



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Rūta Laurinavičiūtė

**LIUCERNŲ (*MEDICAGO*) IR LUBINŲ (*LUPINUS*)
AUGINIMO *IN VITRO* OPTIMIZAVIMAS IR
BIOAKTYVIŲ JUNGINIŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro darbas

Vadovas

doc. dr. I. Jonuškienė

Kaunas, 2015

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS
ORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

TVIRTINU

Katedros vedėjas

Prof. V. Martynaitis

**LIUCERNŲ (*MEDICAGO*) IR LUBINŲ (*LUPINUS*)
AUGINIMO *IN VITRO* OPTIMIZAVIMAS IR
BIOAKTYVIŲ JUNGINIŲ ĮVERTINIMAS**

Baigiamasis magistro darbas

Studijų programa Chemijos inžinerija (kodas 621H81004)

Darbą atliko

Rūta Laurinavičiūtė

Vadovas

Doc. Dr. Ilona Jonuškienė

Recenzentas

Dr. Ingrida Tumosienė

Kaunas, 2015



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

studentės Rūtos Laurinavičiūtės

Studijų programa Chemijos inžinerija (kodas 621H81004)

Baigiamojo darbo „Liucernų (*Medicago*) ir lubinų (*Lupinus*) auginimo *in vitro* optimizavimas ir bioaktyvių junginių įvertinimas“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2015 m. gegužės mėn. 19 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Rūtos Laurinavičiūtės** baigiamasis darbas tema „Liucernų (*Medicago*) ir lubinų (*Lupinus*) auginimo *in vitro* optimizavimas ir bioaktyvių junginių įvertinimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu 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.

(studento vardas ir pavardė, įrašyti ranka)

(parašas)

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Tvirtinu:
Cheminės technologijos fakulteto dekanas
Prof. E.Valatka

Suderinta:
Katedros vedėjas prof. V. Martynaitis

Dekano įsakymas Nr. ST17-F-02-3
2015 m. balandžio mėn. 16 d.

2015 m. balandžio mėn. 16 d.

MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS

Išduota studentui (-ei) **Rūtai Laurinavičiūtei**

1. Darbo tema: „Liucernų (*Medicago*) ir lubinų (*Lupinus*) auginimo *in vitro* optimizavimas ir bioaktyvių junginių įvertinimas“.
2. Darbo tikslas: nustatyti ir atrinkti liucernų (*Medicago*), jų kaliaus kultūrų ir lubinų (*Lupinus*) *in vitro* veisles, kaupiančias didžiausius bioaktyvių junginių kiekius ir sudaryti β -galaktozidazės išskyrimo iš lubinų (*Lupinus*) technologinę liniją.

Darbo uždaviniai: paruošti maitinamąsias terpes augalų augimui ir optimizuoti jų augimą; įvertinti terpių įtaką augalinių ląstelių augimui; nustatyti bioaktyvius junginius, įvertinti antioksidacinį aktyvumą ir pateikti β -galaktozidazės gavimo principinę technologinę schemą.

3. Darbo sudėtinės dalys:

Įžangoje pateikti darbo aktualumą, darbo tikslą ir uždavinius.

Literatūros apžvalgos dalyje aprašyti liucernas ir lubinus bei jų aktyvius junginius.

Medžiagų ir tyrimų metodų dalyje pateikti pagrindinius naudotus metodus.

Tyrimų rezultatų ir jų aptarimų dalyje pateikti pagrindinius rezultatus, susijusius su bioaktyvių junginių išskyrimu.

Rekomendacijų dalyje pateikti β -galaktozidazės gamybos technologinę schemą.

Išvadų dalyje pateikti pagrindines išvadas.

Literatūros sąrašė pateikti mokslinės literatūros ir kitų informacijos šaltinių sąrašą.

Užduoties išdavimo data 2014 m. vasario mėn. 3 d.

Užbaigto darbo pateikimo terminas 2015 m. gegužės 19 d.

Vadovas: doc. Ilona Jonuškienė
(vardas, pavardė)

_____ 2014-02-03
(parašas, data)

Užduotį gavau: Rūta Laurinavičiūtė
(studento vardas, pavardė)

_____ 2014-02-03
(parašas, data)

Laurinavičiūtė R. (2015) Liucernų (*Medicago*) ir lubinų (*Lupinus*) auginimo *in vitro* optimizavimas ir bioaktyvių junginių įvertinimas. Chemijos inžinerijos magistro darbas. Studijų programa M1136L31. Vadovė doc. dr. I. Jonuškienė. Kaunas: Cheminės technologijos fakultetas, Kauno technologijos universitetas.

SANTRAUKA

Per pastaruosius dešimtmečius daugelio tyrimų tikslas buvo sutelktas į biologiškai aktyvių junginių iš natūralių šaltinių taikymo galimybes. Natūralūs, bioaktyvūs produktai turi didelę ekonominę svarbą.

Biotechnologijoje liucerna naudojama farmacijos pramonėje. Iš liucernų gaminami rekombinantiniai glikoproteinai ir antikūnai. Imuninėje medicinoje genetiškai modifikuota liucerna naudojama valgomosioms vakcinoms gaminti. Biotechnologijoje lubinai yra naudojami baltymų išskyrimui, todėl būtina surasti būdus greitam lubinų biomasės padidėjimui. Šį biomasės padidėjimą galima gauti biotechnologiniais metodais, auginant lubinų ląstelių kultūras *in vitro* ir vėliau optimizuojant sąlygas jų auginimui *in vivo*.

Šio darbo tikslas buvo nustatyti ir atrinkti liucernų (*Medicago*), jų kaliaus kultūrų ir lubinų (*Lupinus*) *in vitro* veisles, kaupiančias didžiausius bioaktyvių junginių kiekius ir sudaryti β -galaktozidazės išskyrimo iš lubinų (*Lupinus*) technologinę liniją.

Nustatyta, kad didžiausi pigmentų kiekiai tiriamuosiuose augaluose buvo: chlorofilo *a* - $130,6 \pm 0,06$ mg/100 g; chlorofilo *b* - $49,2 \pm 0,06$ mg/100 g; karotinoidų - $37,0 \pm 0,08$ mg/100 g liucernose *Antanė*, išaugintose *in vitro* MS terpėje po 7 dienų auginimo. Chlorofilo *a* - $164,9 \pm 0,01$ mg/100 g; chlorofilo *b* - $51,2 \pm 0,04$ mg/100 g, karotinoidų - $50,9 \pm 0,03$ mg/100 g lubinuose *VB Derliai*, išaugintuose *in vitro* MS terpėje po 7 dienų auginimo. Nustatyta, kad didžiausi baltymų kiekiai buvo: liucernose *Antanė* - $32 \pm 0,07$ %, išaugintose *in vitro* MS terpėje, lubinuose *Trakiai* - $18,53 \pm 0,02$ %, išaugintuose MS terpėje. Nustatyta, kad didžiausi askorbo rūgšties kiekiai buvo: liucernose *Birutė* - $70,4 \pm 0,01$ mg/100g; lubinuose *VB Vilniai* - $5,28 \pm 0,01$ mg/100g. Ištirta, kad didžiausi flavonoidų kiekiai buvo: liucernose *Malvina* - $1,5 \pm 0,01$ mg/g, išaugintose *in vitro* MS terpėje, hibridiniuose ir *VB Derliai* lubinuose, išaugintuose *in vitro* MS terpėje ($0,8 \pm 0,02$ mg/g). Gauta, kad didžiausi fenolinių junginių kiekiai buvo liucernose *Antanė* - $0,07 \pm 0,01$ mg/100 mg, išaugintose *in vitro* MS terpėje, lubinuose *VB Derliai*, išaugintuose *in vitro* MS terpėje ($0,064 \pm 0,04$ mg/100 mg). Ištirta, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH stabilų radikalą buvo: liucernose *Žydrūnė* - $22,3 \pm 0,01$ %; hibridiniuose lubinuose - $51,9 \pm 0,1$ %. Nustatyta, kad didžiausia β -galaktozidazės koncentracija buvo lubinų *VB Vilniai* sėklose ($0,32 \pm 0,02$ mg/ml). Pateiktas β -galaktozidazės išskyrimo iš lubinų (*Lupinus*) technologinio proceso brėžinys.

Laurinavičiūtė R. (2015) Optimization of *Medicago* and *Lupinus* growth *in vitro* and evaluation of bioactive compounds. Master's Work in Chemical Engineering. Study Programme M1136L31. Supervisor ass. prof. dr. I. Jonuškienė. Kaunas: Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

SUMMARY

In recent decades, many studies were focused on bioactive compounds extraction from natural sources and their application possibilities. Natural and bioactive products have a great economic importance.

Alfalfa is using in the pharmaceutical and biotechnology industries. *Medicago* is producing recombinant glycoproteins and monoclonal antibodies. Genetically modified alfalfa is using for edible vaccines in immunomedicine. Lupine is used in protein isolation and it is necessary to find ways to increase their biomass. Which could be obtained by biotechnological methods, using of lupine cultures *in vitro* and optimizing the conditions for their growth *in vivo*.

The aim of the present research was to identify and select alfalfa (*Medicago*), their callus cultures and lupins (*Lupinus*) *in vitro* varieties which accumulate the highest amount of bioactive compounds and to present technological line of β - galactosidase extraction of lupins (*Lupinus*).

It was found, that the highest quantities of pigments in analyzed were: chlorophyll *a* - 130.6 ± 0.06 mg/100 g; chlorophyll *b* - 49.2 ± 0.06 mg/100g; carotenoids - 37.0 ± 0.08 mg/100 g in alfalfa *Antane*, cultured *in vitro* in MS medium after 7 days cultivation; Chlorophyll *a* - 164.9 ± 0.01 mg/100 g; chlorophyll *b* - 51.2 ± 0.04 mg/100 g, carotenoids - 50.9 ± 0.03 mg/100 g in lupine *VB Derliai in vitro* in MS medium after 7 days cultivation. It was found, that the highest protein levels were: in alfalfa plants *Antane* - 32 ± 0.07 %, which were *in vitro* in MS medium, in lupins *Trakiai* - 18.53 ± 0.02 % which were, cultured in MS medium. It was found, that the highest amount of ascorbic acid were: in alfalfa *Birute* - 70.4 ± 0.01 mg/100 g; in lupins *VB Vilniai* - 5.28 ± 0.01 mg/100 g. It was established, that the highest amounts of flavonoids were: alfalfa *Malvina* - 1.5 ± 0.01 mg/g, cultured *in vitro* in MS medium, hybrid and *VB Derliai* lupins, which were cultured *in vitro* in MS medium (0.8 ± 0.02 mg/g). It was found, that the highest amounts of phenolic compounds were in alfalfa *Antane* - 0.07 ± 0.01 mg/100 mg, cultured *in vitro* in MS medium, in lupins *VB Derliai in vitro* in MS medium (0.064 ± 0.04 mg/100 mg). It was established, that the highest antioxidant activity against DPPH stable radicals were: in alfalfa *Zydrune* - 22.3 ± 0.01 %; in hybrid lupins - 51.9 ± 0.1 %. It was found, that the highest concentration of β -galactosidase was in *VB Vilniai* seeds (0.32 ± 0.02 mg/ml) of lupins. It was presented β -galactosidase extraction from lupins (*Lupinus*).

TURINYS

SANTRAUKA.....	5
SUMMARY.....	6
LENTELIŲ SĄRAŠAS.....	9
PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS.....	10
ĮVADAS.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1.1. Pupinių šeimos augalų biologijos ypatumai.....	14
1.1.1. Liucernos (<i>Medicago</i>).....	14
1.1.2. Liucernų (<i>Medicago</i>) veislės.....	15
1.1.3. Lubinai (<i>Lupinus</i>).....	16
1.1.4. Lubinų (<i>Lupinus</i>) veislės.....	18
1.2. Kaliaus kultūra ir jos formavimasis.....	19
1.3. β -Galaktozidazė.....	20
1.4. Bioaktyvūs junginiai.....	21
1.4.1. Chlorofilas ir karotinoidai.....	21
1.4.2. Fenoliniai junginiai.....	22
1.4.3. Antioksidantai ir jų charakteristika.....	23
1.4.4. Flavonoidai.....	24
1.4.5. Saponinai.....	25
1.4.6. Askorbo rūgštis.....	26
2. METODINĖ DALIS.....	28
2.1. Tiriamoji medžiaga.....	28
2.2. Augalų ląstelių maitinamoji terpė.....	28
2.3. Liucernų (<i>Medicago</i>) sėklų ir kaliaus kultūrų sterilinimas ir daiginimas.....	30
2.4. Lubinų (<i>Lupinus</i>) sėklų sterilinimas ir daiginimas.....	32
2.5. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų nustatymas tiriamuosiuose augaluose.....	33
2.6. Baltymų ekstrakcija iš augalų.....	34
2.7. Askorbo rūgšties kiekybinis nustatymas.....	35
2.8. Flavonoidų kiekio nustatymas.....	35
2.9. Bendras fenolinių junginių nustatymas Folino-Kiokalto metodu.....	36
2.10. Antioksidacinis aktyvumas prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą.....	37

2.11. Saponinų kokybinis nustatymas	38
2.12. β -Galaktozidazės enziminis įvertinimas	38
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	39
3.1. Chlorofilo <i>a</i> ir chlorofilo <i>b</i> bei karotinoidų kiekio įvertinimas liucernose.....	39
3.2. Chlorofilo <i>a</i> ir chlorofilo <i>b</i> bei karotinoidų įvertinimas liucernos kaliaus kultūroje..	40
3.3. Baltymų kiekio įvertinimas liucernose, augintose MS terpėse <i>in vitro</i>	41
3.4. Baltymų kiekio įvertinimas liucernų kaliaus kultūrose, augintose MS terpėse <i>in vitro</i>	43
3.5. Askorbo rūgšties kiekio įvertinimas liucernose, augintose MS terpėse <i>in vitro</i>	43
3.6. Flavonoidų kiekio nustatymas skirtingose liucernos veislėse	44
3.7. Bendras fenolinių junginių kiekio įvertinimas liucernose	44
3.8. Bendras fenolinių junginių kiekio įvertinimas liucernų kaliaus kultūrose	46
3.9. Antioksidacinio aktyvumo prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą įvertinimas	46
3.10. Antioksidacinio aktyvumo prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą įvertinimas liucernos kaliaus kultūrose	47
3.11. Chlorofilo <i>a</i> ir chlorofilo <i>b</i> bei karotinoidų įvertinimas lubinuose (<i>Lupinus</i>)	47
3.12. Baltymų kiekio įvertinimas lubinuose, augintose MS terpėse <i>in vitro</i>	49
3.13. Askorbo rūgšties kiekio įvertinimas lubinuose, augintose MS terpėje <i>in vitro</i>	50
3.14. Flavonoidų kiekio nustatymas lubinuose	50
3.15. Bendras fenolinių junginių kiekio įvertinimas lubinuose	51
3.16. Antioksidacinio aktyvumo prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą įvertinimas	52
3.17. Saponinų kokybinis nustatymas	52
3.18. β -Galaktozidazės enziminis įvertinimas	54
REKOMENDACIJOS	57
IŠVADOS	59
LITERATŪROS SĄRAŠAS	60
PRIEDAI	64
1 priedas. Technologinės schemos prietaisų žymėjimas ir pavadinimai	64
2 priedas. β -Galaktozidazės išskyrimo iš lubinų (<i>Lupinus</i>) technologinė linija.....	65

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Fenolinių junginių grupės augaluose	22
2 lentelė. Maitinamosios Murashige & Shoog (MS) terpės sudėtis	28
3 lentelė. MS terpės reagentų kiekis, paimtas iš pradinių tirpalų	30
4 lentelė. Baltymų ekstrakcijai naudotų buferinių tirpalų sudėtis	34
5 lentelė. Kokybinis saponinų įvertinimas lubinuose	53

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Mėlynžiedė liucerna (<i>Medicago sativa</i>).....	14
2 pav. Lubinai (<i>Lupinus</i>).....	17
3 pav. β -Galaktozidazės veikimas.....	20
4 pav. Flavonoidų struktūrinis pagrindas	24
5 pav. Saponinų struktūra	26
6 pav. Cheminė askorbo rūgšties struktūra.....	26
7 pav. Radikalo DPPH·redukcijos reakcija su antioksidantu	37
8 pav. Pigmentų kiekis skirtingų veislių liucernose <i>in vitro</i> po 7 dienų.....	39
9 pav. Pigmentų kiekis skirtingų veislių liucernose <i>in vitro</i> po 14 dienų.....	40
10 pav. Pigmentų kiekis skirtingų veislių liucernos kaliaus kultūrose.....	41
11 pav. Kalibracinė kreivė albumino kiekio nustatymui	42
12 pav. Baltymų kiekis skirtingose liucernos veislėse	42
13 pav. Baltymų kiekis skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrose	43
14 pav. Askorbo rūgšties kiekis skirtingų veislių liucernose	43
15 pav. Flavonoidų kiekio įvertinimas skirtingose liucernos veislėse	44
16 pav. Kalibracinė kreivė bendrųjų fenolinių junginių kiekio nustatymui	45
17 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingose liucernos veislėse	45
18 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrose	46
19 pav. Skirtingų liucernos veislių antioksidacinis aktyvumas	46
20 pav. Skirtingų veislių liucernos kaliaus kultūrų antioksidacinis aktyvumas	47
21 pav. Pigmentų kiekis lubinuose <i>in vitro</i> po 7 dienų.....	48
22 pav. Pigmentų kiekis lubinuose <i>in vitro</i> po 14 dienų.....	48
23 pav. Baltymų kiekio įvertinimas lubinuose	49
24 pav. Askorbo rūgšties kiekis lubinuose	50
25 pav. Flavonoidų kiekio įvertinimas lubinuose.....	50
26 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingų veislių lubinuose.....	51
27 pav. Lubinų antioksidacinis aktyvumas.....	52
28 pav. Kokybinis saponinų įvertinimas lubinuose <i>VB Derliai</i>	53
29 pav. Kokybinis saponinų įvertinimas hibridiniuose lubinuose.....	54
30 pav. Kalibracinė kreivė fermento β -galaktozidazės koncentracijos nustatymui.....	54
31 pav. β -Galaktozidazės įvertinimas lubinų sėklose	55

32 pav. β -Galaktozidazės įvertinimas lubinų daiguose.....	55
--	----

ĮVADAS

Per pastaruosius dešimtmečius daugelio tyrimų tikslas buvo sutelktas į biologiškai aktyvių junginių, iš natūralių šaltinių, taikymo galimybes [1]. Natūralūs, bioaktyvūs produktai turi didelę ekonominę svarbą dėl specialių cheminių medžiagų. Jie gali būti naudojami kaip vaistai, biologinės ar farmakologinės priemonės, produktų žaliava vaistų gamyboje. Kai kurie iš jų yra svarbūs kvapikliai, dažai ir kosmetika, kiti yra naudojami kaip insekticidai, pesticidai [2].

Biotechnologijoje liucerna naudojama farmacijos pramonėje. Iš liucernų gaminami rekombinantiniai glikoproteinai ir antikūnai. Augalų biofarmacijoje iš liucernų gaminami bioaktyvūs vaistai bei jos naudojamos monokloninių antikūnų diagnostikoje. Imuninėje medicinoje, genetiškai modifikuota liucerna naudojama valgomosioms vakcinoms gaminti [3].

Biotechnologijoje lubinai yra naudojami augalų ir baltymų išskyrimui, todėl būtina surasti būdus greitam lubinų biomasės padidėjimui. Šį biomasės padidėjimą galima gauti biotechnologiniais metodais, auginant lubinų ląstelių kultūras *in vitro* ir vėliau optimizuojant sąlygas jų auginimui *in vivo*. Augalų biotechnologijos tikslas yra išskirti baltymus, pigmentus, antioksidantinius junginius iš augalų ląstelių kultūrų *in vitro*. Iš augalų ląstelių kultūrų išskirti bioaktyvūs junginiai yra tikslios cheminės sudėties, gryni ir natūralūs [4].

Šio darbo naujumas susijęs su liucernų (lietuviškų veislių margažiedės: *Birutė*, *Žydrūnė* ir mėlynžiedės: *Antanė*, *Malvina*) ir lubinų (*VB Vilniai*, *VB Derliai*, hibridiniai ir *Trakiai*) ląstelių kultūrų auginimu bei dauginimu *in vitro*, biologiškai aktyviems junginiams nustatyti. Šiems tyrimams pasirinktos liucernos (*Medicago*) ir lubinai (*Lupinus*), nes baltymingų augalų auginimas ES sumažėjo, todėl būtina ieškoti biotechnologinių metodų, galinčių padidinti baltymingų augalų auginimą ir jų atsparumą patogeninėms ligoms.

Šio **darbo tikslas** – nustatyti ir atrinkti liucernų (*Medicago*), jų kaliaus kultūrų ir lubinų (*Lupinus*) *in vitro* veisles, kaupiančias didžiausius bioaktyvių junginių kiekius ir sudaryti β -galaktozidazės išskyrimo iš lubinų (*Lupinus*) technologinę liniją.

Siekiant darbo tikslo buvo iškelti šie **uždaviniai**:

1. Paruošti maitinamąsias terpes ir sudaiginti liucernas (*Medicago*) ir lubinus (*Lupinus*) *in vitro* steriliomis sąlygomis.
2. Suformuoti liucernų kaliaus kultūras *in vitro*.
3. Nustatyti chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, baltymų, askorbo rūgšties kiekius liucernose, jų kaliaus kultūrose ir lubinų daiguose *in vitro*.

4. Įvertinti flavonoidų, bendrųjų fenolinių junginių kiekius liucernos daiguose, jų kaliaus kultūrose ir lubinų daiguose *in vitro*.
5. Nustatyti antioksidacinį aktyvumą liucernos daiguose, jų kaliaus kultūrose ir lubinų daiguose *in vitro*.
6. Nustatyti fermento β -galaktozidazės, esančio lubinuose, koncentraciją sėklose ir daiguose.
7. Pateikti fermento β -galaktozidazės išskyrimo iš lubinų (*Lupinus*) technologinę liniją.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pupinių šeimos augalų biologijos ypatumai

Pupinių šeimos javai (*Fabacea* L.) Lietuvoje priklauso vienmečiams žoliniam augalams. Pagal gyvybinę formą jie gali būti lianomis (žirniai, pupelės, vikiai) arba su stačiais žoliniais stiebais (lubinai, pupos, sojos). Pupiniai augalai - dviskilčiai. Pagal vegetacijos trukmę pupiniai augalai skirstomi į dvi grupes: trumpo vegetacijos periodo (žirniai, vikiai) ir ilgesnio (pašarinės pupos, lubinai, pupelės, sojos).

Pagrindinis pupinių augalų biologijos ypatumas – gebėjimas gyventi simbiozėje su atmosferinį azotą fiksuojančiomis bakterijomis *Rhizobium*. Dėl to pupiniai augalai visada ir visuose organuose sintetina ir kaupia daugiau baltyminių medžiagų nei kitų šeimų augalai [5].

1.1.1. Liucernos (*Medicago*)

Yra žinoma apie 60 liucernos genties rūšių. Liucernų šaknys labai tvirtos, liemeninės, smarkiai šakojasi. Pirmais metais šaknys prasiskverbia iki 2 – 3 m, o kitais metais – iki 10 m gylio į dirvožemį, tačiau 60–80% šaknų masės būna ariamajame sluoksnyje. Pirmais metais šaknies kaklelis yra arti žemės paviršiaus, ontogenezės metu ji vis storėja ir traukiasi gilyn į dirvožemį, dėl ko augalai tampa atsparesni šalčiams. Iš šaknies kaklelyje esančių trumpų fitomerų pumpurų nuolat formuojasi nauji ūgliai [6].



1 pav. Mėlynžiedė liucerna (*Medicago sativa*) [7]

Stiebai gana stori, statūs, apvalūs arba keturbriauniai, šakoti, vidutiniškai turi 17 fitomerų su ilgais tarpubambliais. Augalo stiebų skaičius kiekvienais ontogenezės metais didėja nuo 2–3 pirmais metais iki 20 ir daugiau trečiais. Sėjos metais ūgliai išauga iki 30 – 50 cm aukščio, o antrais ir trečiais iki 1 m ir daugiau. Lapai trilapiai, vidurinis lapelis su ilgesniu koteliu. Lapeliai pailgi, siauri, karpytomis viršūnėlėmis.

Liucernos – ilgos dienos augalas, jau sėjus metais formuoja žiedinius ūglius. Žiedynai – retos kekės, turinčios 15 – 25 žiedų. Hibridinės liucernos žiedai įvairiausių spalvų: melsvi, violetiniai, geltoni, gelsvai žalsvi ir žalsvi. Lietuvoje labiausiai paplitusios hibridinės liucernos su melsvos ar violetinės žiedų spalvos. Vaisius – spirališkai susukta ankštis, turinti 5 – 7 sėklas. Sėklos inkstiškos, šiek tiek deformuotos, geltonos, rudos arba rausvai gelsvos.

Liucernos labai reiklios šilumai, tačiau pakenčia ir didelius šalčius. Normaliam augimui ir vystymuisi reikia daug drėgmės, bet dėl stiprios šaknų sistemos pakenčia ir drėgmės trūkumą bei sausras. Liucernos taip pat atsparios ir paviršiniam vandeniui, gali būti užlietos iki 15 – 20 parų. Daugiausia iš visų pupinių augalų liucernos reiklios šviesos fotonų srauto tankiui, todėl sunkiausiai iš visų pupinių pašarinių augalų pakenčia antsėlį [6].

Jos geba fiksuoti atmosferos azotą dėl simbiozės tarp augalų ir bakterijų, kurios vystosi jų šaknų sistemoje.

Liucernos – tai vitaminų A, D, E ir K šaltinis. Augaluose taip pat yra daug fermentų, priešuždegiminį poveikį turinčių medžiagų, hormonų, β-karotino, vitamino B₆, vitamino C ir vitamino U. Liucerna turi taninų, pektino medžiagų, saponinų, aminių, kumarino darinių, triterpeno glikozidų, karotinoidų, purino bazių, augalų sterolių, fitoestrogenų, flavonų, izoflavonoidų ir fenolinių junginių [8].

Liucernos turi daug žmogaus organizmui naudingų savybių, todėl vartojama kaip biologiškai aktyvus maisto papildas. Manoma, kad šis augalas mažina cholesterolio ir cukraus kiekį kraujyje, gerina širdies ir kepenų veiklą, padeda nugalėti nuovargį ir suteikia energijos. Liucerną labai tikslinga vartoti esant žarnyno ir virškinamojo trakto veiklos sutrikimui, ji normalizuoja medžiagų apykaitą. Liucerna – vienas iš nedaugelio augalų, kurio sudėtyje yra augalinės kilmės fluoro, kurį organizmas visų pirma kaupia dantų audiniuose. Jis skatina dantų emalio formavimąsi ir padeda apsaugoti dantis nuo karieso [9].

Iš liucernų gaunami pašarai ir gaunamas šieno derlius. Iš jų taip pat gali būti daromos granulės, rupiniai arba kubeliai. Iš liucernų yra gaunamas pagrindinis medaus derlius JAV, tai sudaro apie trečdalį metinės medaus apyvartos [10].

1.1.2. Liucernų (*Medicago*) veislės

Antanė – sukurta sukryžminus 16 augalų, atrinktų iš įvairių mėlynžiedžių liucernų veislių (*Birutė*, *Sverre*, *Eynsford*, *Radius* ir kt.) ir atlikus daugkartinę atranką izoliuotuose augynuose. Žaliųjų baltymų kiekis sausojoje medžiagoje yra 20,6 %. Šios veislės liucernos gerai žiemoja. Augalai aukšti, siekia 80 cm, atsparūs išgulimui. Vegetacijos periodo vidutinė trukmė – 161 diena.

2008 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą bei į Bendrąjį ES žemės ūkio augalų veislių katalogą.

Birutė – standartinė mėlynžiedžių ir hibridinių liucernų veislė Lietuvoje. Tai vidutinio ankstyvumo, margažiedė, derlinga, gerai žiemojanti, atspari ligoms veislė. Augalai vidutiniškai išauga iki 100 cm, vidutinio lapuotumo, atsparūs išgulimui. Šios veislės liucernos gerai auga gryname pasėlyje ar mišiniuose su varpinėmis žolėmis. Derlingesnė už veislę „Žydrūnė“. 1998 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą.

Malvina – veislė buvo sukurta daug kartų kryžminant kloną 62/82 su liucernų *Žydrūnė*, *Birutė*, *Vella* ir *Radius* veislėmis. Lapai sudarė 43,0 % bendro augalų žaliosios masės derliaus. Augalai gerai žiemoja. Augalų vidutinis aukštis sudaro 62 cm. Jie linkę išgulti, bet atsparūs ligoms. Jos augalų vegetacijos periodo vidutinė trukmė 160 dienų. Veislė 2006 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą.

Žydrūnė – vidutinio ankstyvumo. Pasižymi dideliu ir stabiliu derlingumu. Augalai vešlesni, mažiau išgula, geriau atželia pavasarį ir po pjūčių, pražysta ir subrandina sėklas 3 – 4 d. anksčiau nei *Augūnė II*. 1986 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą [11].

1.1.3. Lubinai (*Lupinus*)

Iš 1000 lubinų rūšių Lietuvoje daugiausia auginami geltonžiedžiai (*Lupinus luteus* L.) ir siauralapiai (*Lupinus augustifolius* L.). Kaip laukiniai auga ir daugiamečiai lubinai (*Lupinus poliphyllus* L.). Baltieji lubinai (*Lupinus albus* L.) dėl labai ilgos vegetacijos šalyje grūdams neauginami, nes nespėja subręsti. Tai – šiltesnių kraštų augalai.

Lubinai nuo seno buvo vieni iš svarbiausių augalų sukultūrinant dirvas ir padidinant natūralų jų derlingumą. Savo svarbos lubinai neprarado ir dabar. Sumažėjus ūkiuose organinių trąšų ir brangstant mineralinėms, žalioji lubinų masė tampa viena iš pigiausių organinių trąšų.

Lubinai kaupia žmogaus bei gyvulių organizmui kenksmingas medžiagas – alkaloidus. Dėl to iš pradžių lubinai netiko nei pašarui, nei maistui (jų grūdai buvo kartūs). Tačiau selekciniams pavyko išvesti veislių, turinčių labai mažai alkaloidų arba jų išvis neturinčių. Tokių lubinų grūdai tinka ir žmonių maistui. JAV, Čilėje, Peru, Portugalijoje ir kitose valstybėse lubinų grūdų miltai naudojami makaronų, duonos, konditerijos gaminių gamyboje, o lubinų baltymų pasta – dešrų ir mėsos konservų gamyboje [12].



2 pav. Lubinai (*Lupinus*) [13]

Lubinai – universalūs ankštiniai augalai. Jų grūdai pasižymi aukšta maistine ir pašarine verte, žalioji masė gali būti šeriama gyvuliams arba naudojama dirvožemio derlingumui didinti.

Ankštinių augalų sėklose randama 2-3 kartus daugiau baltymų nei varpinių javų grūduose. Ankštinių augalų biologinė vertė yra labai aukšta, nes į jų sudėtį įeina visos 8 nepakeičiamos aminorūgštys: treoninas, valinas, metioninas, izoleucinas, leucinas, fenilalaninas, lizinas ir triptofanas. Pagal aminorūgščių kiekį ir kokybę lubinuose esantys baltymai prilygta sojos baltymams. Skirtumas tas, kad visų lubinų rūšių baltymuose randamas palyginti labai žemas baltymų – fermentų inhibitorių kiekis [14].

Lubinai sukaupia 32 - 46 % baltymų, o kai kurios geltonžiedžių lubinų veislės – net 50 %. Tiek siauralapiai, tiek geltonžiedžiai lubinai užaugina 3-5 t/ha grūdų ir 40-60 t/ha žaliosios masės derlių [12]. Prie pagrindinių lubinų sėklų komponentų priskiriami ir lipidai, kurių randama nuo 7 iki 14 % [14].

Lubinai nereiklūs dirvai, reikalauja nedaug trąšų, todėl energetinės sąnaudos produkcijai gauti yra mažiausios, o energetinio efektyvumo koeficientas didesnis negu auginant kitus ankštinius ir varpinius javus [12].

Lubinų šaknų sistema liemeninė, itin gerai išsivysčiusi ir labai šakota, prasiskverbia giliai į žemę. Ant šaknų formuojasi gumbeliai, kur gyvena gumbelinės bakterijos. Stiebai tiesūs, briaunoti, plaukuoti iki 1,5 m aukščio. Lapai sudėtiniai, pirštiški, sudaryti iš 5-13 lapelių. Žiedų spalva skirtinga, nealkaloidinių veislių – geltona. Daugiamečiai lubinai (*Lupinus polyhyllus* Lindl.) apsidulkina kryžmiškai, o baltieji (*L. albus* L.), geltonžiedžiai (*L. luteus* L.) ir siauralapiai (*L. angustifolius* L.) yra savidulkiai. Ankštys įvairios morfologijos ir dydžio. Sėklos taip pat įvairių spalvų, formų ir dydžio [15].

1.1.4. Lubinų (*Lupinus*) veislės

Siauralapių pašarinių lubinų veislė VB Vilniai sukurta LAMMC Vokės filiale individualios atrankos metodu iš Rusijos N. Vavilovo augalininkystės instituto kolekcinio pavyzdžio – 3510 Populiacija 113.

Bandymų duomenimis naujos veislės žalios masės derlius svyruoja nuo 41 iki 79 t/ha, sėklų nuo 1,7 iki 3,5 t/ha priklausomai nuo agrometeorologinių sąlygų. Tai trumpo vegetacijos periodo 87 – 120 dienų, sėklinio tipo, pasižyminti greitu augimo tempu visose augimo tarpsniuose, vidutiniškai atspari grybinėms ligoms veislė.

Daigai nežymiai pūkuoti, stiebas šviesiai žalios spalvos, lapai šviesiai žali. Stiebas lapuotas, žiedynas kekė susidedanti iš 15 – 23 baltos spalvos žiedų. Ant augalo užsimezga nuo 10 iki 25 anksčių. Sėklos baltai – gelsvos spalvos su šviesiai rusvu rašteliu, matinio blizgesio. 1000 sėklų masės svoris svyruoja nuo 136 iki 160 gr.

Veislė universalios tipo, tinkanti auginti žaliajai trąšai ir pašarams. Baltymų kiekis sėklų sausoje masėje 32,75 %, ląstelienos 12,27 %, kalcio 0,28 %, fosforo 0,39 %, kalio 0,99 %, alkaloidų 0,005 %. Lubinų žalioje masėje baltymų 18,44 %, ląstelienos 15,20 %, kalcio 0,82 %, fosforo 0,25 %, alkaloidų 0,03 %.

Į Europos Sąjungos bendrąjį žemės ūkio augalų veislių katalogą įrašyta 2006 metais. Autoriai – Z. Maknickienė, A. Subačius ir kiti [16].

Siauralapių sideracinių lubinų veislė VB Derliai sukurta LAMMC Vokės filiale individualios atrankos metodu iš Rusijos N. Vavilovo augalininkystės instituto kolekcinio pavyzdžio – 3364 *Deter-3*.

Bandymų duomenimis naujos veislės žalios masės derlius svyruoja nuo 54 iki 75 t/ha, sėklų nuo 1,6 iki 2,8 t/ha priklausomai nuo agrometeorologinių sąlygų. Tai trumpo vegetacijos periodo (80 – 110 dienų), skaičiuojant nuo sėjos iki pilnos brandos, sėklinio tipo, pasižyminti aukštu atsparumu grybinėms ligoms.

Jaunų augalų daigai nežymiai pūkuoti, stiebas violetinis, lapai tamsiai žalios spalvos. Lapas susideda iš 6 – 9 lapelių. Stiebas vidutiniškai lapuotas. Žiedynas - kekė, susidedanti iš 16 – 19 baltos spalvos (turinti violetinį atspalvį) žiedų. Ant vieno augalo užmezgama vidutiniškai iki 25 anksčių. Sėklos – baltos, lygiu paviršiumi, matinio blizgesio. 1000 sėklų masės svoris svyruoja nuo 117 iki 150 gr. Žalios masės sausoje medžiagoje vidutiniškai randama 2,8 % azoto, 1,6 % kalcio, 0,1 % fosforo, 0,99 % kalio, 1,22 % alkaloidų.

Į Europos Sąjungos bendrąjį žemės ūkio augalų veislių katalogą įrašyta 2006 metais. Autorė - Z. Maknickienė [17, 18].

Geltonžiedžių pašarinių lubinų veislė *Trakiai* išvesta tarpveislinio kryžminimo metodu, sukryžminus veisles *Universal X, Akademičeskij 1*. Kryžminimai atlikti 1985 metais. Veislės *Trakiai* botaninė forma *Lupinus luteus var. maculatus*.

Jauni daigai gausiai plaukuoti, stiebai šviesiai žali, lapai tamsiai žali. Žiedynas – tamsiai geltonos spalvos kekė, sudarytas iš 30 – 40 žiedų. Užmezga nuo 15 iki 45 ankščių ant augalo. Sėklos apvalios, kiek suplotos, paviršius lygus, blizgesys – matinis. 1000 sėklų masės svoris 128 gr.

Vidutinis vegetacijos periodas 105 – 115 dienų. Vidutiniškai sėklų sausoje masėje randama 42,7 % proteinų, 5,4 % riebalų, 17,2 % ląstelienos, 0,005 % alkaloidų. Tai universalios panaudojimo veislė, tinkanti auginti tiek žaliajai trąšai, tiek pašarui.

Įrašyta į nacionalinį veislių katalogą 1999 m. Autorė Z. Maknickienė, A. Subačius, J. Lazauskas [19].

Siauralapių sideracinių lubinų hibridinis numeris 1772 (Deter) sukurtas 2005 m. tarpveislinio kryžminimo metodu bei taikant individualią atranką. Kryžminimai atlikti 2001 metais. Buvo sukryžmintos sekančios veislės: Vir -2 x N 3288. Tai determinantinio sideracinio tipo hibridas, pasižymintis trumpu vegetacijos periodu 80 – 85 dienos, kadangi ribotas šakojimasis hibrido žalios masės derlius svyruoja nuo 25 iki 31 t/ha, sėklų derlius 2,0 – 2,5 t/ha. Žiedai baltos spalvos išdėstyti pražanginiu būdu, sėklos baltos, matinės [20].

1.2. Kaliaus kultūra ir jos formavimasis

Kalius – tai antrinės meristemos masė natūraliomis sąlygomis aptraukianti pažeistas augalų vietas ir padedanti joms užgyti, taip pat susidaranti dirbtinai auginant izoliuotas augalo ląsteles ar audinius *in vitro*. Kaliaus kultūra – tai nespecializuoto augalinio audinio auginimas maitinamojoje terpėje. Besivystantis kalius praplėšia išorinio audinio sluoksnį ir dažniausiai formuojasi jo paviršiuje [21].

Kaliaus audinys yra amorfinė masė ir neturi konkrečios anatomicinės struktūros. Priklausomai nuo prigimties ir augimo sąlygų jis gali būti skirtingos konsistencijos:

- purus, lengvai dalijamas į atskirus mažus agregatus,
- vidinio tankio su ryškiais meristeminiiais audiniais,
- tankus, kuriame diferencijuojasi kambario elementai ir vandens apykaitos sistema [22].

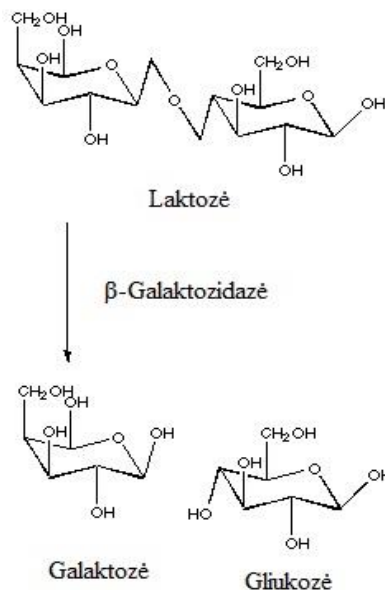
Kaliaus ląstelių *in vitro* gavimui, aukštesniųjų augalų įvairių organų audinių fragmentai dedami ant paruoštos mitybinės terpės į mėgintuvėlius, kolbas, Petri lėkšteles. Pirminio kaliaus gavimo procesas *in vitro* ir persodinamos kultūros kultivavimas reikalauja sterilių sąlygų, nes mikroorganizmų sporos pradeda vegetuoti po kelių persodinimų [23].

Kalius gali ilgai augti ir daugintis ant maitinamosios terpės, jei ji kas keletą savaičių keičiama nauja. Kalių, kaip purią ląstelių masę, galima skaidyti ir išskirstyti į daugelį dalių. Dažniausiai kaliaus ląstelės išlaiko tos rūšies augalui būdingus požymius bei savybes. Tačiau tai priklauso nuo kaliaus amžiaus, terpės sudėties ir kitų veiksnių.

Norint išauginti augalus iš kaliaus ląstelių, jos persodinamos į kitokios sudėties maitinamąsias terpes, kurios sužadina jų diferenciaciją ir organų susidarymą. Šie procesai labai priklauso nuo fitohormonų balanso terpėje. Kai terpėje daugiau auksinų, formuojasi šaknelės, o esant daugiau citokininų – viršūnių stiebeliai. Būtent šios dvi fitohormonų klasės (auksinai ir citokininai) laikomos svarbiausiomis augalų regeneracijos tyrimams audinių kultūroje. Kiti fitohormonai (giberelinai, etilenas, abscisinė rūgštis, poliaminai, jazmonatai) naudojami rečiau [24].

1.3. β -Galaktozidazė

β -Galaktozidazė yra fermentas, kuris hidrolizuoja D-galaktoziltransferazės polimerų likučius, oligosacharidus arba antrinius metabolitus [25]. β -Galaktozidazė hidrolizuoja β -1 \rightarrow 4 laktozės ryšį tarp D-galaktozės ir D-gliukozės [26].



3 pav. β -Galaktozidazės veikimas [27]

β -Galaktozidazė egzistuoja gana plačiame pH diapazone: fermentai iš grybų pH 2,5 – 5,4, mielių ir bakterijų fermentai veikia tarp pH 6,0 – 7,0. β -Galaktozidazės randama mikroorganizmuose (bakterijose, grybuose, mielėse), augaluose, ypač migdoluose, persikuose, abrikosuose, obuoliuose ir gyvūnų organuose. Taip pat aptinkama pupelėse, ridikėliuose, pupose, miežiuose, morkose, ryžių ūgliuose, lubinuose. β -Galaktozidazės yra augalų audiniuose. Šie fermentai dalyvauja tokiuose biologiniuose procesuose kaip augalų augimas, vaisių nokimas ir laktozės hidrolizė [25].

β -Galaktozidazė daugiausiai naudojama sūrio gamybai iš išrūgų. β -Galaktozidazė suteikia saldų skonį, kuris gali būti naudojamas kaip ledų, jogurto ir kitų pieno produktų priedas. Kitas β -galaktozidazės taikymas yra pieno produktų gamyba. Nemažai žmonių netoleruoja laktozės ir negali suvirškinti pieno arba pieno produktų. Pieno produktų gamyba be laktozės naudojant β -galaktozidazę suteikia galimybę žmonėms vartoti pieno produktus [28].

1.4. Bioaktyvūs junginiai

1.4.1. Chlorofilas ir karotinoidai

Chlorofilas *a* ir chlorofilas *b* yra esminiai pigmentai, gebantys šviesos energiją paversti į kaupiamą, cheminę energiją. Saulės radiacijos kiekis absorbuojamas lapuose. Be to, lapuose, esančio chlorofilo kiekis yra glaudžiai susijęs su augalo patiriamu stresu ir senėjimu [29].

Yra keletas chlorofilų: *a*, *b*, *c1*, *c2*, *d* ir bakterijose esantys chlorofilai. Chlorofilo *a* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) turi visi fotosintezėje dalyvaujantys augalai, chlorofilo *b* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) turi aukštesnieji augalai ir žaliadumbliai. Nors chlorofilų *a* ir *b* cheminė sudėtis yra labai panaši, vis dėlto jie skiriasi spalva, paplitimu ir atliekamomis funkcijomis.

Chlorofilas *a* yra melsvai žalias, chlorofilas *b* – gelsvai žalias. Itin paplitęs ir svarbesnis yra chlorofilas *a*. Be jo fotosintezė išvis nevyksta, todėl jo turi visi žalieji augalai. Paplitęs ir chlorofilas *b*, tačiau visuose augaluose jo yra mažiau nei chlorofilo *a*. Trims pastarojo molekulėms vidutiniškai tenka viena chlorofilo *b* molekulė, o kartais tas santykis gali siekti 5:1. Bendras chlorofilų *a* ir *b* kiekis yra nedidelis: jų daliai tenka mažiau nei 1 % sausosios lapų masės. Būdinga visų chlorofilų savybė yra ta, kad jie netirpsta vandenyje ir greitai pakinta veikiami šarmų bei rūgščių. Todėl, kad nepakistų chlorofilas, iš augalų jį reikia ekstrahuoti neutraliais organiniais tirpikliais – metanolium, etanolium, acetonom.

Svarbiausia chlorofilų savybė yra geba sugerti šviesos spindulius. Chlorofilai intensyviai sugeria violetinius ir mėlynuosius ($\lambda = 400 - 470$ nm) bei raudonuosius ($\lambda = 620 - 700$ nm) regimosios

šviesos spindulius, o kitų beveik nesugeria. Chlorofilų *a* ir *b* sugerties spektrai nesutampa. Skiriasi ir šių chlorofilų šviesos sugerties koeficientai: raudonuosius spindulius intensyviau sugeria chlorofilas *a*, mėlynuosius – chlorofilas *b* [30].

Lapų ekstrahavimas su organiniais tirpikliais ir spektrofotometrinis nustatymas tirpale yra reikalingas pigmentų analizei cheminiais metodais. Sukurti alternatyvūs, nedestrukciniai, optiniai metodai lapų pigmentų (chlorofilo, karotinoidų ir antocianinų) analizei. Šie naujesni metodai yra nebrangūs, greitai atliekami [29].

Karotinoidai yra natūralūs izoprenoidiniai pigmentai, suteikiantys lapams vaisiams, daržovėms ir gėlėms savitą geltoną, oranžinę, kartais rausvą spalvą, taip pat skirtingą aromatą augalams.

Karotinoidai yra komerciškai svarbūs žemės ūkiui, maisto, sveikatos ir kosmetikos pramonėje [31]. Jie svarbūs augalų dauginimuisi. Karotinoidai reikalingi ir fototropizmui, nes jautriausiai augalai reaguoja į to bangos ilgio (460 nm) šviesos spindulius, kuriuose intensyviausiai absorbuoja β - karotinas. Viena iš karotinoidų funkcijų – dalyvavimas fotosintezėje. Jie absorbuoja violetinius, mėlynus bei žaliuosius spindulius ir jų energiją perduoda chlorofilams. Didžiausią šios energijos dalį perduoda karotinų (bet ne ksantofilų) molekulės. Karotinai taip pat apsaugo chlorofilus nuo fotooksidacijos. Jau seniai buvo pastebėta, kad yra tiesioginis ryšys tarp chlorofilų irimo greičio saulės apšviestame ekstrakte ir karotinoidų kiekio jame [30].

1.4.2. Fenoliniai junginiai

Fenoliniai junginiai yra antriniai metabolitai, kurie yra pentozės fostato, šikimo rūgšties ir fenilpropanoidiniai dariniai augaluose. Šie junginiai atlieka didelę fiziologinę ir morfologinę svarbą augaluose. Struktūriškai fenolio junginiai sudaro aromatinį žiedą, turintį vieną arba daugiau hidroksilo pakaitų. Junginiai gali būti suskirstyti į keletą grupių (1 lentelė).

1 lentelė. Fenolinių junginių grupės augaluose

Grupės	Struktūra
Paprastieji fenoliai, benzochinonai	C ₆
Hidroksibenzenkarboksirūgštys	C ₆ -C ₁
Acetohinonai, fenilacto rūgštys	C ₆ -C ₂
Hidroksicinamono rūgštis, fenilpropanoidai (kumarinai, izokumarinai, chromonai, chromenai)	C ₆ -C ₃
Naftochinonai	C ₆ -C ₄
Ksantonai	C ₆ -C ₁ -C ₆
Antrochinonai	C ₆ -C ₂ -C ₆

1 lentelės tęsinys

Flavonoidai, izoflavonoidai	$C_6-C_3-C_6$
Lignanai, neolignanai	$(C_6-C_3)_2$
Bioflavonoidai	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninai	$(C_6-C_3)_n$
Kondensuoti taninai	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Iš jų, fenolio rūgštys, flavonoidai ir taninai yra laikomi pagrindiniais fenoliniais junginiais [32].

Fenoliniai junginiai pasižymi šiomis fiziologinėmis savybėmis: antialerginėmis, priešuždegiminėmis, antimikrobinėmis, antioksidacinėmis, antitrombinėmis ir kraujagysles plečiančiomis savybėmis.

Fenoliniai junginiai svarbūs augalų vystymuisi ir dauginimuisi. Jie kaip cheminiai signalai dalyvauja ląstelinių ir tarpląstelinių fiziologinių procesų valdyme, o kaip vaizdiniai signalai privilioja vabzdžius. Polifenoliai apsaugo augalus nuo įvairių patogeninių mikroorganizmų, žalingo UV-B spindulių poveikio ir oksidacinio streso. Fenolinių junginių gausu vaisiuose, daržovėse, gėrimuose ir kituose augalinės kilmės maisto produktuose. Fenolinių junginių antioksidantinis aktyvumas įrodytas daugybe *in vitro* tyrimų [33].

1.4.3. Antioksidantai ir jų charakteristika

Antioksidantai yra junginiai, kurie slopina arba atitolina kitų molekulių oksidaciją, slopindami inicijavimo arba skilimo grandines reakcijas. Yra dvi pagrindinės antioksidantų grupės - sintetiniai ir gamtiniai. Sintetinių antioksidacinių junginių fenolio struktūroje būna įvairūs alkilo grupės pakeitimai. Natūralūs antioksidantai gali būti fenolio junginiai (tokoferoliai, flavonoidai ir fenolio rūgštys), azoto junginiai (alkaloidai, chlorofilo dariniai, amino rūgštys ir aminai) arba karotinoidai taip pat askorbo rūgštis [34].

Laisvieji radikalai – tai chemiškai aktyvūs vienetai (atomas, molekulių grupė ar jonas), turintys neporinius elektronus išorinėje orbitalėje. Jie yra nestabilūs, trumpos gyvavimo trukmės ir dėl to dažniausiai veikia toje vietoje, kur susidaro. Kai kurie laisvieji radikalai, pavyzdžiui, vandenilio peroksidas ar azoto oksidas, yra stabilesni, todėl gali prasiskverbti per membraną ir pažeisti kitos ląstelės organeles. Laisvieji radikalai ląstelėje sukelia DNR grandinės trūkius, baltymų fragmentaciją, lipidų peroksidaciją. Jų reikšmė nustatyta daugelio ligų, tokių kaip cukrinis diabetas, miokardo infarktas, arterinė hipertenzija, katarakta ir kt., vystymosi patogenezėje. Su laisvųjų radikalų gamyba taip pat siejamas nutukimas bei senėjimas [35].

Veikiant natūralios aplinkos veiksniams bei sutrikus pusiausvyrai tarp laisvųjų radikalų susidaro organizme ir ten veikiančių apsauginių oksidantų sistemų, gali pasireikšti oksidacinis stresas, kuris skatina ligų atsiradimą. Oksidacinis stresas pasireiškia ligų metu, kurių patogenezėje dalyvauja laisvieji radikalai.

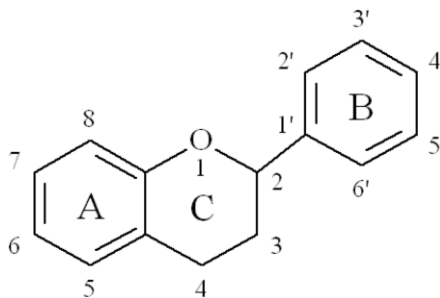
Antioksidantai vitaminas E, β -karotinas, vitaminas C ir kiti gali padėti sumažinti tikimybę sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, saugoti nuo oksidacinio streso. Natūralių augalinės kilmės antioksidantų buvimas taip pat įrodytas moksliniais tyrimais [36].

1.4.4. Flavonoidai

Augaluose randami virš keturių tūkstančių flavonoidų, remiantis $C_6-C_3-C_6$ sandara, kuri aptinkama augaluose ir yra suskirstyta į keletą klasių: antocianinai, flavonai, flavonoliai, flavanonai, dihidroflavonoliai, chalkonai, flavanai ir proantocianidinai, izoflavonoidai, biflavonoidai ir kiti.

Daug flavonoidų rūšių pasitaiko augaluose kartu su hidroksilu, metoksilu, metilo arba glikozilu. Kartais aromatinės ir alifatinės rūgštys, sulfatai, metilenodioksilas arba izoprenilo grupės taip pat prisideda prie flavonoidų branduolio ir jų glikozidų. Daugeliu atvejų flavonoidai yra randami gėlių vakuolėse, lapuose, stiebuose arba šaknyse [37].

Flavonoidai yra viena gausiausių ir svarbiausių polifenolinių junginių grupių, aptinkamų augaluose. Flavonoidų aglikono pagrindas yra $C_6-C_3-C_6$ struktūra, susidedanti iš dviejų aromatinių benzeno žiedų (A ir B žiedai) sujungtų trimis anglies atomais, per deguonies tiltelį suformuojančiais heterociklinį žiedą (C žiedas) (4 pav.)



4 pav. Flavonoidų struktūrinis pagrindas [38]

Daugelis tyrimų parodė, kad flavonoidai pasižymi biologiniu aktyvumu, t.y. antialerginėmis, antivirusinėmis, priešuždegiminėmis ir kraujagysles plečiančiomis savybėmis. Tačiau didžiausias dėmesys skiriamas flavonoidų antioksidaciniam aktyvumui, dėl jų gebėjimo sumažinti laisvųjų radikalų susidarymą [39].

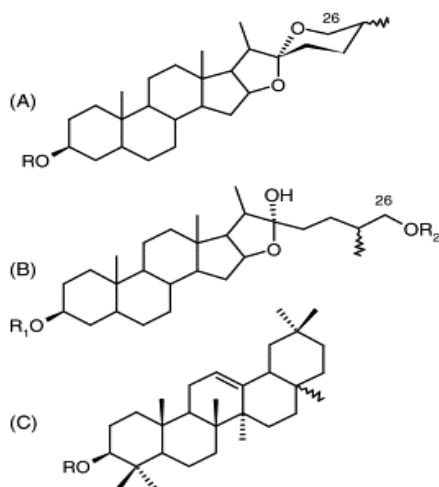
Flavonoidai yra augalų pigmentai, kurie yra susintetinti iš fenilalanino, dažniausiai suteikia spalvas gėlių žiedlapiams. Jie reguliuoja augalų augimą, indukciją ir genų ekspresiją. Flavonoidai yra pagrindiniai funkciniai komponentai daugeliui žolinių ir vabzdžių preparatų naudojamų medicinos tikslams, pavyzdžiui, propolio ir medaus, kurie buvo naudojami nuo seniausių laikų. Rekomenduojama flavonoidų paros dozė iš maisto, ypač vaisių ir daržovių, yra 1-2 g [40].

1.4.5. Saponinai

Saponinai yra svarbi augalų antrinių metabolitų grupė, kuri yra plačiai paplitusi augaluose. Saponinų pavadinimas yra kilęs iš lotynų kalbos žodžio „sapo“, kuris reiškia „muilas“. Jų molekules sudaro glikozilinti steroidai, steroidiniai alkaloidai ir triterpenoidai. Saponinų kiekis ir sudėtis gali ženkliai skirtis priklausomai nuo augalo genetinės sudėties, audinių tipo, amžiaus, fiziologinės būklės ir aplinkos veiksnių [41]. Daugelis turi farmakologinių savybių ir yra naudojami fitoterapijoje ir kosmetikos pramonėje.

Saponinai gali būti suskirstyti į dvi grupes pagal jų aglikoną. Pirmoji grupė susideda iš nesteroidinių saponinų, kurie yra beveik vien tik vienaskilčiuose gaubtasėkliuose augaluose. Antroji grupė susideda iš triterpenoido saponinų, kurie yra labiausiai paplitusi grupė ir daugiausiai aptinkama dviskilčiuose gaubtasėkliuose. Kai kurie autoriai išskiria ir trečią grupę, pavadintą steroidiniais aminais, kurie klasifikuojami pagal kitus kaip steroidiniai alkaloidai.

Steroidiniai saponinai susideda iš steroidinio aglikono, C_{27} spirostano skeleto, kuris paprastai sudarytas iš šešių žiedų struktūros (5 pav. A). Kai kuriais atvejais, šviežioje augalinėje žaliavoje hidroksilo grupė 26-oje padėtyje yra glikozidinis ryšys ir taip aglikono struktūra lieka pentaciklė. Tai vadinamasis furostano skeletas (5 pav. B). Triterpenoidiniai saponinai susideda iš triterpenoido aglikono, kuris susideda iš C_{30} skeleto, susidedančio iš pentaciklės struktūros (5 pav. C) [42].

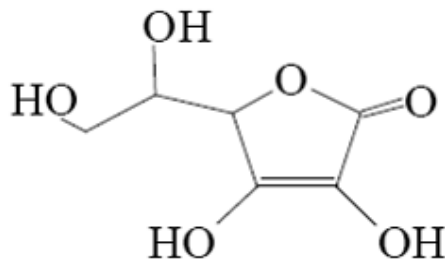


5 pav. Saponinų struktūra:

- (A) Aglikono skeletas steroidinis spirostanas, (B) steroidinis furostanas,
(C) triterpenoidiniai saponinai

1.4.6. Askorbo rūgštis

Askorbo rūgštis yra 2,3-dehidro-L-gulono rūgšties γ -laktonas, vitaminas C [43]. Cheminė formulė $C_6H_8O_6$. Natūralios formos vitaminas yra L - izomeras.



6 pav. Cheminė askorbo rūgšties struktūra [44]

Askorbo rūgštis yra stiprus antioksidantas, nes ji gali atiduoti vandenilio atomą ir susidaro santykinai stabilūs askorbilo laisvieji radikalai. Askorbo rūgštis palengvina geležies absorbciją [45].

Askorbo rūgšties aptinkama augalų audiniuose. Ji fotosintezės metu funkcionuoja kaip fermentų kofaktorių (įskaitant etileno, giberelinų ir antocianinų sintezę) ir kontroliuoja ląstelių augimą [46].

Askorbo rūgštis atsakinga už hormonų, neurotransmiterių sintetinimą ir tam tikrų aminorūgščių ir vitaminų metabolizmą. Dalyvauja toksinių medžiagų detoksikacijoje. Askorbo rūgštis kaip antioksidantas reaguoja su histaminu ir peroksidu sumažindama uždegimo simptomus. Jos antioksidacinės savybės yra susijusios su vėžio rizikos sumažinimu.

Nors yra daug vitamino C funkcijų, jo vaidmuo sveikatai daugiausiai minimas atsižvelgiant į jo antioksidacines savybes ir poveikį kovai prieš vėžį, kraujo spaudimą, imunitetą, vaistų metabolizmo ir išsiskyrimą su šlapimu iš hidroksiprolino [47].

Askorbo rūgštis daugiausia yra uogose (ypač erškėčių, juodųjų serbentų), citrusuose, kopūstuose [48].

2. METODINĖ DALIS

Tyrimai atlikti Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Organinės chemijos katedros Biotechnologijos laboratorijoje.

2.1. Tiriamoji medžiaga

Tiriamoji medžiaga – Lietuvoje išvestos liucernos veislės:

Antanė (Medicago sativa L.),

Birutė (Medicago varia Martyn),

Malvina (Medicago sativa L.),

Žydrūnė (Medicago varia Martyn), kurios buvo gautos iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės instituto.

Tyrimams taip pat naudotos Lietuvoje išvestos lubinų veislės ir hibridiniai lubinai:

VB Vilniai - siauralapiai, pašariniai lubinai,

VB Derliai – siauralapiai, sideraciniai (kartieji) lubinai,

hibridiniai – siauralapiai, sideraciniai, determinantiniai lubinai,

Trakiai – geltonžiedžiai, pašariniai lubinai. Šių lubinų sėklos buvo gautos iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Vokės filialo.

2.2. Augalų ląstelių maitinamoji terpė

Augalų ląstelių kultūros kultivavimui būtina maitinamoji terpė ir išorinės aplinkos faktoriai (šviesa, temperatūra). Kultivuojant augalų ląsteles *in vitro* maitinamoji terpė buvo sudaryta iš šių komponentų: makroelementai, mikroelementai, geležies šaltinis, organiniai priedai, anglies šaltinis, augimo hormonai.

Eksperimento metu naudotos MS (Murashige & Skoog) terpės sudėtis (2 lentelė). Svarbus šios terpės bruožas yra aukštos nitratų, kalio ir amonio jonų koncentracijos. Sudėtyje yra mioinozitolis, nikotino rūgštis, piridoksino hidrochloridas (B₆) ir tiamino hidrochloridas (B₁).

2 lentelė. Maitinamosios Murashige & Shoog (MS) terpės sudėtis [49]

Reagentai	Koncentracija tirpale mg/l	Koncentracija terpėje
Makroelementai		
NH ₄ NO ₃	33000	1650

2 lentelės tęsinys

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		
KJ	166	0,83
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Anglies šaltinis		
Sacharozė	Dedama kietu pavidalu	30000
Agar-agaras		5

Eksperimento metu optimali kultivavimo temperatūra 20 – 22 °C, fotoperiodas – 24 valandos.

3 lentelė. MS terpės reagentų kiekis, paimtas iš pradinių tirpalų

Reagentai	Reagentų kiekiai reikalingi 1 l terpės
Makro druskos	50 ml
Mikro druskos	5 ml
Fe-EDTA	5 ml
Sacharozė	30 g
Agaras	5 g
Organiniai priedai	4 ml

2.3. Liucernų (*Medicago*) sėklų ir kaliaus kultūrų sterilinimas ir daiginimas

Atliekant tyrimą liucernų sėklos sterilizuotos:

2 min 75 % C₂H₅OH;

15 min mirkant 0,14 % HgCl₂ tirpale;

3 kartus praplautos steriliu distiliuotu vandeniu.

Darbas buvo atliktas aseptinėmis sąlygomis laminare „TELSTAR BV-100“. Sterilintos liucernos (*Medicago L.*) sėklos pasodintos į Murashige-Skoog (MS) agarizuotą maitinamąją terpę (*pH* = 5,7) laminare. Laminaras dezinfekuotas 15 min ultravioletiniais spinduliais bei valytas 70 % C₂H₅OH. Daiginta visą parą apšviestoje aplinkoje, esant 20–22 °C temperatūrai. Liucernos (*Medicago L.*) sudygo po 7 dienų.

Išskaidytos liucernos (*Medicago L.*) dalys, t. y. stiebeliai, šaknys ir hipokotiliai pasodintos į *Petri* lėkšteles. Liucernos kaliaus kultūra *in vitro* auginta maitinamose terpėse:

1. MS su 2,4-dichlorofenoksiacto rūgštimi (2,4-D) (2 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l) (MS1) [50];
2. MS su 6-benzilaminopurinu (BAP) (0,5 mg/l), 1-naftilacto rūgštimi (NAR) (0,05 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l) (MS2).

Tolimesniems tyrimams buvo atrinkta maitinamoji terpė MS su 2,4-dichlorofenoksiacto rūgštimi (2,4-D) (2 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l).

Siekiant suformuoti liucernų veislės *Birutė* kaliaus kultūrą išbandyti 9 sterilinimo būdai:

1 sterilinimo būdas:

1) 2 min 75 % C₂H₅OH;

2) 15 min 0,14 % HgCl₂;

3) 3 kartus praplauta steriliu distiliuotu vandeniu.

2 sterilinimo būdas:

- 1) 15 s 75 % C_2H_5OH ;
- 2) 5 min 5 % „ACE”;
- 3) 3 kartus praplauta steriliu distiliuotu vandeniu.

3 sterilinimo būdas:

- 1) 10 min 0,1 % $HgCl_2$;
- 2) 5 min 6 % H_2O_2 ;
- 3) 3 kartus praplauta steriliu distiliuotu vandeniu.

4 sterilinimo būdas:

- 1) 3 min 70 % C_2H_5OH ;
- 2) 10 min 10 % $NaClO$;
- 3) 3 kartus praplauta steriliu distiliuotu vandeniu.

5 sterilinimo būdas:

- 1) 2 s 70 % C_2H_5OH ;
- 2) 20 min 1 % $AgNO_3$;
- 3) 3 kartus praplauta steriliu distiliuotu vandeniu.

6 sterilinimo būdas:

- 1) 3 min 50 % „ACE”;
- 2) 2 min 75 % C_2H_5OH ;
- 3) 3 kartus praplauta steriliu distiliuotu vandeniu.

7 sterilinimo būdas:

- 1) 2 val. mirkyta steriliame distiliuotame vandenyje;
- 2) 5 min 1 % $HgCl_2$;
- 3) skalauta 10 % ploviklyje;
- 4) 30 s 70 % C_2H_5OH ;
- 5) 20 min 10 % $NaClO$;
- 6) 3 kartus praplauta steriliu, distiliuotu vandeniu;
- 7) 40 min 0,1 % $KMnO_4$.

8 sterilinimo būdas:

- 1) 24 val. mirkyta steriliame distiliuotame vandenyje;
- 2) 5 min 1 % HgCl₂;
- 3) skalaujama 10 % ploviklyje;
- 4) 2 min 70 % C₂H₅OH;
- 5) 10 min 20 % NaClO;
- 6) 3 kartus praplauta steriliu, distiliuotu vandeniu;
- 7) 40 min 0,1 % KMnO₄.

9 sterilinimo būdas:

- 1) 30 s 70 % C₂H₅OH;
- 2) 5 min 15 % NaClO;
- 3) 3 kartus praplauta steriliu distiliuotu vandeniu.

Kaliaus kultūra (iš stiebelių, hipokotilių ir šaknų) susiformavo po 30 dienų [51]. Nustatyta, kad liucernos veislė *Birutė* neformavo kaliaus kultūros *in vitro*.

2.4. Lubinų (*Lupinus*) sėklų sterilinimas ir daiginimas

Atliekant tyrimą lubinų sėklos sterilizuotos:

- 30 sek. 70 % C₂H₅OH;
- 10 min mirkyta 10 % NaClO;
- 3 kartus praplaunant steriliu distiliuotu vandeniu.

Darbas buvo atliktas aseptinėmis sąlygomis laminare „TELSTAR BV-100“. Sterilintos lubinų (*Lupinus*) sėklos pasodintos į standartinę Murashige-Skoog (MS) agarizuotą maitinamąją terpę (*pH*= 5,7) laminare. Laminaras dezinfekuotas 15 min ultravioletiniais spinduliais bei valytas 70 % C₂H₅OH. Daiginta visą parą apšviestoje aplinkoje, esant 20–22 °C temperatūrai. Lubinai (*Lupinus*) sudygo po 7 dienų.

Statistinis rezultatų įvertinimas. Gauti tyrimų duomenys buvo pakartoti tris kartus, statistiškai apdoroti ir įvertinti, skaičiuojant standartinę vidurkio paklaidą [52].

Chlorofilas *a*, chlorofilas *b* bei karotinoidai buvo nustatyti po 7 ir 14 dienų lubinuose, išaugintuose *in vitro* MS terpėje. Biocheminiams tyrimams, išskyrus chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekių nustatymą, buvo panaudota sausa išdžiovinta medžiaga (45 °C temperatūroje, 3 val.)

2.5. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas tiriamuosiuose augaluose

Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas augalų audiniuose paremtas optinio tankio nustatymu spektrofotometru, esant bangos ilgiams:

Chlorofilui *a* (662 nm);

Chlorofilui *b* (644 nm);

Karotinoidams (441 nm).

Chlorofilo *a* ir *b* kiekio nustatymui 1 g augalų lapų buvo susmulkinti grūstuvėlyje. Įpilta 15 ml 70 % C₂H₅OH, sumaišyta iki vientisos masės ir filtruota. Pigmentų išskyrimas vykdytas etanoliu tol, kol filtratas prašviesėja. Nufiltruoto ekstrakto tūris (30–40 ml) išmatuotas cilindru. Vėliau ekstraktai praskiesti etanoliu tol, kol optinis tankis praskiestų tirpalų būtų nuo 0,1 iki 0,8. Filtratas supiltas į matavimo kiuvetę ir matavimai atlikti spektrofotometru, esant 662 nm (chlorofilo *a*), 644 nm (chlorofilo *b*) ir 441 nm (karotinoidams) bangų ilgiams.

Pigmentų koncentracija (mg·l⁻¹) apskaičiuojama pagal formules:

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

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg} \cdot \text{l}^{-1}\text{): } C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662}; \quad (2)$$

$$C_a + C_b = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644}; \quad (3)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija (mg} \cdot \text{l}^{-1}\text{) } C_{\text{karotinoidai}} = 4,695 \cdot D_{441} - 0,268 \cdot (C_a + C_b); \quad (4)$$

Pigmentų kiekis mg/100g apskaičiuotas pagal formulę:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000} \quad (5)$$

Čia:

C – pigmentų koncentracija, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, paimtas praskiedimui, ml;

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g [53].

2.6. Baltymų ekstrakcija iš augalų

Augalinė medžiaga išdžiovinta, pasverta 0,05 g ir panaudojant buferius išekstrahuoti baltymai. Augalinė medžiaga buvo užpilta buferiais ir maišyta vieną valandą bei po to nucentrifuguota 9000 aps/min 20 min 4 °C. Baltymų kiekis apskaičiuotas iš kalibravimo kreivės.

Baltymų ekstrakcijai naudoti buferiai:

4 lentelė. Baltymų ekstrakcijai naudotų buferinių tirpalų sudėtis

Eil. Nr.	Baltymų ekstrakcijai naudojamo buferio sudėtis	Buferinio tirpalo pH
1.	0,1 M glicinas – HCl;	2,6
2.	0,1 M CH ₃ COONa, 9 ml; 0,1 M CH ₃ COOH, 85 ml;	4,0
3.	0,1 M CH ₃ COONa, 57 ml; 0,1 M CH ₃ COOH, 5 ml;	6,0
4.	0,1 M Tris-(hidroksimetil)-aminometanas – HCl;	8,0
5.	0,1 M natrio boratas.	10,0

Visi turi 0,15 M NaCl.

Kiekvieno buferio buvo paimta po 2 ml, po centrifugavimo paimta 100 µl ekstrakto, pridėta Bradfordo reagento (2,5 ml). Po 2 minučių buvo išmatuotas optinis tankis esant 595 nm bangos ilgiui. Baltymų kiekis buvo apskaičiuotas iš kalibravimo kreivės.

Bendras baltymų kiekis X (mg/100mg) apskaičiuotas pagal formulę:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1} \quad (6)$$

Čia:

a – baltymo koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V_1 – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg [54].

2.7. Askorbo rūgšties kiekybinis nustatymas

Askorbo rūgšties koncentracija tirpale gali būti nustatyta daugeliu metodu, labiausiai paplitę yra titravimo su oksiduojančių agentu metodai. Tam gali būti naudojamas jodas, jodatas, rečiau N-bromosukcinimidas [53].

Vitamino C nustatymui buvo pasirinktas metodas, kurio metu askorbo rūgštis reaguotų su 2,6-dichlorofenolindofenolio natrio druskos hidratu (DCIP, DPIP). Metodas pagrįstas askorbo rūgšties savybe redukuoti mėlynos spalvos dažą 2,6-dichlorfenolindofenolį.

Į grūstuvę buvo sudėta nedžiovinta žaliava, kuri užpilta 10 ml druskos rūgšties ir viskas gerai sutrinta, pripilta dar 40 ml rūgšties, viskas sumaišyta ir filtruota 10 ml filtrato įpilta į 50 ml tūrio konusinę kolbą ir titruota 0,001 N 2,6-dichlorfenolindofenoliu, kol mėginys nusidažė šviesiai rausva spalva. Titruota tris kartus ir išvedamas vidurkis [55].

2.8. Flavonoidų kiekio nustatymas

Į apvaliadugnę kolbą įberta 2 g susmulkintos augalinės medžiagos, įpilta 20 ml acetono, 2 ml 28 % HCl tirpalo ir virinta 30 min su grįžtamuju šaldytuvu ant verdančios vandens vonelės. Atvėsęs hidrolizatas filtruotas į 100 ml talpos matavimo kolbą. Nuosėdos gražintos į kolbą, užpilta 20 ml acetono ir 10 min virinta ant vandens vonios, po to filtruota į tą pačią matavimo kolbą, acetonu papildyta iki brūkšnio. 20 ml ekstrakto praskiesta 20 ml vandens ir ekstrahuota etilo acetatu: 1 kartą – 15 ml ir 3 kartus po 10 ml. Sujungtos viršutinės organinės fazės 2 kartus praplautos po 40 ml vandens, filtruota į 50 ml matavimo kolbą ir skiesta etilo acetatu iki brūkšnio.

Tiriamasis tirpalas:

Į 10,0 ml pagrindinio tirpalo įpilta 2 ml aliuminio chlorido (20 g/l) tirpalo ir papildyta acto rūgšties ir metanolio mišiniu (1:19) iki 25 ml.

Palyginamasis tirpalas:

10,0 ml pagrindinio tirpalo skiesta tuo pačiu acto rūgšties ir metanolio mišiniu iki 25 ml. Po 30 min išmatuota tirpalo šviesos sugertis, kai bangos ilgis 426 nm, naudojant palyginamąjį tirpalą. Nustatytas flavonoidų kiekis (X, %) apskaičiuotas hiperozidui pagal formulę:

$$X = \frac{A \cdot k}{m} \quad (7)$$

Čia:

A – tiriamojo tirpalo šviesos sugertis;

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

m – augalinės žaliavos masė, g [53].

2.9. Bendras fenolinių junginių nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Sausa, susmulkinta augalinė medžiaga (0,05 g) pasverta ir į mėgintuvėlį su ja įpilta 10 ml acetono (70 %) ir maišyta termostatuojamajame kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Vėliau centrifuguota 10 min 9000 aps 4 °C. Supernatantas surinktas ir laikytas ant ledo.

Kalibravimo kreivės parengimas. Paimta 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo, vėliau pridėta distiliuoto vandens, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų 500 µl. Į šį tirpalą pridėta 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišyta ir inkubuota kambario temperatūroje tamsoje. Po 40 min išmatuota absorbcija prieš tuščią mėginį.

Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas

Paimta paruošto ekstrakto ir praskiesta vandeniui iki 500 µl. Pridėta į jį 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir tada įpilta 1,25 ml natrio karbonato tirpalo. Sumaišyta ir matuota šviesos sugertis tirpalo, esant 725 nm po 40 min. laikymo tamsoje. Apskaičiuotas bendras fenolių kiekis pagal tanino rūgštį (pagal kalibravimo kreivę). Bendras fenolių kiekis mg/100mg apskaičiuotas iš formulės:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1} \quad (8)$$

Čia:

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

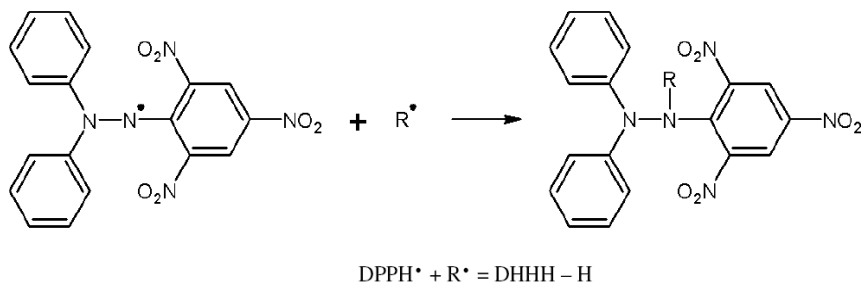
V – pradinis ekstrakto tūris ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

n – augalinė masė, mg [56].

2.10. Antioksidacinis aktyvumas prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą

Augalų ekstraktų antiradikalinis aktyvumas įvertintas matuojant, kiek procentų stabilaus DPPH radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai.



7 pav. Radikalo DPPH•redukcijos reakcija su antioksidantu

Fenoliniams junginiams būdingas antioksidacinis aktyvumas dėl jų gebėjimo išaktyvinti laisvuosius radikalus. Reakcijos metu (7 pav.) antioksidantas atiduoda vandenilį, išaktyvina laisvuosius radikalus ir jie tampa stabiliais DHHP – H tipo junginiais.

1 g susmulkintos augalinės žaliavos užpilta 10 ml metanolio ir homogenizuota 10 min. Homogenatas centrifuguotas 9000 aps/min 10 minučių ir supernatantas buvo surinktas.

Tiriamasis tirpalas paruoštas į mėgintuvėlį įpilant 0,077 ml paruošto ekstrakto, 3 ml DPPH etaloninio tirpalo.

Mėgintuvėlio turinys sumaišytas ir po 15 min laikymo tamsoje pamatuotas tirpalo optinis tankis prie 515 nm bangos ilgio.

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

Etaloninis DPPH tirpalas paruoštas 0,0024 g DPPH radikalo tirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolbutėje. Slopinimas apskaičiuotas pagal formulę

$$\text{slopinimas, \%} = \frac{A_B - A_A}{A_B} \cdot 100 \% \quad (9)$$

Čia:

A_B – palyginamojo tirpalo absorbcijos dydis;

A_A -tiramajo tirpalo absorbcijos dydis [57].

2.11. Saponinų kokybinis nustatymas

1 g susmulkintos augalinės medžiagos užpilta 50 ml vandens, virta 10 min ir perfiltruota. Atliekamos kokybinės reakcijos:

1. Imami du mėgintuvėliai, į vieną įpilta 5 ml 0,1 N HCl, į kitą 5 ml 0,1 N NaOH. Į abu mėgintuvėlius įlašinami 2-3 lašai saponino tirpalo ir stipriai sumaišyti. Turi susidaryti putos.
2. Į 2 ml vandeninio ekstrakto įpilta keletą lašų 10 % švino acetato. Susidaro nuosėdos.
3. Į 2 ml vandeninio ekstrakto įpilta 1 ml konc. H₂SO₄, 1 ml etanolio ir 1 lašas 10 % geležies sulfato. Kaitinant atsiranda mėlynai-žalia spalva.
4. Į 2 ml ekstrakto įpilta 1 ml 10 % natrio nitrato tirpalo ir vienas lašas konc. H₂SO₄. Atsiranda raudona spalva [56].

2.12. β-Galaktozidazės enziminis įvertinimas

1 g pavydžio susmulkinta ir ekstrahuota šaltame ekstrakcijos buferyje, turinčiame 0,1 M natrio citrato pH 4,6 1 M natrio chlorido, 13 mM etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), 1 % polivinilpirolidonas-10 (PVP-10) ir 100 μg/ml fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), kuris įdėtas santykiu 5 ml per vieną gramą svorio. Pavyzdžiai yra laikomi lede, pastoviai maišant ir centrifuguojant 9000 rpm 20 min 4 °C. Supernatantai, turintys β-galaktozidazę laikyti –20 °C.

Kiekvieno buferio imta po 2 ml, po centrifugavimo paimta 100 μl ekstrakto, pridėta Bradfordo reagento (2,5 ml). Po 2 minučių matuotas optinis tankis esant 595 nm bangos ilgiui. Baltymų kiekis apskaičiuotas iš kalibravimo kreivės.

Bendras baltymų kiekis X (mg/100mg) apskaičiuotas pagal formulę:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n \cdot V_1} \quad (10)$$

Čia:

a – baltymo koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V_1 – pradinis ekstrakti tūris, ml, paimtas praskiedimui;

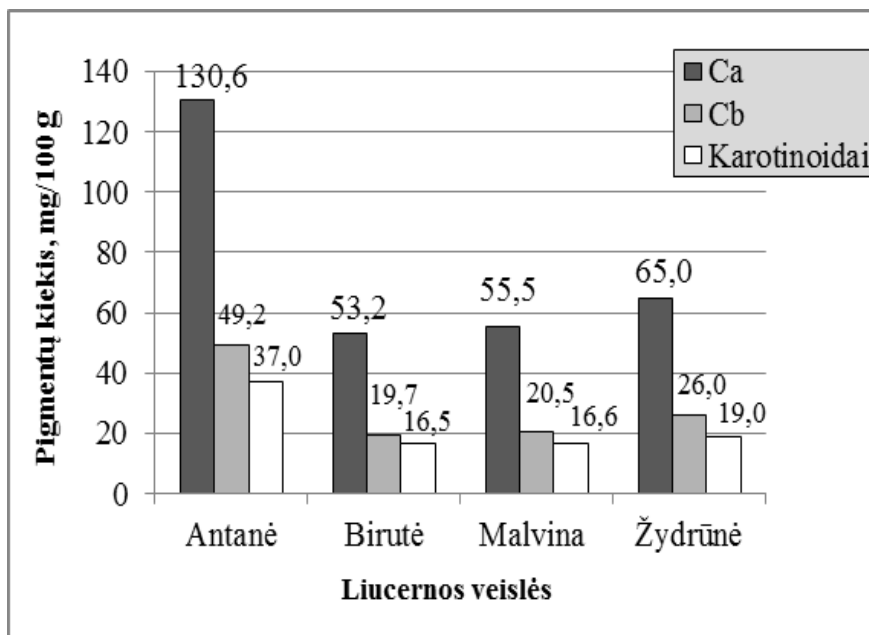
n – augalinė masė, mg [54].

Bandymui yra sunaudota 20 μg bendro tirpaus baltymo kiekio. Ekstraktai inkubuoti su 13 mM 4-nitrofenil-β-D-galaktopiranozidu (PNPG) 37 °C 30 min, šviesos sugertis išmatuota esant 405 nm. Standartinė kreivė gauta skiedžiant 2 kartus 50 mM p-nitrofenolį [58].

3. REZULTATAI IR JŲ APITARIMAS

3.1. Chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekio įvertinimas liucernose

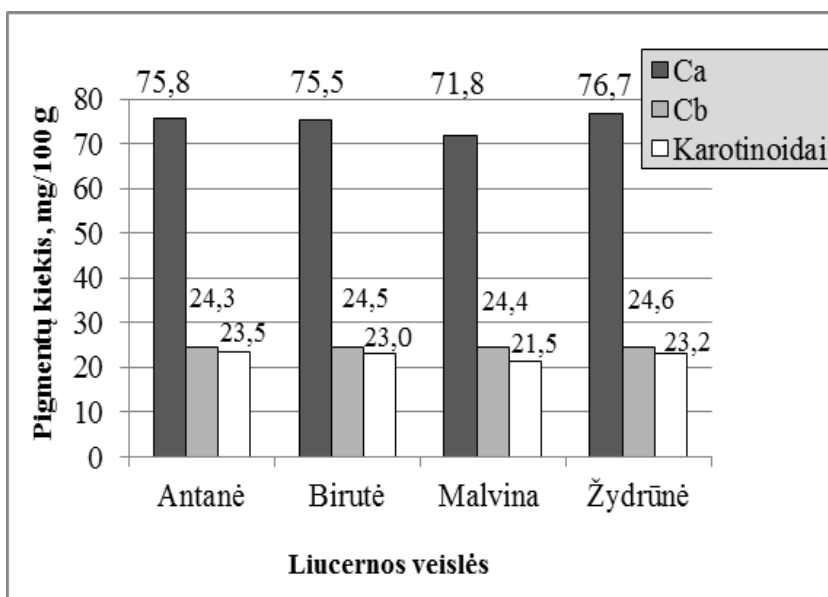
Pigmentų (chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų) kiekiams nustatyti buvo naudojami liucernų daigai, išauginti maitinamojoje MS terpėje (pH = 5,7) (8 pav.).



8 pav. Pigmentų kiekis skirtingų veislių liucernose *in vitro* po 7 dienų:

Ca – chlorofilas *a*, Cb – chlorofilas *b*

Iš gautų rezultatų (8 pav.) matyti, kad po 7 dienų liucernų auginimo didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo nustatytas liucernose *Antanė*, išaugintose *in vitro* MS terpėje ($130,6 \pm 0,06$ mg/100 g), mažiausias *Birutė* – ($71,8 \pm 0,08$ mg/100 g). Didžiausias chlorofilo *b* kiekis buvo įvertintas liucernose *Antanė* ($49,2 \pm 0,06$ mg/100 g), didžiausias karotinoidų kiekis - veislėje *Antanė* ($37,0 \pm 0,08$ mg/100 g), išaugintose *in vitro* MS terpėje.



9 pav. Pigmentų kiekis skirtingų veislių liucernose *in vitro* po 14 dienų:

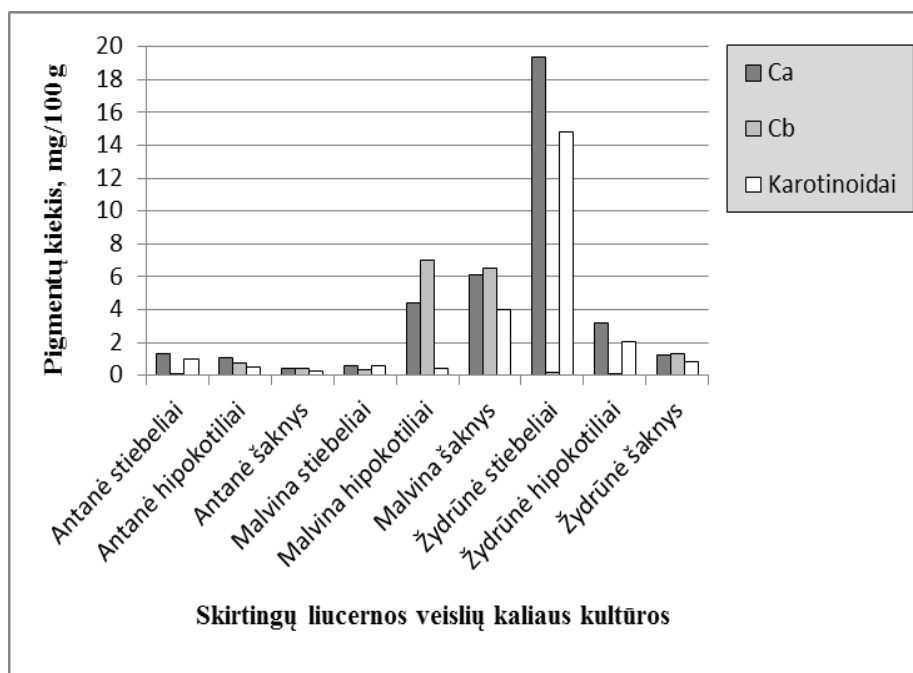
Ca – chlorofilas *a*, Cb – chlorofilas *b*

Iš gautų rezultatų (9 pav.) matyti, kad po 14 dienų liucernų auginimo didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo nustatytas liucernose *Žydrūnė*, išaugintose *in vitro* MS terpėje ($76,7 \pm 0,06$ mg/100 g), mažiausias *Malvina* – ($71,8 \pm 0,08$ mg/100 g). Didžiausias chlorofilo *b* kiekis buvo įvertintas liucernose *Žydrūnė* ($24,6 \pm 0,06$ mg/100 g), didžiausias karotinoidų kiekis - veislėje *Antanė* ($23,5 \pm 0,08$ mg/100 g), išaugintose *in vitro* MS terpėje.

3.2. Chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų įvertinimas liucernos kaliaus kultūroje

Pigmentai taip pat buvo nustatyti liucernos kaliaus kultūrose po 30 dienų, suformuotose *in vitro* MS terpėje su 2,4-dichlorofenoksiacto rūgštimi (2,4-D) (2 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l).

Tyrimo rezultatai parodė (10 pav.), kad didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo nustatytas liucernų *Žydrūnė* kaliaus kultūrose iš stiebelių ($19,4 \pm 0,18$ mg/100 g), mažiausias – veislėje *Antanė* kultūrose iš šaknų ($0,4 \pm 0,01$ mg/100 g), t. y. jo kiekis buvo 19 mg mažesnis nei veislėje *Žydrūnė*.



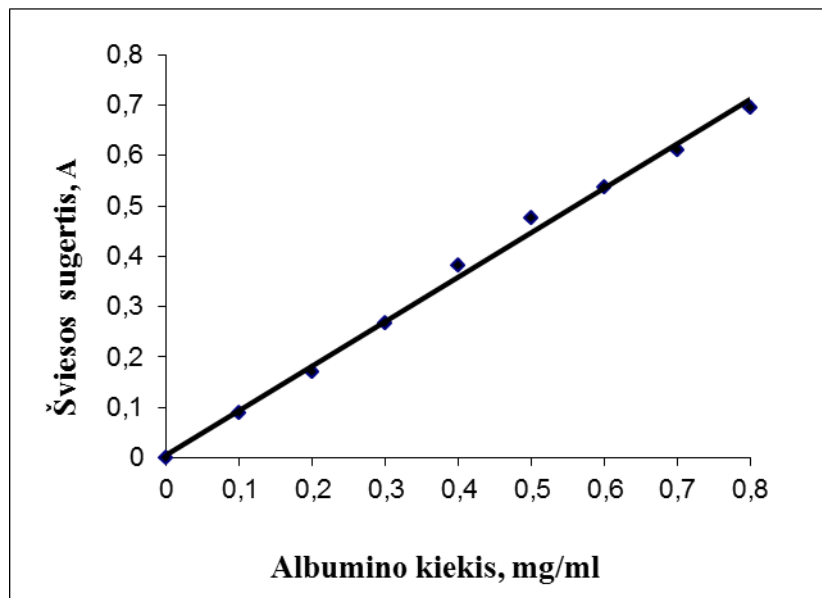
10 pav. Pigmentų kiekis skirtingų veislių liucernos kaliaus kultūrose

Didžiausias chlorofilo *b* kiekis nustatytas liucernų *Malvina* kaliaus kultūrose iš hipokotilių ($7,00 \pm 0,05$ mg/100 g), o mažiausias - *Žydrūnė* kaliaus kultūrose iš hipokotilių ($0,07 \pm 0,02$ mg/100 g), t. y. jo kiekis buvo 6,93 mg mažesnis nei *Malvina* kaliaus kultūrose. Didžiausias karotinoidų kiekis buvo gautas veislėje *Žydrūnė* kaliaus kultūrose iš stiebelių ($14,8 \pm 0,01$ mg/100 g), o mažiausias karotinoidų kiekis – *Antanė* kaliaus kultūrose iš šaknų ($0,3 \pm 0,07$ mg/100 g), t.y. jų kiekis buvo 14,5 mg mažiau nei *Žydrūnėje*.

Liucernos daigai pasižymėjo didesniu pigmentų (chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų) kiekiu nei liucernos kaliaus kultūros. Didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo įvertintas veislėje *Žydrūnė*, išaugintose *in vitro* *Murashige-Skoog* (MS) terpėje, kuris buvo 4 kartus didesnis, palyginus su kaliaus kultūromis iš stiebelių veislėje *Žydrūnė*.

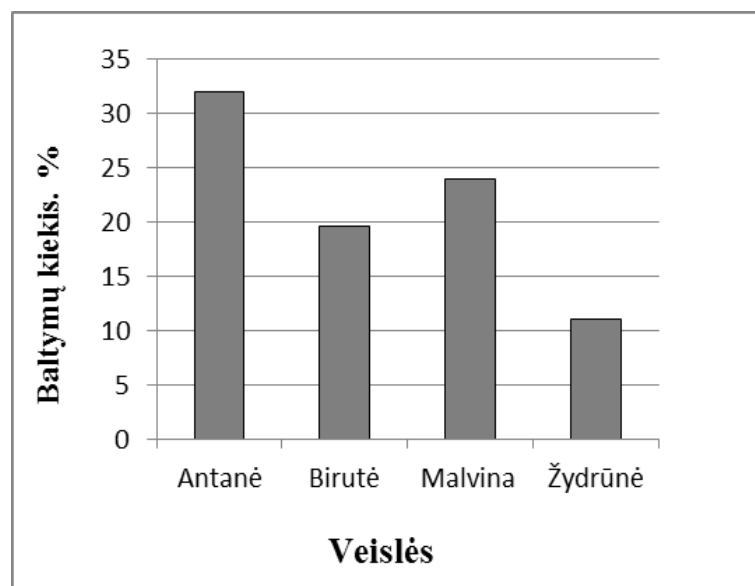
3.3. Baltymų kiekio įvertinimas liucernose, augintose MS terpėse *in vitro*

Pirmiausia nubraižyta kalibracinė kreivė, pagal kurią buvo apskaičiuotas bendrasis albumino kiekis. Paruošti kalibracinei kreivei buvo paimta 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μ l standartinio albumino tirpalo (1 mg/ml) ir išmatuota šviesos sugertis. Sudaryta kalibracinė kreivė (11 pav.).



11 pav. Kalibracinė kreivė albumino kiekio nustatymui

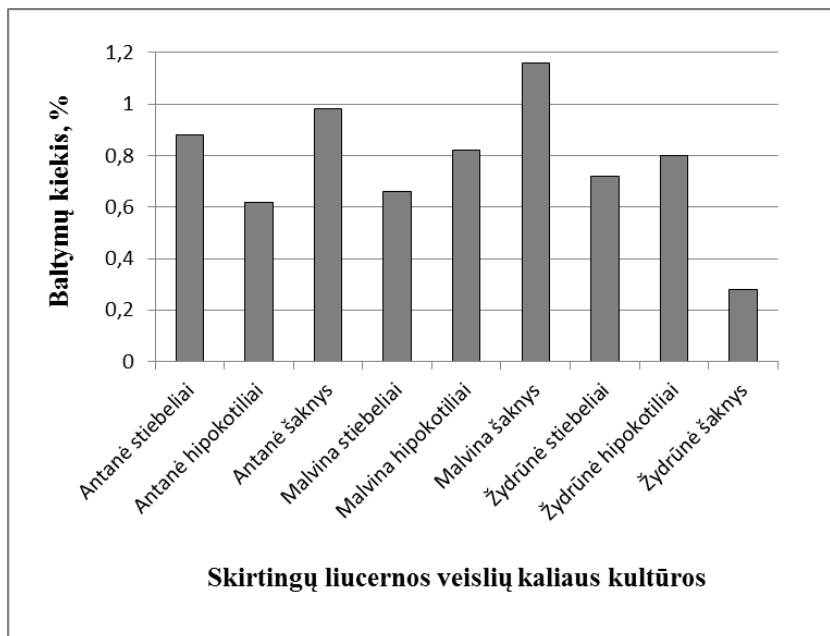
Naudojantis kalibracine kreive (11 pav.) apskaičiuotas albumino kiekis (12 pav.).



12 pav. Baltymų kiekis skirtingose liucernos veislėse

Iš gautų rezultatų matyti (12 pav.), kad didžiausias baltymų kiekis buvo nustatytas liucernose *Antanė*, išaugintose MS terpėje ($32 \pm 0,7$ %), o mažiausias - veislėje *Žydrūnė* ($11 \pm 0,05$ %), t. y. jų kiekis buvo 3 kartus mažesnis nei veislėje *Antanė*. Iš literatūros yra žinoma, kad liucernose yra 15 – 22 % žaliųjų baltymų [49].

3.4. Baltymų kiekio įvertinimas liucernų kaliaus kultūrose, augintose MS terpėse *in vitro*

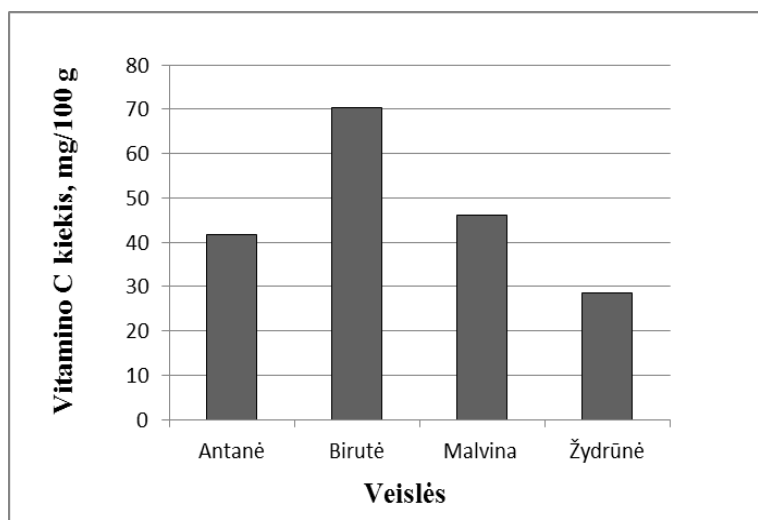


13 pav. Baltymų kiekis skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrose

Iš rezultatų (13 pav.) matyti, kad didžiausi baltymų kiekiai kaliaus kultūrose buvo nustatyti iš stiebelių ($0,88 \pm 0,09$ %) veislėje *Antanė*, iš hipokotilių ($0,82 \pm 0,06$ %) ir iš šaknų ($1,16 \pm 0,05$ %) veislėje *Malvina*.

Gauti rezultatai (12 – 13 pav.) parodė, kad liucernos daigai *in vitro* kaupė gerokai daugiau baltymų nei kaliaus kultūros.

3.5. Askorbo rūgšties kiekio įvertinimas liucernose, augintose MS terpėse *in vitro*

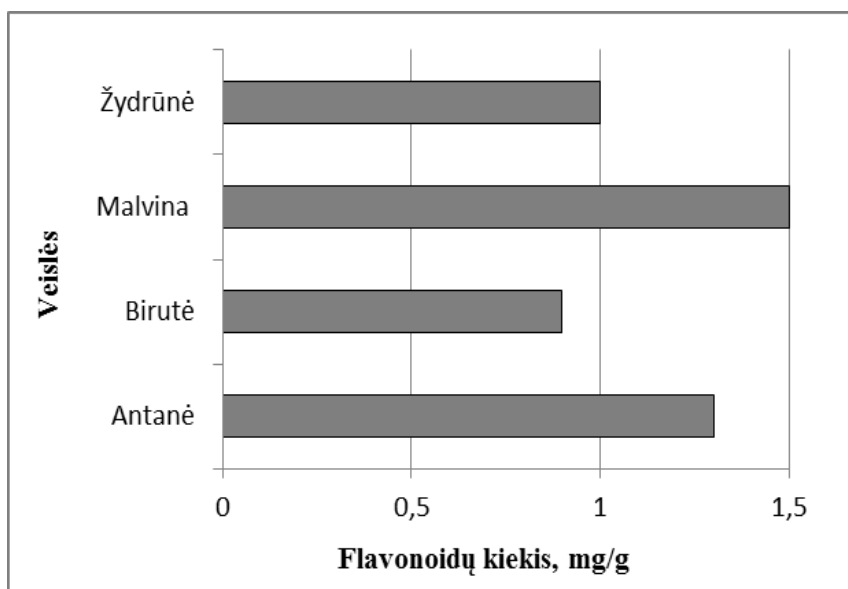


14 pav. Askorbo rūgšties kiekis skirtingų veislių liucernose

Iš gautų rezultatų nustatyta (14 pav.), kad didžiausias askorbo rūgšties kiekis buvo rastas liucernose *Birutė* ($70,4 \pm 0,01$ mg/100 g), o mažiausias - veislėje *Žydrūnė* ($28,6 \pm 0,01$ mg/100 g), t. y. jos kiekis buvo 41,8 mg mažesnis nei veislėje *Birutė*.

3.6. Flavonoidų kiekio nustatymas skirtingose liucernos veislėse

Flavonoidų kiekis liucernose buvo nustatytas pagal hiperozidą [53].

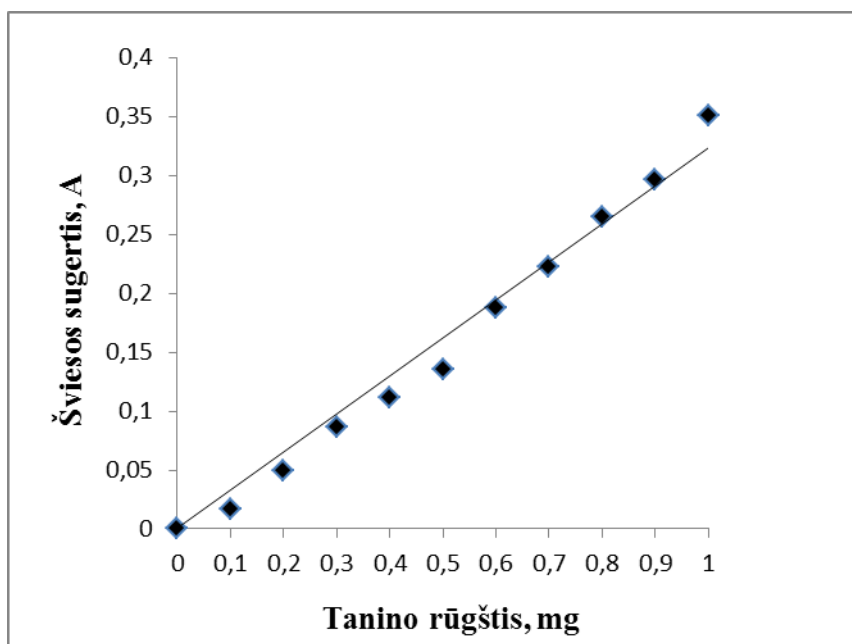


15 pav. Flavonoidų kiekio įvertinimas skirtingose liucernos veislėse

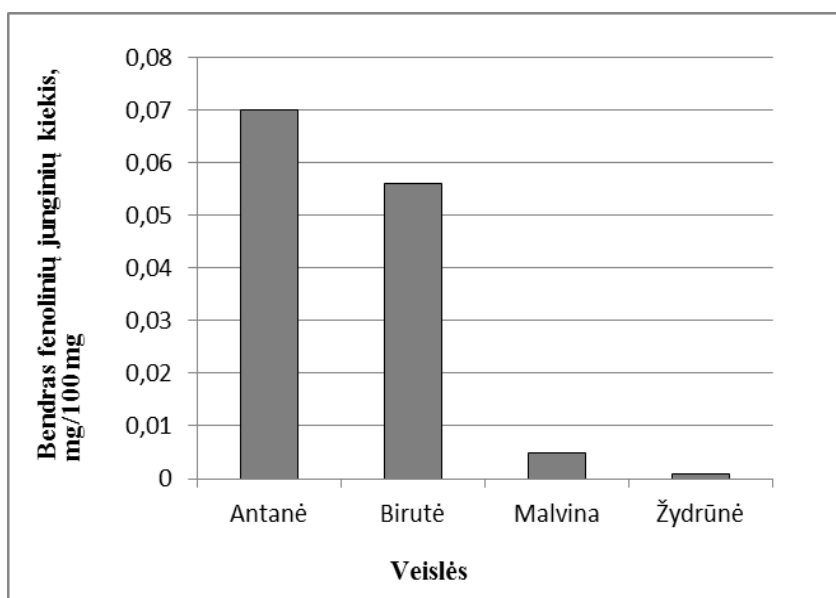
Tyrimo rezultatai (15 pav.) parodė, kad didžiausias flavonoidų kiekis buvo nustatytas liucernose *Malvina*, išaugintose *in vitro* MS terpėje ($1,5 \pm 0,01$ mg/g), o mažiausias - veislėje *Birutė* ($0,9 \pm 0,01$ mg/g). Iš literatūros yra žinoma, kad liucernose flavonoidų *in vivo* yra $10,32$ mg/g [59].

3.7. Bendras fenolinių junginių kiekio įvertinimas liucernose

Pirmiausia nubraižyta kalibracinė kreivė, pagal kurią buvo apskaičiuotas bendrasis fenolinių junginių kiekis. Paruošti kalibracinei kreivei buvo paimta 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 mg/ml tanino rūgšties kiekis, mg/ml ir išmatuotas optinis tankis. Sudaryta kalibracinė kreivė (16 pav.).



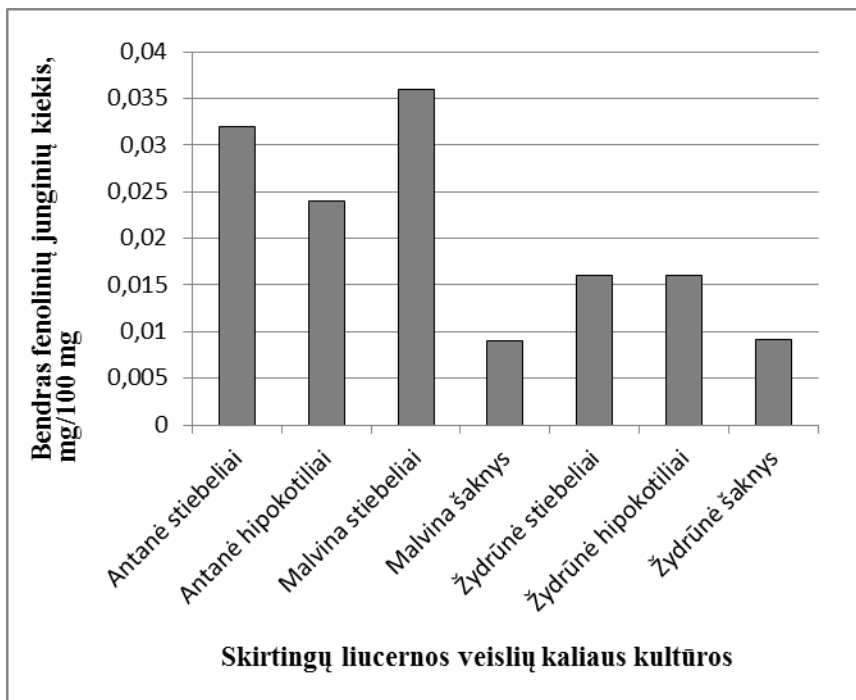
16 pav. Kalibracinė kreivė bendrųjų fenolinių junginių kiekio nustatymui



17 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingose liucernos veislėse

Iš gautų tyrimo duomenų (17 pav.) matyti, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas liucernose *Antanė*, kurios buvo išaugintos *in vitro* MS terpėje ($0,07 \pm 0,01$ mg/100 mg).

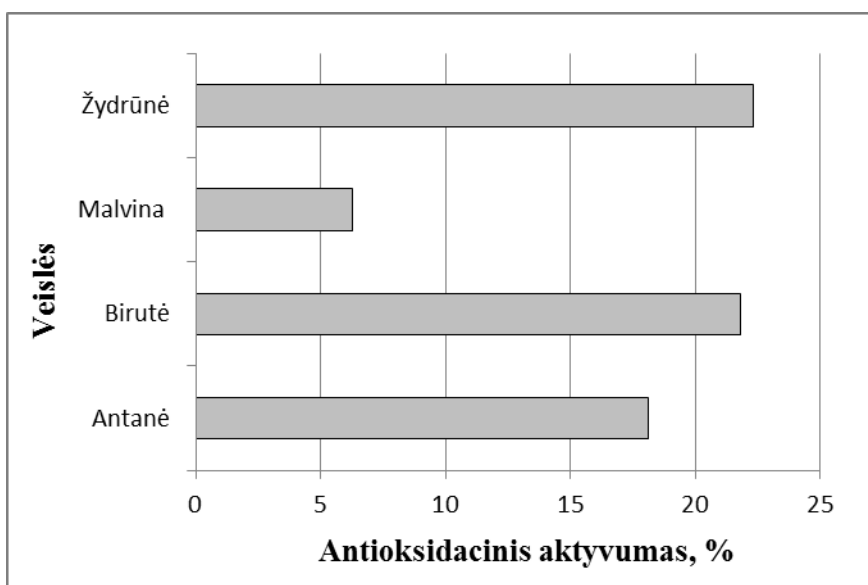
3.8. Bendras fenolinių junginių kiekio įvertinimas liucernų kaliaus kultūrose



18 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrose

Didžiausias fenolinių junginių kiekis kaliaus kultūrose (18 pav.) buvo nustatytas iš stiebelių veislėje *Malvina* ($0,036 \pm 0,005$ mg/100 mg), iš hipokotilių veislėje *Antanė* ($0,024 \pm 0,005$ mg/100 mg), iš šaknų veislėje *Žydrūnė* ($0,0092 \pm 0,001$ mg/100 mg).

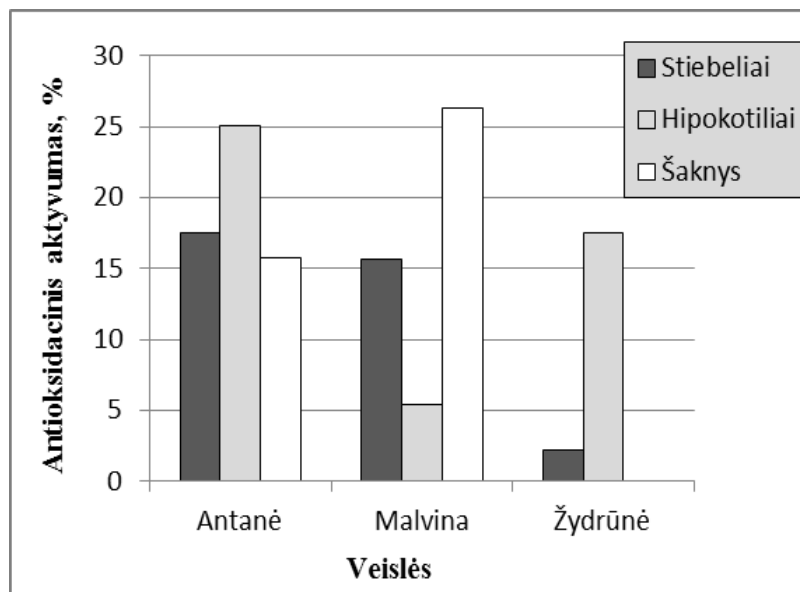
3.9. Antioksidacinio aktyvumo prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą įvertinimas



19 pav. Skirtingų liucernos veislių antioksidacinis aktyvumas

Iš rezultatų (19 pav.) matyti, kad didžiausias liucernų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH stabilų radikalą buvo nustatytas $22,3 \pm 0,01$ % veislėje *Žydrūnė*, t.y. aktyvumas buvo 3,5 karto didesnis nei veislėje *Malvina*.

3.10. Antioksidacinio aktyvumo prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą įvertinimas liucernos kaliaus kultūrose



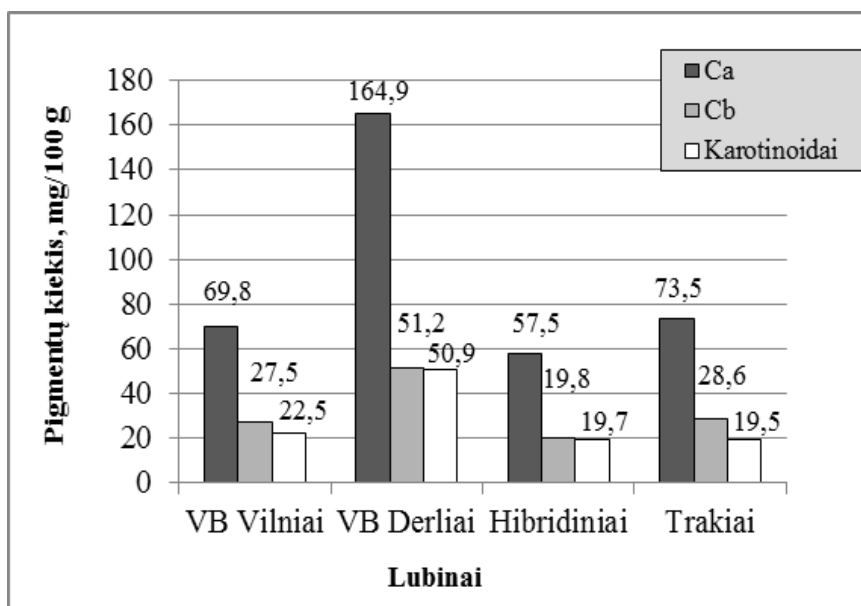
20 pav. Skirtingų veislių liucernos kaliaus kultūrų antioksidacinis aktyvumas

Iš gautų tyrimo duomenų (20 pav.) matyti, kad didžiausias liucernų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH stabilų radikalą kaliaus kultūrose buvo nustatytas iš stiebelių - $17,58 \pm 0,07$ %, iš hipokotilių - $25,13 \pm 0,02$ % veislėje *Antanė*, iš šaknų - $26,36 \pm 0,03$ % veislėje *Malvina*.

Liucernos kaliaus kultūros pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei liucernos daigai. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo kaliaus kultūrose iš šaknų veislėje *Malvina*, kuris 4,14 karto didesnis nei liucernos tos pačios veislės daiguose.

3.11. Chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų įvertinimas lubinuose (*Lupinus*)

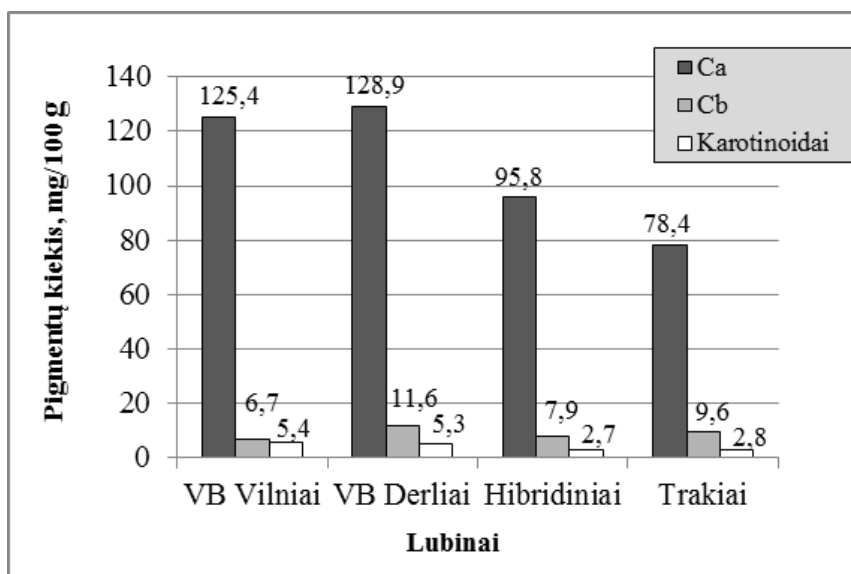
Pigmentų (chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų) kiekiams nustatyti buvo naudoti lubinų daigai, išauginti maitinamojoje MS terpėje ($pH = 5,7$) (21 pav.)



21 pav. Pigmentų kiekis lubinuose *in vitro* po 7 dienų: Ca – chlorofilas *a*, Cb – chlorofilas *b*

Iš gautų rezultatų (21 pav.) matyti, kad po 7 dienų lubinų auginimo didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo nustatytas lubinuose *VB Derliai*, išaugintuose *in vitro* MS terpėje ($164,9 \pm 0,01$ mg/100 g), mažiausias - hibridiniuose lubinuose ($57,5 \pm 0,02$ mg/100 g). Didžiausias chlorofilo *b* kiekis buvo įvertintas lubinuose *VB Derliai* – ($51,2 \pm 0,04$ mg/100 g), didžiausias karotinoidų kiekis - lubinuose *VB Derliai* ($50,9 \pm 0,03$ mg/100 g), išaugintuose *in vitro* MS terpėje.

Lubinų daigai po 7 dienų auginimo pasižymėjo didesniu chlorofilo *a*, chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekiu nei liucernos daigai.



22 pav. Pigmentų kiekis lubinuose *in vitro* po 14 dienų: Ca – chlorofilas *a*, Cb – chlorofilas *b*

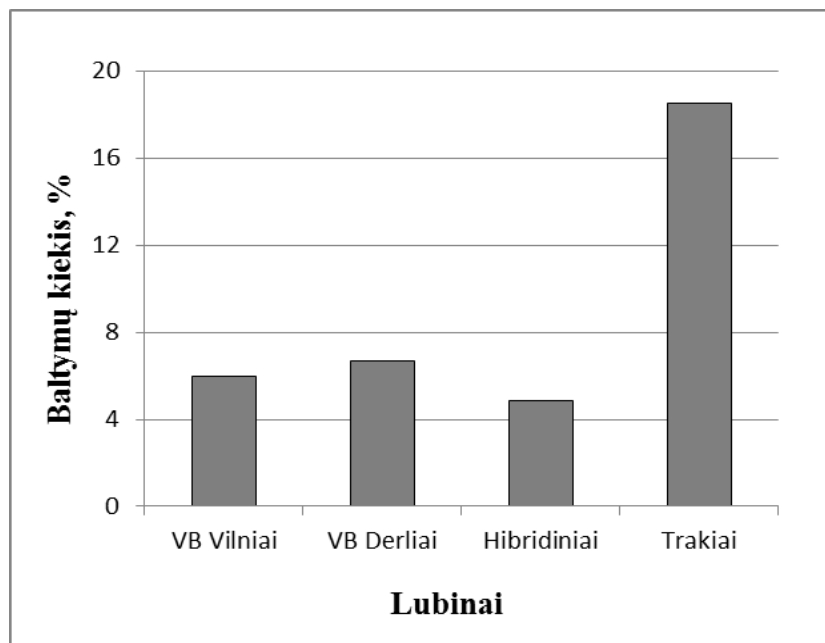
Tyrimo rezultatai parodė (22 pav.), kad didžiausias chlorofilo *a* kiekis po 14 dienų buvo nustatytas lubinuose *VB Derliai* ($128,9 \pm 0,04$ mg/100 g), mažiausias - veislėje *Trakiai* ($78,4 \pm 0,03$ mg/100 g), t. y. jo kiekis buvo 50,5 mg mažesnis nei lubinuose *VB Derliai*.

Didžiausias chlorofilo *b* kiekis buvo nustatytas lubinuose *VB Derliai* ($11,6 \pm 0,02$ mg/100 g), o mažiausias – *VB Vilniai* ($6,7 \pm 0,02$ mg/100 g), t. y. jo kiekis buvo 4,9 mg mažesnis nei *VB Derliai*. Didžiausias karotinoidų kiekis buvo gautas lubinuose *VB Vilniai* ($5,4 \pm 0,06$ mg/100 g), o mažiausias karotinoidų kiekis - hibridiniuose lubinuose ($2,7 \pm 0,03$ mg/100 g), t. y. jų kiekis buvo 2,7 mg mažesnis nei *VB Vilniai*.

Lubinų daigai po 14 dienų auginimo pasižymėjo didesniu chlorofilo *a* kiekiu nei liucernos daigai, tačiau didesniu chlorofilo *b* ir karotinoidų kiekiu pasižymėjo liucernų daigai.

3.12. Baltymų kiekio įvertinimas lubinuose, augintuose MS terpėse *in vitro*

Pirmiausia nubraižyta kalibracinė kreivė (11 pav.), kuria naudojantis apskaičiuotas albumino kiekis (23 pav.)

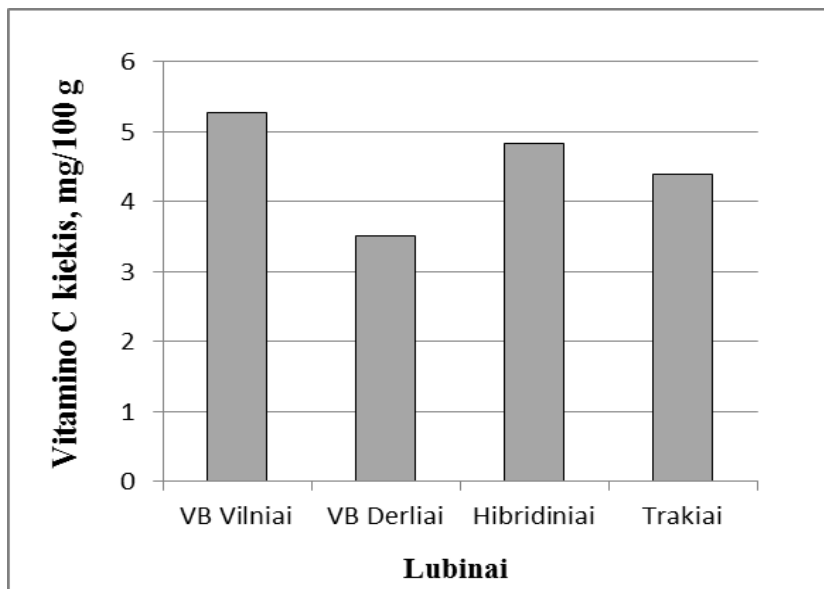


23 pav. Baltymų kiekio įvertinimas lubinuose

Iš gautų rezultatų matyti (23 pav.), kad didžiausias baltymų kiekis buvo nustatytas lubinuose *Trakiai*, išaugintuose MS terpėje ($18,53 \pm 0,02$ %), o mažiausias - hibridiniuose lubinuose ($4,86 \pm 0,01$ %), t. y. jų kiekis buvo 3,8 karto mažesnis nei hibridiniuose lubinuose.

Gauti rezultatai (pav.) parodė, kad liucernos daigai *in vitro* kaupė daugiau baltymų nei lubinų daigai.

3.13. Askorbo rūgšties kiekio įvertinimas lubinuose, augintose MS terpėje *in vitro*



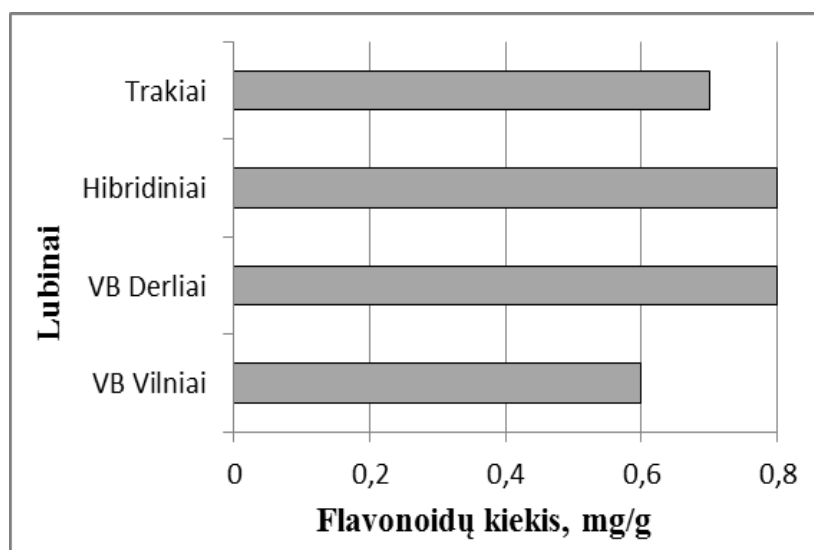
24 pav. Askorbo rūgšties kiekis lubinuose

Iš gautų rezultatų nustatyta (24 pav.), kad didžiausias askorbo rūgšties kiekis buvo įvertintas lubinuose *VB Vilniai* ($5,28 \pm 0,01$ mg/100 g), o mažiausias – *VB Derliai* ($3,52 \pm 0,03$ mg/100 g), t. y. jos kiekis buvo 1,76 mg mažesnis nei lubinuose *VB Vilniai*.

Didesnis askorbo rūgšties kiekis nustatytas liucernų veislėje *Birutė* nei lubinuose *VB Derliai*.

3.14. Flavonoidų kiekio įvertinimas lubinuose

Flavonoidų kiekis lubinuose buvo nustatytas pagal hiperozidą [53].



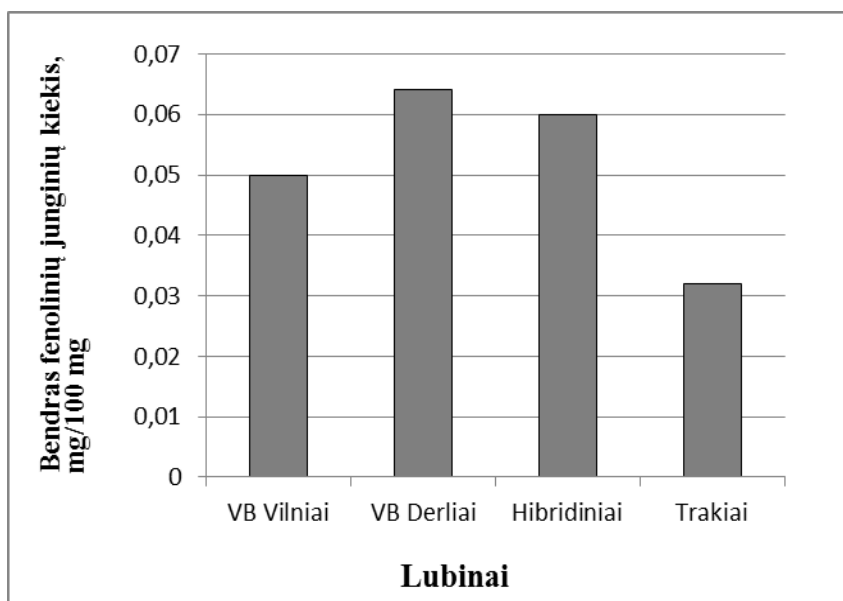
25 pav. Flavonoidų kiekio įvertinimas lubinuose

Tyrimo rezultatai (25 pav.) parodė, kad didžiausias flavonoidų kiekis buvo nustatytas hibridiniuose ir *VB Derliai* lubinuose, išaugintose *in vitro* MS terpėje ($0,8 \pm 0,02$ mg/g), o mažiausias - lubinuose *VB Vilniai* ($0,6 \pm 0,03$ mg/g).

Liucernos daigai pasižymėjo ($0,7$ mg/g) didesniu flavonoidų kiekiu nei lubinų daigai.

3.15. Bendras fenolinių junginių kiekio įvertinimas lubinuose

Pirmiausia nubraižyta kalibracinė kreivė (16 pav.), pagal kurią buvo apskaičiuotas bendrasis fenolinių junginių kiekis (26 pav).



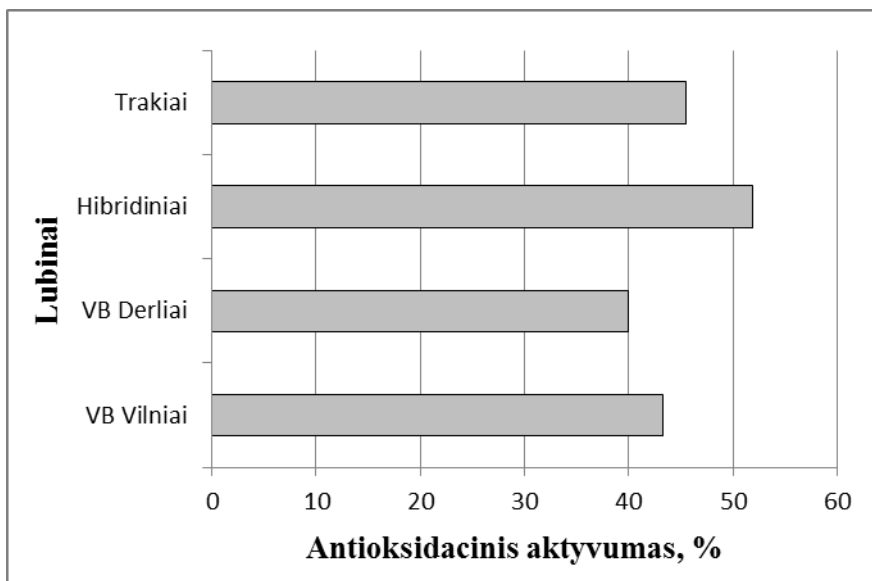
26 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingų veislių lubinuose

Iš gautų tyrimo duomenų (26 pav.) matyti, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas lubinuose *VB Derliai*, kurie buvo išauginti *in vitro* MS terpėje ($0,064 \pm 0,04$ mg/100 mg).

Gauti rezultatai parodė, kad liucernos daigai *in vitro* kaupė didesnius fenolinių junginių kiekius nei lubinų daigai.

Iš literatūros yra žinoma, kad siauralapiuose lubinuose (*Lupinus augustifolius* L.) po 6 dienų bendrųjų fenolių - ($16,61 \pm 1,13$ mg/g sausos medžiagos) žaliavinių lubinų ir jų daigų [60].

3.16. Antioksidacinio aktyvumo prieš 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalą įvertinimas



27 pav. Lubinų antioksidacinis aktyvumas

Iš rezultatų (27 pav.) matyti, kad didžiausias lubinų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH stabilų radikalą buvo nustatytas $51,9 \pm 0,1$ % hibridiniuose lubinuose, t. y. antioksidacinis aktyvumas buvo 11,9 % didesnis nei lubinų veislėje *VB Derliai*.

Lubinų daigai pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei liucernų daigai. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo nustatytas hibridiniuose lubinuose, kuris buvo 29 % didesnis nei liucernų veislėje *Žydrūnė*.

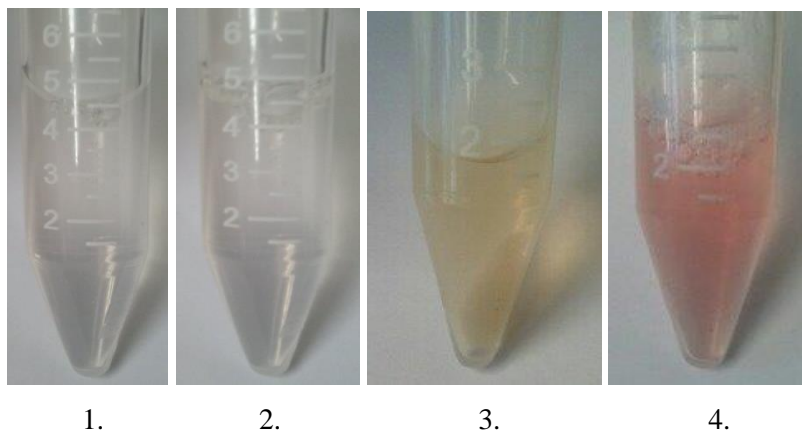
3.17. Saponinų kokybinis nustatymas

Saponinų kokybinis įvertinimas buvo atliktas su džiovintais lubinų daigais, išaugintais *in vitro* (5 lentelė).

5 lentelė. Kokybinis saponinų įvertinimas lubinuose

Reakcija	Ekstraktas+ 0,1 N HCl	Ekstraktas+ 0,1 N NaOH	Ekstraktas+ Pb(CH ₃ COO) ₂	Ekstraktas+konc. H ₂ SO ₄ + C ₂ H ₅ OH+10 % Fe ₂ SO ₄	Ekstraktas+ 10 % NaNO ₃ + konc. H ₂ SO ₄
<i>VB Vilniai</i>	Nesusidarė putos	Nesusidarė putos	Susidarė nuosėdos	Nevyko reakcija	Atsirado gelsva spalva
<i>VB Derliai</i>	Susidarė putos	Susidarė putos	Susidarė nuosėdos	Nevyko reakcija	Atsirado rausva spalva
Hibridiniai	Susidarė putos	Susidarė putos	Susidarė nuosėdos	Nevyko reakcija	Atsirado raudona spalva
<i>Trakiai</i>	Nesusidarė putos	Nesusidarė putos	Susidarė nuosėdos	Nevyko reakcija	Atsirado gelsva spalva

Iš 5 lentelės matyti, kad 4 iš 5 reakcijų metu susidarė požymiai patvirtinantys, kad lubinai kaupia saponinus (28, 29 pav.). Viena reakcija su koncentruota sieros rūgštimi, etilo alkoholiu ir geležies sulfatu nevyko.



28 pav. Kokybinis saponinų įvertinimas lubinuose *VB Derliai*

1 – Ekstraktas + 0,1 N HCl; 2 – Ekstraktas + 0, 1 N NaOH; 3 - Ekstraktas+ Pb(CH₃COO)₂;

4 – Ekstraktas + 10 % NaNO₃+ konc. H₂SO₄



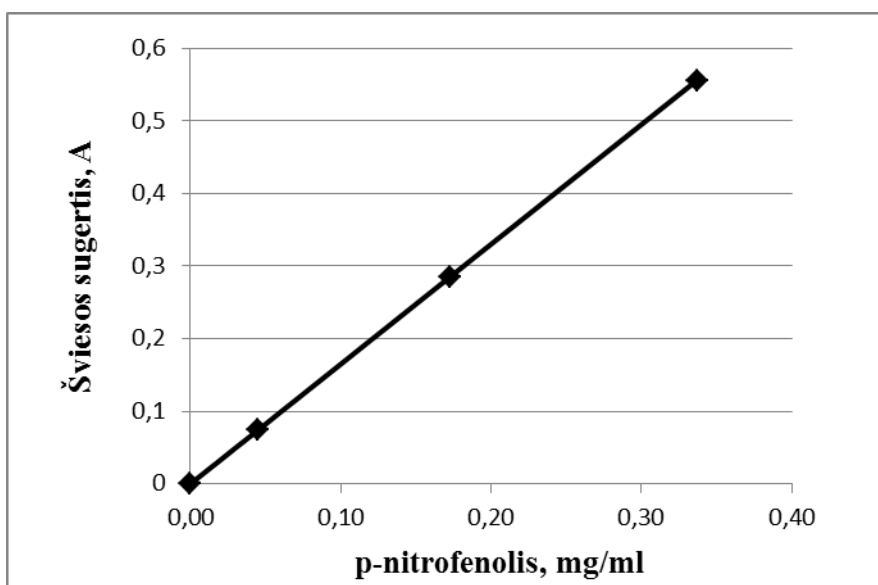
1. 2. 3. 4.

29 pav. Kokybinis saponinų įvertinimas hibridiniuose lubinuose

1 – Ekstraktas + 0,1 N HCl; 2 – Ekstraktas + 0,1 N NaOH; 3 – Ekstraktas + $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$;
4 - Ekstraktas+ 10 % NaNO_3 + konc. H_2SO_4

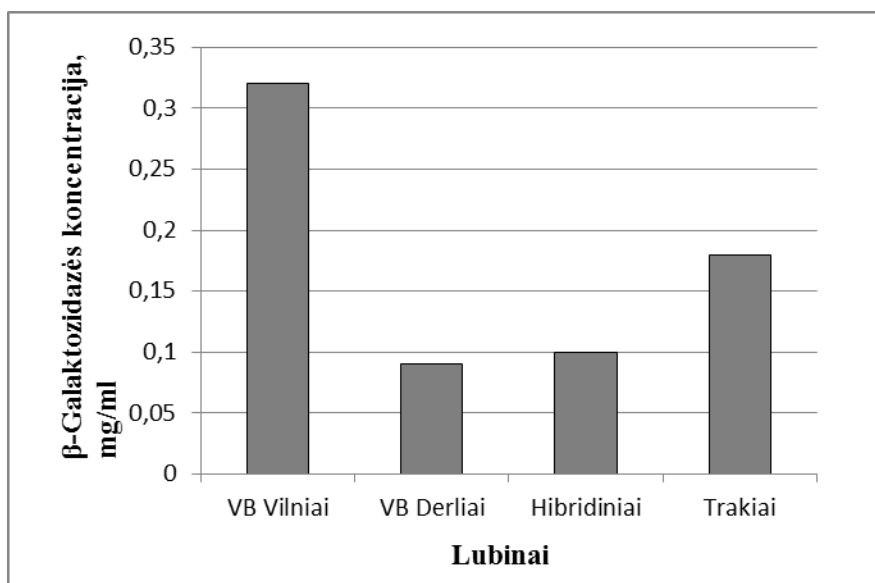
3.18. β -Galaktozidazės enziminis įvertinimas

Pirmiausia nubraižyta p-nitrofenolio kalibracinė kreivė, pagal kurią buvo apskaičiuota fermento β -galaktozidazės koncentracija. Paruošti kalibracinei kreivei buvo paimtas 0,04; 0,17; 0,34 mg/ml p-nitrofenolio kiekis ir išmatuota šviesos sugertis. Sudaryta kalibracinė kreivė (30 pav.).



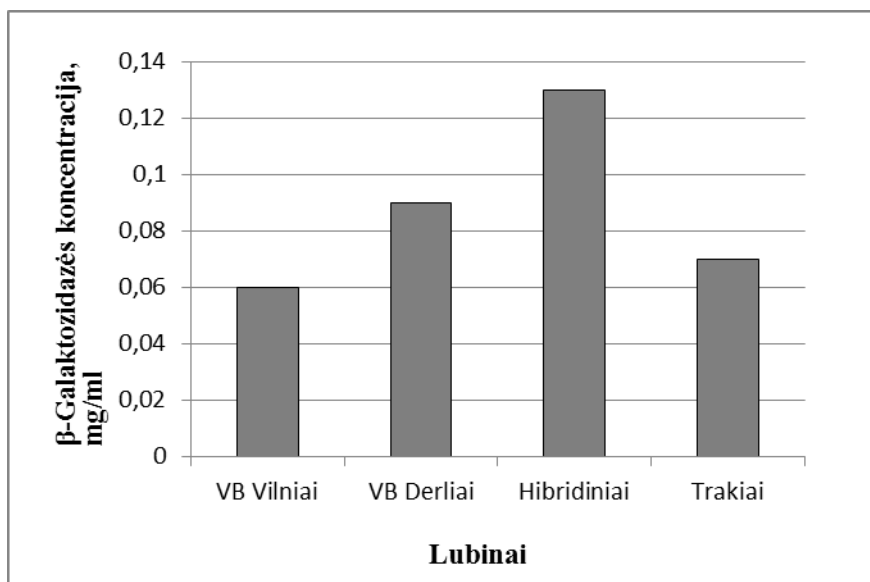
30 pav. Kalibracinė kreivė fermento β -galaktozidazės koncentracijos nustatymui

Naudojantis kalibracine kreive (30 pav.) apskaičiuota β -galaktozidazės koncentracija (31 pav.).



31 pav. β -Galaktozidazės įvertinimas lubinų sėklose

Iš gautų rezultatų matyti (31 pav.), kad didžiausia β -galaktozidazės koncentracija nustatyta lubinų *VB Vilniai* sėklose ($0,32 \pm 0,02$ mg/ml), mažiausia – lubinų *VB Derliai* sėklose ($0,09 \pm 0,03$ mg/ml).



32 pav. β -Galaktozidazės įvertinimas lubinų daiguose

Tyrimo rezultatai (32 pav.) parodė, kad didžiausia β -galaktozidazės koncentracija nustatyta hibridinių lubinų daiguose ($0,13 \pm 0,03$ mg/ml), mažiausia – *VB Vilniai* ($0,06 \pm 0,02$).

Lubinų sėklose nustatytas didesnė β -galaktozidazės fermento koncentracija nei jų daiguose.

Prieš daiginimą sėklaskilčių sienelėse yra labai daug galaktozės (71 %) ir arabinozės (20 %) liekanų, o likusi dalis sudaryta iš nedidelio kiekio gliukozės, uroninės rūgšties ir ramnozės. Po daiginimo dauguma galaktozės ir arabinozės yra pašalinamos iš ląstelių sienelių, lieka daigai, kurie praturtinti ramnozės, uroninės rūgšties ir gliukozės [61].

REKOMENDACIJOS

Gauti tyrimų rezultatai atlikti laboratorijoje patvirtina, kad lubinuose yra aptinkamas β -galaktozidazės fermentas. Nustatyta, kad tinkamiausia augalinė žaliava – siauralapių lubinų (*Lupinus augustifolius* L.) veislė *VB Vilniai*. Technologinio proceso metu naudojama Murashige-Skoog (MS) maitinamoji terpė ($pH = 5,7$).

Ši technologinė schema (2 priedas) skirta išskirti β -galaktozidazės fermentą iš lubinų augalinės žaliavos.

β -Galaktozidazės gamyba yra skirstoma į tris etapus:

1. Fermentacija.
2. Biomasės gavimas.
3. Gryninimas.

Fermentacija. Vamzdynu tiekiamas vanduo ir mineralinės medžiagos. Viskas sumaišoma nerūdijančiame plieno rezervuare maišytuvu (R-1). Paruošta maitinamoji terpė išcentrinu siurbliu (S-1) tiekama į sterilizatorių (ST-1), kur ji yra sterilizuojama (121 °C temperatūroje sterilizuojama 15 min, slėgis 0,75 atm). Sterilizuota maitinamoji terpė siurbliu (S-2) tiekama į bioreaktorių (BR-1). Į jį taip pat tiekiamas oras iš dujų kompresoriaus (DK-1), kuris išvalomas oro filtre (OF-1) ir sumaišomas su amoniaku. Iš bioreaktoriaus pašalintas oras yra filtruojamas oro filtru (OF-2), susidariusios dujų atliekos (amoniakas, anglies dioksidas, azotas ir deguonis) pašalinamos. Į bioreaktorių (BR-1) iš rezervuaro (R-2) patenka lubinų *VB Vilniai* daigai. Bioreaktoriuje (BR-1) steriliomis sąlygomis 14 dienų auginami siauralapiai lubinai *VB Vilniai* (22 °C temperatūroje, $pH = 5,7$). Siurbliu (S-3) iš bioreaktoriaus į laikymo rezervuarą (R-3) yra tiekiami užauginti lubinai su maitinamąja terpe.

Biomasės gavimas. Iš laikymo rezervuaro (R-3) siurbliu (S-4) biomasė tiekama į diskinę centrifugą (DC-1). Po centrifugavimo pašalinamos skystos atliekos, o kieta augalinė medžiaga tiekama sraigtiniu transporteriu (T-1) į praplovimo filtrą (PF-1), į kurį patenka vanduo skirtas praplovimui. Kieta medžiaga transportuojama sraigtiniu transporteriu (T-2) į džiovyklą (D-1) vėliau sraigtiniu transporteriu (T-3) tiekama į homogenizatorių (HG-1). Homogenizuota augalinė žaliava buferiais ekstrahuojama ekstraktoriuje (E-1), tada siurbliu (S-5) tiekama į diskinę centrifugą (DC-2), susidariusios atliekos iš ekstraktoriaus (E-1) ir diskinės centrifugos (DC-2) patenka į laikymo rezervuarą iš kurio pašalinamos.

Gryninimas. Siurbliu (S-6) baltyminis tirpalas iš rezervuaro (R-5) tiekiamas ir gryninamas jonų mainų chromatografinėje kolonėlėje (C-1), į kurią patenka sterilus vanduo, buferis Tris-

(hidroksimetil)-aminometanas (Tris), natrio chloridas (NaCl), natrio hidroksidas (NaOH). Skystis siurbliu (S-7) patenka į laikymo rezervuarą (R-6). Tirpalas tiekiamas siurbliu (S-8) ir vykdoma gelfiltracija (CF-1), į kolonėlę paduodamas praplovimo skystis ir eliuentas, pašalinamos atliekos. Baltyminis tirpalas siurbliu (S-9) tiekiamas į laikymo rezervuarą (R-7), tada vykdomas diafiltravimas (DF-1), keičiamas gelio filtravimo buferis, pašalinamos skystos atliekos. Tada baltyminis tirpalas tiekiamas siurbliu (S-11) ir yra liofilizuojamas (L-1). Gaunamas paruoštas produktas (β -galaktozidazės fermentas), pašalinamos skystos atliekos.

IŠVADOS

- 1) Nustatyta, kad didžiausi pigmentų kiekiai tiriamuosiuose augaluose buvo:
 - a) chlorofilo *a* - $130,6 \pm 0,06$ mg/100 g; chlorofilo *b* - $49,2 \pm 0,06$ mg/100 g; karotinoidų - $37,0 \pm 0,08$ mg/100 g liucernose *Antanė*, išaugintose *in vitro* MS terpėje po 7 dienų auginimo;
 - b) chlorofilo *a* - $164,9 \pm 0,01$ mg/100 g; chlorofilo *b* - $51,2 \pm 0,04$ mg/100 g, karotinoidų - $50,9 \pm 0,03$ mg/100 g lubinuose *VB Derliai*, išaugintuose *in vitro* MS terpėje po 7 dienų auginimo.
- 2) Nustatyta, kad didžiausi baltymų kiekiai buvo:
 - a) liucernose *Antanė* - $32 \pm 0,07$ %, išaugintose *in vitro* MS terpėje;
 - b) lubinuose *Trakiai* - $18,53 \pm 0,02$ %, išaugintuose MS terpėje.
- 3) Nustatyta, kad didžiausi askorbo rūgšties kiekiai buvo:
 - a) liucernose *Birutė* - $70,4 \pm 0,01$ mg/100g;
 - b) lubinuose *VB Vilniai* - $5,28 \pm 0,01$ mg/100g.
- 4) Ištirta, kad didžiausi flavonoidų kiekiai buvo:
 - a) liucernose *Malvina* - $1,5 \pm 0,01$ mg/g, išaugintose *in vitro* MS terpėje;
 - b) hibridiniuose ir *VB Derliai* lubinuose, išaugintuose *in vitro* MS terpėje ($0,8 \pm 0,02$ mg/g).
- 5) Gauta, kad didžiausi fenolinių junginių kiekiai buvo:
 - a) liucernose *Antanė* - $0,07 \pm 0,01$ mg/100 mg, išaugintose *in vitro* MS terpėje;
 - b) lubinuose *VB Derliai*, išaugintuose *in vitro* MS terpėje ($0,064 \pm 0,04$ mg/100 mg).
- 6) Ištirta, kad didžiausias antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH stabilų radikalą buvo:
 - a) liucernose *Žydrūnė* - $22,3 \pm 0,01$ %;
 - b) hibridiniuose lubinuose - $51,9 \pm 0,1$ %.
- 7) Nustatyta, kad didžiausias β – galaktozidazės koncentracija buvo lubinų *VB Vilniai* sėklose ($0,32 \pm 0,02$ mg/ml).
- 8) Pateiktas β -galaktozidazės išskyrimo iš lubinų (*Lupinus*) technologinio proceso brėžinys.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. **Fernández-Ronco M. P., Lucas de A., Rodríguez J. F., García M. T., Gracia I.** // The Journal of Supercritical Fluids. 2013. Vol. 79. P. 345-355.
2. **Pieters L., Vlietinck A. J.** // Journal of Ethnopharmacology. 2005. Vol. 100. P.57-60.
3. **Nikkhah A.** On // Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering. 2014. Vol. 1, N. 1. P. 1.
4. **Kayser O., Quax W.** Medical Plant Biotechnology. Weinheim, 2007.
5. Peržiūrėta 2015, kovo 12 d., adresu:
<http://www.asu.lt/nm/l-projektas/produktyvumas/46.html>
6. Peržiūrėta 2015, kovo 12 d., adresu:
<http://www.asu.lt/nm/l-projektas/produktyvumas/77.html>
7. N. d. Peržiūrėta 2015, kovo 30 d., adresu: <http://pianteerbacee.wikispaces.com/Medicago+sativa>
8. **Caunii A., Pribac G., Grozea I., Gaitin D., Samfira I.** // Chemistry Central Journal. 2012. Vol. 123, N 6. P. 1–3.
9. Peržiūrėta 2015, kovo 30 d., adresu:
<http://www.infomed.lt/lt/2/portal/klinika,id,/augaluose-slypi-sveikata-ir-gyvybingumas>
10. Peržiūrėta 2015, kovo 31 d., adresu:
http://forages.oregonstate.edu/php/fact_sheet_print_legume.php?SpecID=1
11. **Bivilienė A.** Lietuvoje augančių daugiamečių žolių genetinė įvairovė: Lietuvos augalų nacionaliniai genetiniai ištekliai. Akademija, 2010.
12. Peržiūrėta 2015, kovo 12 d., adresu: http://vddb.library.lt/fedora/get/LT-eLABa-0001:J.04~2005~ISSN_1392-1134.V_37.N_4.PG_43-53/DS.002.0.01.ARTIC
13. Peržiūrėta 2015, kovo 20 d., adresu: <https://muddyfingersmeg.wordpress.com/2012/05/>
14. **Asakavičiūtė R., Macnickienė Z., Kosychova V. Ragalevičienė** // Cheminė technologija. 2014. T. 65, Nr. 1. P. 5-9.
15. **Šlapakauskas V., Duchovskis P.** Augalų produktyvumas. Akademija, 2007.
16. **Z. Maknickienė** // Biologija. 2004. N. 4. P. 40-43.
17. **Z. Maknickienė** // Agronomijas Vėstis. 2008. N. 11. P. 120-125.
18. **Z. Maknickienė** // Žemės ūkio mokslai. 2005. Nr. 3. P. 57-62.
19. **Z. Maknickienė** // Biologija. 1998. Nr. 1. P. 50-51.
20. LAMMC. Žemės ūkio augalų veislių aprašymai. Akademija. 2011. P. 38-40.
21. **Jonuškienė I.** Augalų ir mikroorganizmų biotechnologija. Kaunas, 2012.
22. **Sliesaravičius A., Stanys V.** Žemės ūkio augalų biotechnologija. Vilnius, 2005.

23. **Gamborg O. L., Phillips G. C.** Plant cell, tissue and organ culture fundamental methods. Berlin, 1995.
24. **Kuusienė S.** Augalų genomika ir biotechnologija. Kaunas, 2007.
25. **Husain Q.** // Critical Reviews in Biotechnology. 2010. Vol. 30, N. 1. P. 41–62.
26. **Bohra P.** Evolution of *Escherichia coli* LacZ gene to create diversity in glycosidic bonds hydrolysis. (Master Thesis in Medical Biology). Norway, 2011.
27. Peržiūrėta 2015, kovo 31 d., adresu:
<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture4/Lecture4.html>
28. Peržiūrėta 2015, kovo 31 d., adresu: http://www.intelligen.com/superpro_overview.html
29. **Gitelson A. A., Gritz Y., Merzlyak M. N.** // Journal of Plant Physiogoly. 2003. Vol. 160. P. 271 –282.
30. Peržiūrėta 2015, kovo 30 d.,
adresu:http://gamta.vdu.lt/bakalaurai/lab_darbai/augalu_fiziologija/fotosintezes_pigmentu_nust_atymas.pdf
31. **Cazzonelli C. I.** // Functional Plant Biology. 2011. Vol. 38. P. 833–847.
32. **Balasundram N., Sundram K., Samman S.** // Food chemistry. Vol. 99, N. 1. 2006. P. 191-203.
33. **Raudonis R.** Skysčių chromatografijos pokolonėlinių metodų optimizavimas augalinių antioksidantų tyrimams. (Daktaro disertacija). Kaunas, 2012.
34. **Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D.** // J. Agric. Food Chem. 1998. Vol. 46. P. 4113–4117.
35. **Didžiapetrienė J., Uknevičiūtė G., Bublevič J., Uleckienė S., Kazbarienė B., Stukas R.** // Biomedicina. 2011. T. 21, N. 7. P. 154-159.
36. **Kasparavičienė G., Briedis V.** // Biomedicina. 2002. T. 2, N. 2. P. 187-191.
37. **Iwashina T.** // Journal of Plant Research. 2000. Vol. 113. P. 287-299.
38. **Benetis R.** Kraujažolės (*Achillea* L.) genties augalų fenolinių junginių sudėties ir biologinio poveikio įvertinimas. (Daktaro disertacija). Kaunas, 2009.
39. **Pietta P-G.** // Journal of Natural Products. 2000. Vol. 63, N. 7. P. 1035–1042.
40. **Havsteen B. H.** // Pharmacology & Therapeutics. 2002. Vol. 96. P. 67-202.
41. **Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. E.** Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2002. Vol. 75. P. 31-49.
42. **Sparg S. G., Light M.E., Staden van J.** // Journal of Ethnopharmacology. 2004. Vol. 94. P. 219-243.

43. **Daukšas K., Barkauskas J., Daukšas V., Daumantas E., kabaitienė M., Kareiva A., Mačionis Z., Naurusevičius L., Sausnauskienė S., Skučas V.** Chemijos terminų aiškinamasis žodynas. Vilnius, 1997.
44. Peržiūrėta 2015, balandžio 2 d., adresu: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/angelova-plamena-2007-04-23/HTML/chapter1.html>
45. Peržiūrėta 2015, balandžio 2 d., adresu: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1080/10409230008984166>
46. Peržiūrėta 2015, balandžio 2 d., adresu: http://www2.moh.gov.my/images/gallery/rni/10_chat.pdf
47. **Hacısevkd** // A. J. Fac. Pharm, Ankara. 2009. Vol. 38, N.3. P. 233-255.
48. **Beresnevičius Z., Juzeliūnas E., Kadziauskas J., Kareiva A., Skominas V., Vainilavičius P.** Chemijos enciklopedija. Vilnius, 2015.
49. **Lapiņa L., Grauda D., Jansone B., Jansons A., Rashall I.** // Environment. Technology. Resources Proceedings of the 7th International Scientific and Practical Conference. 2009. Vol. 1. P. 166.
50. **Walton P. D., Brown D. C. W.** // J. Genet. 1988. Vol. 67, N. 2. P. 95-100.
51. **Wang Q., Hirneisen K. A., Markland A. M., Kniel K. E.** // Journals Americal Society for Microbiology. 2013. Vol. 79. N. 22. P. 7021-7027.
52. **Slapšytė G., Paulauskas A., Morkūnas V.** Genetikos praktikumas. Vilnius, 2000.
53. **Daunoras G.** Farmokopėjos straipsnių rinkinys. Kaunas, 2001.
54. **Silva A. L. C., Caruso C. S., Moreira R. A., Horta A. C. G.** // Ciênciã e Agrotecnologia. 2005. Vol. 29, N. 6. P. 1161–1166.
55. **Nicolaev O., Dupouy E., Mija N.** // The Annals of the University Dunarrea de Jos of Galati, Fascicle IV. Food Technology. 2007. P. 23–26.
56. **Makkar H. P. S., Siddhuraju P., Becker K.** Plant secondary metabolites. Humana Press Inc., 2007. P. 74–79.
57. **Wang Y. L., Wang X. D., Zhao B., Wang Y. C** // Acta Physiol Plant. 2007. Vol. 29. P. 417 – 423.
58. **Figueiredo S. A., Lashermes P. and Aragao F. J. L.** // Journal of Experimental Botany. 2011. Vol. 62, N. 8. P. 2691–2703.
59. **Goławska S., Łukasik I., Gołowski A., Kapusta I., Janda B.** // Polish J. of Environ. 2010. Vol. 19, N. 5. P. 916.

60. **Dueñas M., Hernández T., Estrella I., Fernández D.** // Food chemistry. 2009. Vol. 117. P. 599–607.
61. **Buckeridge M. S. Grant Reid J. S.** // Planta. 1994. Vol. 192. P. 502-511.
62. **Valančius Z., Nizevičienė D., Viliūnienė O., Solnyškinienė J., Stasiulaitienė I.** Magistro baigiamojo darbo metodiniai nurodymai. Cheminės technologijos fakulteto Chemijos inžinerijos studijų programos magistrantams. Kaunas, 2013.

PRIEDAI

1 priedas. Technologinės schemos prietaisų žymėjimas ir pavadinimai

Prietaiso žymėjimas	Prietaiso pavadinimas
R-1	Sumaišymo rezervuaras
R-2-7	Laikymo rezervuarai
V-1-12	Vožtuvai
S-1-11	Išcentriniai siurbliai
ST-1	Sterilizatorius
DK-1	Dujų kompresorius
OF-1-2	Oro filtrai
BR-1	Bioreaktorius
DC-1-2	Diskinės centrifugos
T-1-3	Straigtiniai transporteriai
PF-1	Praplovimo filtras
D-1	Džiovykla
HG-1	Homogenizatorius
E-1	Ekstraktorius
CK-1	Chromatografinė kolonėlė
GK-1	Gelfiltravimo kolonėlė
DF-1	Diafiltratorius
L-1	Liofilizatorius