 1, p. 1–2. ISSN 2095-9281.
5. MATKOWSKI, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – a review. *Biotechnology advances*. 2008. vol. 26, no. 6 p. 548–560.
6. BHATIA, S., SHARMA, K., DAHIYA, R. and T. BERA. *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. Elsevier Inc, 2015. ISBN 9780128022214.
7. TAMURA H., T. TAKEBAYASHI, H. SUGISAWA. *Thymus vulgaris* L. (Thyme): *in vitro* culture and the production of secondary metabolites. *Medicinal and aromatic plants IV. Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer, 1993, vol 21., p. 413-426. ISBN 9783642770067.
8. KEYKHA, F., A., A. KHADEM, A. BAGHERI and M. AMERI. Optimization of lavender (*Lavandula angustifolia*) callus culture. *Plant tissue cult. & biotech.* 2014, 24(2): 279-285.
9. ROLLI, E., A. RICCI, A. BIANCHI and R. BRUNI. Optimisation of *in vitro* propagation of *Hyssopus officinalis* L. using two-node explants and N-phenyl-N'-benzothiazol-6-yl-urea (PBU), a new urea-type cytokinin. *Journal of horticultural science and biotechnology*. 2011, Vol. 86, no. 2, p. 141–145.
10. AFFONSO, V. R., H. R. BIZZO, C. L. S. LAGE and A. SATO. Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. *J. Agric. food chem.* 2009, Vol. 57, p. 6392–6395.
11. JONUŠKIENĖ I. *Augalų ir mikroorganizmų biotechnologija*. Vilnius: UAB TEV. 2012, p. 15.
12. TREJO-TAPIA, G., C. ARIAS-CASTRO and M. RODR. Influence of the culture medium constituents and inoculum size on the accumulation of blue pigment and cell growth of *Lavandula spica*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2003, vol. 72, p. 7–12. ISSN 1573-5044.
13. MENDOZA, D., O. CUASPUD, J. P. ARIAS, O. RUIZ and M. ARIAS. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology reports*. 2018, vol. 19, no. 63.
14. LIU, H. K., Y. F. KANG, X. Y. ZHAO, Y. P. LIU, X. W. ZHANG and S. J. ZHANG. Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *Journal of functional foods*. 2019, vol. 53, no. 13, p. 136–145.
15. NAIK P. M. and J. M. AL-KHAYRI Abiotic and biotic elicitors role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and biotic stress in plants – recent advances and future perspectives*. Intech, 2016, pp.247-277.
16. ATTARAN, S., P. ABRISHAMCHI, and T. RADJABIAN. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Industrial crops & products*. 2017, vol. 103, p. 81–88.

17. GUPTA, D. K., J. M. PALMA and F. J. CORPAS. *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Springer international publishing, 2018. ISBN 9783319750873.
18. SLATER, A., N. W. SCOTT, M. R. FOWLER. *Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants*. Oxford university press, 2003. ISBN 0199560870.
19. SHARMA, P., A. B. JHA, R. S. DUBEY and M. PESSARAKLI. Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*. 2012, vol. 2012, p. 1–26.
20. PISOSCHI, A. M. and G. P. NEGULESCU. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry & analytical biochemistry*. 2012, vol. 01, no. 01, p. 1–10.
21. PRAKASH, A., F. RIGELHOF, E. MILLER. Antioxidant activity. Medallion labs.
22. DAI, J. and R. J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010, Vol. 15, p. 7313–7352.
23. ANANTHARAJU, P. G., P. C. GOWDA, M. G. VIMALAMBIKE and S. V. MADHUNAPANTULA. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition journal*. 2016. Vol. 15, no. 1, p. 1–16.
24. TSIMOGIANNIS, D. and V. OREOPOULOU. Classification of phenolic compounds in plants. *Polyphenols in plants*. 2019, p. 263–284.
25. GULCIN, L. Fe³⁺–Fe²⁺ Transformation method: an important antioxidant assay. *Advanced protocols in oxidative stress III*. Methods in molecular biology (methods and protocols). Humana press, New York. 2014, vol 1208. ISBN 9781493914401.
26. CAROCHO, M. and C.F.R. FERREIRA. A reviews on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*. 2013, 51: 15-25.
27. KUMAR, S. and A. K. PANDEY. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*. 2013.
28. FALCONE FERREYRA, ML., SP. RIUS, P. CASATI. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant sci*. 2012, vol. 3, p. 1–15.
29. LUDWICZUK, A., M. I. GEORGIEV. Chapter 11, Terpenoids. *Pharmacognosy*. Elsevier Inc, 2017. ISBN 9780128021040.
30. SKRZYPEK, Z., H. WYSOKINSKA. Sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L. sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L. *Z Naturforsch C*. 2003, 58(5-6): 309-312.
31. SUN, T., H. YUAN, H. CAO, M. YAZDANI, Y. TADMOR and L. LI. Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular plant*. 2018, vol. 11, no. 1, p. 58–74.
32. NISAR, N., L. LI, , S. LU, N. C. KHIN and B. J. POGSON. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*. 2015, vol. 8, no. 1, p. 68–82.
33. FIZUR, M., et al. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Frontiers in pharmacology*. 2017, vol. 8, no. June, p. 1–34.
34. SALEHI, B. and M. CONTRERAS. Thymol, thyme, and other plant sources: health and potential uses. *Phytotherapy research*. 2018, no. 10, 1-19.
35. MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food chemistry*. 2016, 210, 402-414.

36. DEDIC, M., et al. HPLC method for determination the content of thymol and carvacrol in thyme tincture. *Bulletin of the chemists and technologists of Bosnia and Herzegovina*. 2018, 50, 1-6. ISSN: 2232-7266.
37. RAD, M. S. et al. Carvacrol and human health: a comprehensive review. *Phytotherapy research*. 2018, no. September, p. 1–13.
38. GAMES, E. et al. Structurally related monoterpenes *p*-cymene, carvacrol and thymol isolated from essential oil from leaves of *Lippia sidoides* Cham. (*Verbenaceae*). *Molecules*. 2016, 21, 1390.
39. MICKEVIČIUS, D. *Cheminės analizės metodai*. Vilnius: Žiburys, 1999.
40. OLSZOWY, M. and A. L. DAWIDOWICZ. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? *Chemical papers*. 2018. Vol. 72, no. 2, p. 393–400. ISSN 1336-9075.
41. TSIMOGIANNIS, D., A. BIMPILAS, V. OREOPOULOU. DPPH radical scavenging and mixture effects of plant *o*-diphenols and essential oil constituents. *European journal of lipid science and technology*. 2017, p. 1-31.
42. BENZIE, I. F. F. and M. DEVAKI. The ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay for non – enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications*. 2018, 5.
43. TAYLOR, P., A. V. IVANOVA, E. L. GERASIMOVA and Kh. Z. BRAININA. Critical reviews in analytical chemistry potentiometric study of antioxidant activity: development and prospects. *Crit rev anal chem*. 2015, 45(4), p. 311-322.
44. GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International journal of pharmaceutical sciences and research*. 2015, vol. 6, no. 2, p. 546–566.
45. BONNER J. *Plant Proteins*. Springer, 1950, vol 6. ISBN 9783709171769
46. HILDEBRANDT, T. M., N. A. NUNES, W. L. ARAUJO and H. P. BRAUN. Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant*. 2015, vol. 8, no. 11, p. 1563–1579.
47. DE LA TORRE-GONZALEZ, A., D. MONTESINOS-PEREIRA, B. BLASCO ir J. M. RUIZ. Influence of the proline metabolism and glycine betaine on tolerance to salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) commercial genotypes. *Journal of plant physiology*. 2018, vol. 231, p. 329–336.
48. SZABADOS, L. and A. SAVOURE. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*. 2010. Vol. 15, no. 2, p. 89–97.
49. DAVEY, M. W., E. STALS, B. PANIS, J. KEULEMANS and R. L. SWENNEN. High – throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical biochemistry*. 2005, vol. 347, no. 2, p. 201–207.
50. BARRERA, G., S. PIZZIMENTI, M. DAGA, C. DIANZANI, A. ARCARO, G. P. CETRANGOLO, G. GIORDANO, M. A. CUCCI, M. GRAF and F. GENTILE. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants*. 2018, vol. 7, no. 8, p. 102.
51. VANDEMOORTELE, A. and B. DE MEULENAER. *Reactivity of lipid oxidation products in foods – is malondialdehyde a reliable marker?*. Elsevier, 2018. ISBN 9780081005965.
52. BORS, W., W. HELLER, C. MICHEL and M. SARAN. Oxygen radicals in biological systems part b: oxygen radicals and antioxidants. *Methods in Enzymology*. Academic press, 1990, vol. 186, no. 1989, p. 343–355. ISBN 9780080883038.

53. JUDŽENTIENE, A. Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and safety*. 2015, p. 471–479.
54. NANOVA, Z., Y. SLAVOVA, D. NENKOVA and I. IVANOVA. Microclonal propagation of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). 2007, Vol. 13, p. 213–219.
55. GILCA, M., G. S. TIPLICA and C. M. SALAVASTRU. Traditional and ethnobotanical dermatology practices in Romania and other eastern European countries. *Clinics in dermatology*. 2018, vol. 36, no. 3, p. 338–352.
56. KIZIL, S., N. HASIMI, V. TOLAN, E. KILINC, and H. KARATAS. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. 2010, 38(3): 99-103.
57. PANDEY, V., R. S.VERMA, A. CHAUHAN and R. TIWARI. Compositional variation in the leaf, flower and stem essential oils of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) from Western-Himalaya. *Journal of Herbal Medicine*. 2014, Vol. 4, no. 2, p. 89–95.
58. MARASESTI, C. Histo-anatomy and *in vitro* morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. (*Lamiaceae*). *Acta. bot. croat.* 2004, Vol. 63, no. 1, p. 59–68. ISSN 0365–0588
59. PAKSERESHT, G., D. KAHRIZI, M. MANSOURI, T. GHORBANI, N. KAZEMIC. Study of callus induction and cell culture to secondary metabolite production in *Hyssopus officinalis* L. *Journal of reports in pharmaceutical sciences*. 2016, 5(2), 104-111.
60. KOCHAN, E. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis* rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots. 1999, 54(1): 11-16.
61. ALAMGIR, A. N. M. *Biotechnology, in vitro production of natural bioactive compounds, herbal preparation, and disease management (treatment and prevention)*. Springer international publishing, 2018, vol. 2, p. 585-664. ISBN 9783319923871.
62. NABAVI, S. M., A. MARCHESE, M. IZADI, V. CURTI, M. DAGLIA and S. F. NABAVI. Plants belonging to the genus thymus as antibacterial agents: from farm to pharmacy. *Food chemistry*. 2015, Vol. 173, p. 339–347.
63. FURMANOWA, M. and O. OLSZOWSKA. Micropropagation of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. 1992, Vol. 19, no. 19, p. 230-243.
64. OZUDOGRU, E. A., E. KAYA, E. KIRDOK and S. ISSEVER-OZTURK. *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In vitro cellular and developmental biology – plant*. 2011, Vol. 47, no. 2, p. 309–320. ISSN 1475-2689.
65. PAVELA, R., M. ŽABKA, N. VRCHOTOVA and J. TRISKA. Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Industrial crops and products*. 2018, Vol. 112, no. October 2017, p. 762–765.
66. HABASHY, N. H., M. M. ABU SERIE, W. E. ATTIA and S. A. M. ABDELGALEIL. Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. *Journal of functional foods*. 2018, Vol. 40, no. January 2017, p. 317–328.
67. BAKHTIAR, Z., Z. BAKHTIAR, M. H. MIRJALILI and A. SONBOLI. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus*. *Crop breed. Appl. Biotechnol.* 2016, vol. 16, no. 1 p. 48–54.
68. MOSAVAT, N. Modulation of callus growth and secondary metabolites in different *Thymus* species and *Zataria multiflora* micropropagated under ZnO nanoparticles stress. *Biotechnology*

- and applied biochemistry. 2019.
69. GONCALVES, S. and A. ROMANO. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology advances*. 2013, vol. 31, no. 2, p. 166–174.
 70. ALEEBRAHIM-DEHKORDY, E., M. R. KOPAEI and M. BAHMANI. Study of antibacterial effect of total hydroalcoholic extract of *Thymus daenensis* and *Lavandula officinalis* on *Listeria monocytogenes*, an agent of food spoilage, using microdilution. *Der pharma chemica*. 2016, 8(2): 238-242. ISSN 0975-413X
 71. BOUYAHYA, A., A. ET-TOUYS, J. ABRINI, A. TALBAOUI, H. FELLAH, Y. BAKRI and N. DAKKA. *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017, Vol. 12, no. July, p. 179–184.
 72. DE BONA, C. M., V. REINHART, L. A. BIASI and F. ZANETTE. *Lavandula dentata* and *Lavandula angustifolia* *in vitro* organogenesis. *Plant cell cult. Micropropag.* 2011, No. 72, p. 66–70.
 73. KUMAR A., S. KAUSHAL, S. SHARMA. Studies on influence of growth regulators in micropropagation of *Lavandula angustifolia*. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*. 2015, vol. 6, no. 2, p. 73-77. ISSN: 09764550
 74. KHATEEB, W. AL., R. KANAAN, T. EL-ELIMAT, M. ALU, J. LAHHAM and A. EL-OQLAH. *In vitro* propagation, genetic stability, and secondary metabolite analysis of wild Lavender (*Lavandula coronopifolia* Poir.). *Horticulture, environment, and biotechnology*. 2017, vol. 58, no. 4, p. 393–405. ISSN 2211-3460.
 75. DORNENBURG, H. and K. DIETRICH. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Critical reviews in plant sciences*. 1996, vol. 15, p. 141-168.
 76. BANTHORPE, D. V, H. J. BILYARD and D. G. WATSON. Pigment formation by *callus* of *Lavandula angustifolia*. 1985, Vol. 24, no. 11, p. 2677–2680.
 77. TREJO-TAPIA, G., C. ARIAS-CASTRO and M. RODR. Influence of the culture medium constituents and inoculum size on the accumulation of blue pigment and cell growth of *Lavandula spica*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2003, vol. 72, p. 7–12. ISSN 1573-5044
 78. JIAJU, Z., X. GUIRONG, Y. XINJIAN. *Traditional Chinese medicines: molecular structures, natural sources and applications*. Wiley, 2002. ISBN 0566084279
 79. MURASHIGE T; F. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962, vol. 15 (3): 473–497.
 80. DAUNORAS G. *Farmokopėjos straipsnių rinkinys*. Kaunas: Kauno medicinos universitetas. 2001, p. 203.
 81. BRAND-WILLIAMS, W., M.E. CUVELIER, C. BERSET. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel wissenschaft und technologie*. 1995, 28, 25–30.
 82. SANDOVAL M., N. N. OKUHAMA, F. M. ANGELES, V. MELCHOR, L. A. CONDEZO, J. LAO, M. J. S. MILLER. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food chemistry*. 2002, vol. 79(2), 207–213.
 83. MOHARRAM, H. A. and M. M. YOUSSEF. Methods for determining the antioxidant activity : a review. *J. fd. sci. & technol*. 2014, vol. 11, no. 1, p. 31–42.
 84. FERNANDES, R. P. P., M. A. TRINDADE, F. G. TONIN, and C. G. LIMA. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods : cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant

- in lamb burgers. *J. food sci. technol.* 2016, vol. 53, no. 1, p. 451–460. ISSN 0975-8402.
85. BENSLAMA, A. and A. HARRAR. Free radicals scavenging activity and reducing power of two Algerian Sahara medicinal plants extracts. *International journal of herbal medicine.* 2016, 4(6): 158-161. ISSN 23212187.
86. PROESTOS, C., K. LYTOUDI, O. K. MAVROMELANIDOU, P. ZOUMPOULAKIS and V. J. SINANOGLU. Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants.* 2013, 2(1) p. 11–22.
87. ANNA, P. and K. PYRZYNSKA. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food anal. methods.* 2014, vol.7, no. 9, p. 1776–1782. ISSN19369751.
88. ROGER R. and M. JOAQUIN. *Handbook of plant ecophysiology techniques.* Springer, 2001. ISBN 9780792370536.
89. ABRAHAM, E., C. HOURTON-CABASSA, and L. ERDEI. Methods for determination of proline in plants. *Methods mol. biol.* 2010, 639:317-31.
90. HODGES, D. M., J. M. DELONG, C. F. FORNEY and R. K. PRANGE. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* 1999, vol. 207, no. 4, p. 604-611. ISSN 00320935.
91. BALOUIRI M., M. SADIKI, S. K. IBNSOUDA. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of pharmaceutical analysis.* 2016, vol. 6(2), 71–79.
92. SEZONOV, G. and R. D. ARI. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. bacteriol.* 2007, vol. 189, no. 23, p. 8746–8749.

Publikacijų sąrašas

Publikacijos baigiamojo darbo tema

Pranešimai konferencijų medžiagoje

1. GIŽAITĖ, E., JONUŠKIENĖ, I. Antioksidacinio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas paprastojo čiobrelio (*Thymus vulgaris* L.) ir vaistinės juozažolės (*Hyssopus officinalis* L.) augaluose *in vitro* ir *in vivo*. Konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2018“ pranešimų medžiaga. 2018, p. 70-73. ISBN 978-9955-18-989-3.
2. GIŽAITĖ, E., JONUŠKIENĖ, I. Fenolinių junginių kiekio ir antibakterinio aktyvumo įvertinimas Notrelinių (*Lamiaceae*) šeimos augaluose *in vitro* ir *in vivo*. Konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2019“ pranešimų medžiaga. 2019, p. 80–85. ISBN 978-609-07-0176-8.

Žodiniai panešimai konferencijose

1. Dalyvauta Lietuvos mokslų akademijos 9 – oje jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai“ ir skaitytas žodinis pranešimas „Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ir palyginimas Notrelinių (*Lamiaceae*) šeimos augaluose *in vitro*“.

Padėka

Dėkoju savo darbo vadovei doc. dr. Ilonai Jonuškienei už suteiktas žinias, patarimus, pasiūlymus, darbą kartu, nuoširdžias ir atsakingas konsultacijas, visuomet suteiktą grįžtamąjį ryšį, skatinimą domėtis ir tobulėti.