



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Augimo reguliatorių ir *Paenibacillus* genties bakterijų įtaka  
stevijos (lot. *Stevia rebaudiana* Bertoni) augimo *in vitro*,  
biologiškai aktyviųjų junginių ir bioaktyvumo įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Brigita Mačiulskaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Augimo reguliatorių ir *Paenibacillus* genties bakterijų įtaka  
stevijos (lot. *Stevia rebaudiana* Bertoni) augimo *in vitro*,  
biologiškai aktyviųjų junginių ir bioaktyvumo įvertinimas**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Brigita Mačiulskaitė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

**Dr. Vaida Sirgedaitė-Šėžienė**

Projekto konsultantė

**Doc. dr. Vilija Kederienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Brigita Mačiulskaitė

**Augimo reguliatorių ir *Paenibacillus* genties bakterijų įtaka  
stevijos (lot. *Stevia rebaudiana* Bertoni) augimo *in vitro*,  
biologiškai aktyviųjų junginių ir bioaktyvumo įvertinimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

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

Brigita Mačiulskaitė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Mačiulskaitė, Brigita. Augimo reguliatorių ir *Paenibacillus* genties bakterijų įtaka stevijos (lot. *Stevia rebaudiana* Bertoni) augimui *in vitro*, biologiškai aktyviųjų junginių ir bioaktyvumo įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

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

Reikšminiai žodžiai: stevija (lot. *Stevia rebaudiana* Bertoni), augimo hormonai, mikrodauginimas, biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai.

Kaunas, 2021. 57 p.

### Santrauka

Stevijos augalų kultivavimas yra plačiai paplitęs visame pasaulyje. Šio augalo sudėtyje yra natūralių saldiklių, kurie maisto ir gėrimų pramonėje dažnai naudojami kaip cukraus pakaitalas. Taip pat šio stevijoje gausu biologiškai aktyviųjų cheminių junginių, kurie pasižymi teigiamomis savybėmis žmogaus organizmui, todėl neretai naudojami medicinoje. Didėjant natūralių augalų poreikiui, vis dažniau agrikultūroje yra naudojami augalų augimo reguliatoriai. Šios medžiagos padidina derlių, apsaugo augalus nuo aplinkos sukkelto streso ar įvairių vabzdžių bei patogenų. Taip pat vis dažniau yra atliekamas augalų kultivavimas *in vitro* būdu. Toks auginimo būdas leidžia reguliuoti ir sudaryti sterilias bei optimalias augimo sąlygas.

Šio darbo tikslas – įvertinti augimo reguliatorių bei *Paenibacillus* genties bakterijų įtaką stevijos augimui *in vitro*, biologiškai aktyviųjų junginių ir bioaktyvumo poveikiui. Šiame darbe nustatytas bendra fenolinių junginių, flavonoidų, chlorofilų *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracija. Taip pat atliktas antioksidacinio aktyvumo įvertinimas, naudojant DPPH ir ABTS metodus. Pasirinktas augalas – *Stevia rebaudiana* B., buvo atliekamas šio augalo mikrodauginimas *in vitro*, pasirinkta WPM auginimo terpė. Stevijos augalas paveikiamas augimo reguliatoriais: giberelinu, abscizo rūgštimi, paklobutrazoliu, bei bakterijomis – *Paenibacillus* sp.

Mačiulskaitė, Brigita. Evaluation of the Influence of Growth Regulators and Bacteria of *Paenibacillus* Genus on *Stevia Rebaudiana* Bertoni Growth in *Vitro* Biological Active Compounds and Bioactivity. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), growth regulators, micropropagation, bioactive compounds.

Kaunas, 2021. 57 p.

### Summary

Cultivation of the stevia plant is globally widespread. Stevia contains natural sweeteners, which are commonly used in the food and drink industry, often as sugar substitute. Stevia plant also contains a large amount of bioactive substances that have positive properties for the human body and often used in medicine. As the demand for natural plants increases, plant growth regulators are increasingly used in agriculture. These substances increase yields, protect plants from environmental stress or various insects and pathogens. However, plant cultivation *in vitro* is becoming more common. This method of cultivation allows to regulate and create sterile and optimal growth conditions.

The aim of this work was to evaluate the influence of growth regulators and *Paenibacillus spp.* Bacteria on stevia growth *in vitro*, in terms of biologically active compounds and bioactivity. In this work, the total amount of phenolic compounds, flavonoids, chlorophylls *a* and *b* and carotenoids was determined. Evaluation of antioxidant activity was also performed using DPPH and ABTS methods. The selected plant – *Stevia rebaudiana* Bertoni. For this plant was performed micropropagation *in vitro*. The WPM growth medium was selected. Stevia plant was affected by growth regulators: gibberellin, abscisic acid, paclobutrazol, and bacteria of *Paenibacillus sp.*

## Turinys

<b>Santrumpų ir terminų sąrašas</b> .....	<b>8</b>
<b>Įvadas</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b> .....	<b>10</b>
1.1. Stevijos (lot. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) apibūdinimas .....	10
1.2. Biologiškai aktyvieji cheminiai junginiai stevijoje.....	12
1.2.1. Fenoliniai junginiai .....	13
1.2.2. Flavonoidai .....	13
1.2.3. Fotosintezės pigmentai .....	14
1.3. Augalų mikrodauginimas <i>in vitro</i> .....	14
1.4. Paklobutrazolis.....	15
1.5. Giberelinas .....	16
1.6. Abscizo rūgštis.....	18
1.7. <i>Paenibacillus</i> genties bakterijos .....	20
1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	21
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai</b> .....	<b>22</b>
2.1. <i>Paenibacillus</i> preparato paruošimas.....	22
2.2. Stevijos augalo mikrodauginimas <i>in vitro</i> .....	22
2.2.1. Mitybinės terpės sudėtis .....	22
2.2.2. Mitybinės terpės paruošimas .....	23
2.2.3. Mikrodauginimo procesas .....	23
2.3. Stevijos paruošimas ir eksperimento sąlygos .....	23
2.4. Biologiškai aktyviųjų junginių nustatymas .....	24
2.4.1. Mėginių paruošimas .....	25
2.4.2. Suminės fenolinių junginių koncentracijos nustatymas .....	25
2.4.3. Suminės flavonoidų koncentracijos nustatymas .....	25
2.4.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas.....	26
2.4.5. Fotosintezės pigmentų nustatymas.....	26
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas</b> .....	<b>28</b>
3.1. <i>Paenibacillus</i> bakterijos koncentracijos poveikis biologiškai aktyviųjų cheminių junginių sintezei.....	28
3.2. <i>Paenibacillus</i> bakterijos laikymo trukmės poveikis biologiškai aktyviųjų cheminių junginių sintezei stevijos augaluose.....	33
3.3. <i>Paenibacillus</i> bakterijos koncentracijos ir augimo reguliatorių poveikis stevijos vystymuisi ir biologiškai aktyviųjų cheminių junginių sintezei .....	39
<b>4. Rekomendacijų dalis</b> .....	<b>46</b>
<b>Išvados</b> .....	<b>49</b>
<b>Literatūros sąrašas</b> .....	<b>50</b>

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

WPM – McCown Woody Plant Medium mitybinė terpė;

S.M. – Sausosios medžiagos;

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

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonrūgštis);

PBZ – Paklobutrazolis;

ABR – Abscizo rūgštis;

GA – Giberelinas.

## Įvadas

Pastaraisiais metais vis dažniau yra naudojami mažai kalorijų turintys bei natūralūs saldikliai. Prognozuojama, kad jų poreikis ir toliau didės. Natūralūs ir sintetiniai saldikliai naudojami maisto ir gėrimų pramonėje, kaip cukraus pakaitalas, bei medicinoje, dėl teigiamo poveikio sveikatai. Dažnas žmogus labiau linkęs rinktis natūralius produktus, todėl vieni plačiausiai naudojamų natūralių saldiklių – steviozidas ir rebaudiozidas A, kurie yra gaunami iš *Stevia rebaudiana* augalo [1]. Steviozidas ir rebaudiozidas A pasižymi iki kelių šimtų kartų saldesnėmis už cukrų savybėmis. Šis augalas kultivuojamas daugelyje pasaulio šalių. Be plačiai naudojamų saldiklių, stevijoje yra gausu biologiškai aktyviųjų junginių, kurie turi teigiamą poveikį žmogaus sveikatai.

Biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai – tai augaluose susidariusios antrinės metabolinės medžiagos, kurios turi teigiamą arba neigiamą įtaką augalui ir žmogaus sveikatai. Stevijoje gausu antioksidantų (flavonoidų, fenolinių junginių ir kt.), kurie apsaugo augalą nuo laisvųjų radikalų fotosintezės metu, kadangi pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Šios medžiagos mažina uždegimus žmogaus organizme, gydo vėžinius, širdies ir kraujagyslių ligų susirgimus [2]. Taip pat antioksidacinėmis savybėmis pasižymi stevijos augaluose esančios pigmentinės medžiagos – karotinoidai, chlorofilai. Karotinoidai kaupia geltonos, oranžinės, raudonos ar violetinės spalvos junginius. Šie junginiai žmogaus organizme gali būti paverčiami vitaminu A [3]. Chlorofilai pasižymi žalios spalvos junginiais, kurie absorbuoja energiją reikalingą fotosintezės procesui. Taip pat šios medžiagos žmogaus organizme mažina uždegimą, gydo žaizdas, apsaugo nuo oksidacijos procesų [4].

Norint gauti didesnę natūralių naudingųjų medžiagų išėigą vis labiau yra plečiamas įvairių augalų auginimas kontroliuojamose sąlygose ir naudojamos augalų augimą reguliuojančios medžiagos. Kelios iš jų yra paklobutrazolis, giberelinas, abscizo rūgštis, taip pat biologiškai aktyviųjų junginių augaluose susidarymui teigiamos įtakos turinčios *Paenibacillus* genties bakterijos. Tačiau iki šiol nėra ištirtas šių medžiagų ir bakterijų poveikis stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) vystymuisi ir cheminių medžiagų sintezei.

**Tiriamąo darbo tikslas** – nustatyti augalų augimo reguliatorių ir *Paenibacillus sp.* bakterijų įtaką stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) vystymuisi, biologiškai aktyviųjų cheminių junginių sintezei ir bioaktyvumui.

Tiriamąo darbo **uždaviniai**:

1. ištirti *Paenibacillus* bakterijos koncentracijos poveikį *in vitro* išaugintos saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) biologiškai aktyviųjų cheminių junginių ir fotosintezės pigmentų sintezei;
2. įvertinti *Paenibacillus* bakterijos laikymo trukmės poveikį *in vitro* išaugintos saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni)) biologiškai aktyviųjų cheminių junginių ir fotosintezės pigmentų sintezei;
3. išanalizuoti *Paenibacillus* bakterijos koncentracijos ir augimo reguliatorių abscizo rūgšties (ABR), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir paklobutrazolio (PBZ) poveikį *in vitro* išaugintos saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) biologiškai aktyviųjų cheminių junginių ir fotosintezės pigmentų sintezei.



## 1. Literatūros apžvalga

Sparčiai besivystančioms maisto ir medicinos pramonės sritims, skiriamas vis didesnis dėmesys augalų derliaus didinimui, sveikatai naudingųjų medžiagų išskyrimui iš jų. Todėl labai svarbu ištirti įvairius augalus, sužinoti jų cheminę sudėtį bei savybes, atlikti tyrimus, kurie leistų pagerinti šių augalų vystymąsi ir padidinti panaudojimo galimybes.

### 1.1. Stevijos (lot. *Stevia rebaudiana* Bertoni) apibūdinimas

Stevija (*Stevia rebaudiana* Bertoni) – tai vaistažolė, daugiametis krūmas, priklausantis astrinių (*Asteraceae*) šeimai. Šiai šeimai priklauso daugiau kaip 200 stevijos rūšių, kelios iš jų: *S. rebaudiana*, *S. plummerae*, *S. salicifolia*, *S. ovata*, *S. eupatoria*, *S. micrantha*, *S. lemmoni*, *S. viscida*, *S. crenata* ir kt. [5]. Stevija yra kilusi iš Pietų Amerikos šalių: Paragvajaus, Brazilijos ir Argentinos [6]. Pirmą kartą šis augalas botaniškai aprašytas 1899 m. mokslininko Santiago Bertoni. *Stevia rebaudiana* ir kitos stevijos rūšys gali užaugti iki 1 m aukščio krūmų, šių augalų šaknys pasižymi dideliu šakotumu ir sumedėjusiu stiebu [7]. Rudenio laikotarpiu pradeda žydėti baltais, smulkiais žiedais (žr. 1.1 pav.) [8].



1.1 pav. Stevijos augalo besiskleidžiantys žiedai [9]

Praėjus keliems mėnesiams po žydėjimo pilnai susiformuoja sėklos, kurioms sudygti optimali temperatūra siekia 20 °C laipsnių [6]. Bręstant stevijos augalo sėklai, ji dažniausiai būna šviesios spalvos, sėkla subręsta per 45-60 dienų ir patamsėja [9]. Šio augalo sėklos pasižymi susiformavusiais, viename sėklos gale, plaukeliais (žr. 1.2 pav.). Šie plaukeliai, dar vadinami ūseliais, leidžia sėkloms plačiai pasklisti po dirvožemį. Tačiau sėklos yra labai smulkios ir sunkiai prisitaiko prie aplinkos, todėl stevijos sėklų daigumas siekia tik iki 50 % [9].



**1.2 pav.** a) bręstanti ir b) subrendusi stevijos augalo sėkla [9]

Daugiausia stevijos augalų auga kalnuotose pusiau drėgnose vietovėse, kuriose yra rausvo molio dirvožemis. Tokio dirvožemio pH 6,5-7,5. Taip pat pastebėta, kad stevijos augalai netoleruoja žemų žiemos temperatūrų, todėl puikiam augimui oro temperatūra gali svyruoti nuo 15 °C iki 30 °C laipsnių [7]. Nors natūraliai stevija randama Pietų Amerikoje, tačiau jų auginimas sėkmingai plečiamas visame pasaulyje bei atliekami įvairūs šio augalo tyrimai. Komerciškai auginama dėl sudėtyje esančių natūraliųjų saldiklių – steviolio glikozidų. Vieni iš plačiausiai naudojamų steviolio glikozidų yra steviozidas, kuris sudaro iki 80 % visų steviolio glikozidų stevijoje, ir rebaudiozidas A, kuris sudaro iki 10 % visų steviolio glikozidų stevijoje [10]. Šio augalo sausų lapelių milteliuose steviozidas sudaro iki 20 %, o rebaudiozidas A iki 4 % [10-12]. Šie junginiai yra kelis šimtus kartų saldesni už cukrų: steviozidas iki 300 kartų, o rebaudiozidas iki 450 kartų saldesnis už sacharozę [10]. Be šių saldiklių sausuose stevijos lapelių milteliuose yra ir kitų saldiklių: rebaudiozidas C, D, E, F, dulkozidas A, steviozidas, rubusozidas. Tačiau jų bendras kiekis stevijos lapelių milteliuose gali siekti tik iki 2 % [11]. Iš augalo lapų išgauti saldikliai plačiai naudojami maisto ir gėrimų pramonėje kaip skonio stipriklis. Steviolio glikozidai pagal galiojančius reglamentus yra žymimi E 960, o jų kiekiai yra ribojami. Galiojantis Komisijos Reglamentas (EB) Nr. 1333/2008 nurodo leistinus naudoti steviolio glikozidų kiekius įvairiuose maisto produktuose, o galiojančiame Komisijos Reglamente (ES) Nr. 2016/1814 steviolio glikozidai apibūdinami kaip baltos arba šviesiai geltonos spalvos milteliai, maždaug 200-350 kartų saldesni nei sacharozė (kai sacharozės ekvivalentiškumas 5 %) [13].

Nuo senųjų laikų stevijos lapai buvo naudojami medicinoje, lėtinių ir nelėtinių ligų gydymui: diabetui, nutukimui, uždegiminei žarnyno, širdies ir kraujagyslių, dantų ėduoniui, vėžiui, inkstų ir kitų ligų gydymui [14]. Todėl ir šiais laikais vis daugiau yra atliekama tyrimų, kurie parodo šio augalo teigiamą poveikį sveikatai.

Per pastaruosius 50 metų cukraus suvartojamas ženkliai išaugęs. Taip pat padidėjo ir sveikatos problemos susijusios su per dideliu cukraus suvartojimu. Ne vienerius metus mokslininkai bandė įrodyti, kad suvartoto cukraus kiekis yra glaudžiai susijęs su nutukimu bei rizika susirgti cukriniu diabetu. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad daugiau suvartojus 10 proc. daugiau cukraus kiekio nei rekomenduojama, padidina širdies ir kraujagyslių ligų, cukrinio diabeto, nutukimo, burnos ertmės ligų, nealkoholinės riebalų kepenų ligos, kognityviniai sutrikimai ar net vėžinius susirgimų riziką [15]. Diabetas ir viršsvoris padidina lėtinių ligų sergamumą ir asmenų mirtingumą [16]. Sprendžiant

susirgimo pavojų buvo sugalvota ir priimta naudoti cukraus pakaitalą – saldiklius. Nustatyta, kad kai kurie saldikliai yra kalorijų neturinčios medžiagos [17]. Pastebėta, kad vartojant maistą, kuriame yra steviolio glikozidų, sumažėja kraujyje cukraus bei insulino kiekiai [4]. Taip pat mažina kraujo spaudimą, mažina vėžinius susirgimus, gerina inkstų funkcionavimą, mažina nutukimą, apsaugo dantis nuo ėduonies bei žarnyną, nuo uždegiminių ligų [14]. Be steviolio glikozidų stevijoje gausu ir kitų biologiškai aktyviųjų cheminių medžiagų, kurios naudingos žmogaus sveikatai. Kurį laiką, nuo 1991 m., saldikliai buvo uždrausti vartoti Amerikoje, dėl neigiamo poveikio žmonių sveikatai. Buvo iširti keletas sintetinių saldiklių ir įrodyta, kad jie gali sukelti smegenų auglį, šlapimtakių vėžį ir kitas ligas [18], tačiau pradėjus tirti natūralius saldiklius, pavyzdžiui, tokius kuriuos galima išgauti iš stevijos augalo, buvo patvirtinta jo nauda ir netoksiškumas žmogaus organizmui [19]. Todėl nuo 2008 m. Amerikoje pradėta plačiai naudoti steviolio glikozidai, ypač gėrimų pramonėje. Stevija pradėta laikyti funkcinio maisto komponentu [20].

Pradėjus leisti vartoti steviolio glikozidus padidėjo stevijos augalų poreikis visame pasaulyje. Pradėtas plėsti šio augalo kultivavimas. Dažnai didinant augalų derlius yra naudojami įvairūs pesticidai, augalų augimo regulatoriai, kurie skatina augalų augimą bei vystymąsi, apsaugo augalus nuo aplinkos sukkelto streso ar įvairių patogenų bei vabzdžių. Natūraliai augaluose susidaro medžiagos, kurios atsakingos už augalo vystymąsi. Dažnai šios medžiagos yra augalų hormonai. Vieni hormonai skatina, kiti priešingai, neleidžia augalui formuotis. Šių medžiagų balansas yra svarbus faktorius augalų augimo procesuose. Be augalų hormonų yra įvairių bakterijų, kurios taip pat turi didelę įtaką augalams formuoti. Iki šiol dar nėra iširta, kokią įtaką *Paenibacillus* genties bakterijos bei augalų augimo hormonai, tokie kaip giberelinas, paklobutrazolis ar abscizo rūgštis, turi stevijos augalui augti.

## **1.2. Biologiškai aktyvieji cheminiai junginiai stevijoje**

Biologiškai aktyvieji cheminiai junginiai – tai biologinį aktyvumą turinčios medžiagos, kurios dalyvauja įvairiuose biologiniuose procesuose. Tai dažniausiai yra antrinės metabolinės medžiagos. Daugelis tokių junginių turi teigiamą poveikį žmogaus organizmui bei augalams, todėl yra vertinami ir naudojami farmacijos, maisto, gyvūnų pašarų ir žemės ūkio pramonėje. Biologiškai aktyviųjų cheminių junginių gausu augaluose, vaisiuose. Šių junginių žmogaus organizmas gauna vartodamas augalinį maistą.

Stevijoje gausu įvairių antioksidantų bei pigmentinių medžiagų, kurios susidaro augalo augimo procesuose. Antioksidacinėmis savybėmis pasižymi fenoliniai junginiai, flavonoidai, taip pat ir fotosintezės pigmentai: chlorofilai, karotinoidai. Fotosintezės metu susidaro pigmentinės medžiagos, kurios augalui ar jo vaisiams suteikia spalvą. Chlorofilai atsakingi už žalią ar mėlynai žalią spalvą, tuo tarpu karotinoidai pasižymi oranžine, geltona ar raudona spalvomis. Nors stevijoje be šių medžiagų yra ir kitų biologiškai aktyviųjų cheminių junginių, tačiau fenoliniai junginiai, flavonoidai, chlorofilai ir karotinoidai yra vieni iš svarbiausių [21].

Antioksidantai yra svarbūs biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai saugantys žmogaus organizmą nuo radioaktyviųjų dalelių. Laisvieji radikalai paveikdami gyvasias organizmo ląsteles jas modifikuoja ar pažeidžia. Pažeistos ląstelės neatlieka savo funkcijų ir neapsaugo žmogaus organizmo. Dažnai dėl šios priežasties išsivysto vėžiniai susirgimai, nes įvyksta DNR struktūros pokyčiai ar lipidų peroksidacijos procesai [22]. Radioaktyviosios dalelės dažniausiai atsiranda, kai medžiagos yra paveikiamos įvairiomis spinduliuotėmis. Tuo metu susidaro reaktyvioji dalelė, kuri greitai

reaguoja su kitais junginiais, sudarydama reakcijų grandinę ir žmogaus sveikatai pavojingus junginius. Šią grandininę reakciją gali nuslopinti antioksidantai, prie savo struktūros prisijungdami laisvuosius radikalus [23]. Dėl šios priežasties antioksidantai yra labai svarbūs biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai žmogaus sveikatai. Maisto pramonėje antioksidantai, stabdydami įvairias nepageidaujamas reakcijas, naudojami maisto produktų galiojimui prailginti.

### **1.2.1. Fenoliniai junginiai**

Polifenoliniai junginiai yra antriniai augalų metabolitai. Skirtingi jų kiekiai randami visuose augaluose ir vaisiuose. Fenolinių junginių kiekis įvairiuose vaisiuose vidutiniškai gali siekti iki 15 % S.M. [24]. Šie junginiai pasižymi priešvėžinėmis savybėmis, padeda gydyti cukrinį diabetą bei išvengti kraujagyslių ir širdies ligų. Polifenoliai pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, jų struktūra leidžia sumažinti laisvųjų radikalų aktyvumą.

Šie biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai yra vandenilių arba elektronų donorai, todėl stabilizuoja ir delokalizuoja neporinį elektroną, taip užbaigdami grandininę laisvųjų radikalų reakciją, suformuodami chelatus [25]. Todėl laisvieji radikalai nebegali neigiamai paveikti sveikų organizmo ląstelių. Nors kai kurie sintetiniai antioksidantai padeda apsaugoti organizmą nuo laisvųjų radikalų poveikio, tačiau dažnai pasižymi neigiamomis savybės žmogaus organizmui. Tuo tarpu natūralūs antioksidantai tokiomis neigiamomis savybėmis nepasižymi ir yra saugūs bei labiau vertinami. Be laisvųjų radikalų apsaugos, fenoliniai junginiai atlieka ir kitas apsaugines funkcijas: sustiprina imuninę sistemą, naikina patogeninius mikrobus [25].

Fenoliniai junginiai maisto pramonėje naudojami ne tik praturtinant maisto produktus biologiškai aktyviomis cheminėmis medžiagomis, bet taip pat jie leidžia prailginti produkto galiojimo laiką, kadangi šie junginiai stabdo riebalų degradaciją, gaunami aukštesnės kokybės produktai.

Augaluose fenoliniai junginiai atlieka apsauginę ir gynybinę funkciją prieš ligas ir patogenus [26-28]. Mokslininkų atliktais tyrimais nustatyta, kad šių junginių kiekis stevijoje gali siekti iki 61,50 mg/g galo rūgšties ekvivalentu [29]. Vieni iš daugiausiai susidarančių fenolinių junginių stevijoje yra fenolinės rūgštys bei flavonoidai. Chlorogeninė rūgštis ir jos dariniai yra fenolinės rūgštys, iš kurių 33 aptinkamos stevijoje. Keletas iš šio augalo lapų etanolinio ekstrakto išskirtų fenolinių rūgščių yra trans-5-O-kafeoilchino rūgštis, 3,5-dikafeoilchino rūgštis, kaempferol-7-O-dihidroksizidas ir kt. [30]. Tuo tarpu net 22 junginiai išskirti iš etanolinio stevijos lapų ekstrakto ir identifikuoti kaip flavonoidai: rutinas, dikafeoilchino rūgšties izomeras, apigenin-7-O-heksozidas ir kt. [30].

### **1.2.2. Flavonoidai**

Flavonoidai junginiai yra antriniai augalų metabolitai, kurie randami vaisiuose ir daržovėse. Šie junginiai augaluose dažniausiai randami glikozido susijungusio su cukrais forma. Pavyzdžiui, gliukozė, galaktozė, ramozė, arabinozė, ksilosė ar rutinozė konjuguotai prisijungusi prie glikozido vienos ar kelių fenolinės hidroksi- grupės [24].

Flavonoidai turi stiprų apsauginį poveikį, apsaugantį žmogų nuo įvairių ligų. Šie junginiai veikia kaip priešvirusinės, priešalerginės, priešvėžinės priemonės [31]. Augaluose flavonoidai atsakingi už augalų aklimatizaciją. Jie sintetunami skirtingose augalo dalyse, suteikia augalui spalvą ir kvapą, taip pat padeda jam vystytis ir augti [32]. Augalo viduje flavonoidai veikia kaip signalinės molekulės, detoksikantai, antimikrobiniai junginiai [33].

Mokslininkų atliktais tyrimais nustatyta, kad steviją paveikus azoto trąšomis didžiausia bendroji flavonoidų koncentracija gali siekti 104,03 mg/g S.M. [34]. Taip pat nustatė, kad luteolin-7-O-gliukozidas yra pagrindinis flavonoidas stevijos augaluose, kuris sudaro iki 74 % bendrą flavonoidų kiekį [34]. Stevijos lapų etanoliniame ekstrakte aptinkama net 22 skirtingi flavonoidai [30].

### 1.2.3. Fotosintezės pigmentai

Fotosintezės metu susidaro pigmentinės medžiagos. Šios medžiagos suteikia augalui ar jo vaisiams būdingą spalvą. Chlorofilai sudaro žalius ar mėlynai žalius, o karotinoidai – oranžinius, geltonus ar raudonus junginius. Chlorofilai labai svarbūs augalams, dėl savo gebėjimo sugerti saulės šviesos energiją ir ją panaudoti fotosintezės vykdymui [25]. Tai pagrindiniai fotosintezės pigmentai, susiję su augimo potencialu ir produktyvumu [36]. Karotinoidai, absorbuodami mėlyną ir žalią šviesą, paverčia ją energija ir perduoda chlorofilams, kas padidina fotosintezės efektyvumą augale [37].

Alexieva ir kt. nurodė, kad karotinoidai yra antioksidantai, apsaugantys augalų ląsteles nuo patiriamo streso [38]. Taigi, fotosintezės pigmentai parodo augalo būklę ir produktyvumą. Augalui pradėjus keisti spalvą, galima suprasti, kad augalas patiria biotinį ar abiotinį stresą: vandens, maistinių medžiagų, šviesos trūkumą, vambzdžių ar kitų padarinių padarytas žaizdas ir sukeltas ligas. Augalui patyrus stresą padidėja karotinoidų koncentracija ir sumažėja chlorofilų koncentracija, todėl augalai dažniausiai pageltonuoja. Šių pigmentinių medžiagų koncentracijos nustatomos spektrofotometriniais arba didelio efektyvumo skysčių chromatografiniais metodais [39, 40].

Chlorofilas, kaip svarbiausias ir gausiausias fotosintezės proceso pigmentas, absorbuojantis šviesą, yra esminis veiksnys optimaliam augalų augimui. Chlorofilo *a* ir *b* tinkamas santykis užtikrina efektyvų fotosintetinio aparato veikimą [41]. Optimalus chlorofilo *a* ir *b* santykis, kuris paprastai yra 3:1, užtikrina maksimaliai efektyvų fotosintezės procesą, o tuo pačiu pasiekiamas didžiausias augalo produktyvumas [42]. Chlorofilų koncentracija augaluose gali būti nustatoma fluorescenciniais metodais. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad fotosintezės metu padidinus šviesos intensyvumą chlorofilų kiekis augaluose padidėja [43]. Svarbiausi parametrai yra augalų ekstrakto paruošimas, naudojamas tirpiklis, temperatūra, slėgis ir laikas. Mokslininkų atlikti tyrimai parodė, kad chlorofilo *a* stevijoje gali susidaryti iki 2,5 μmol/g, chlorofilo *b* – iki 1,8 μmol/g, o karotinoidų – iki 0,8 mg/g šviežios masės [44].

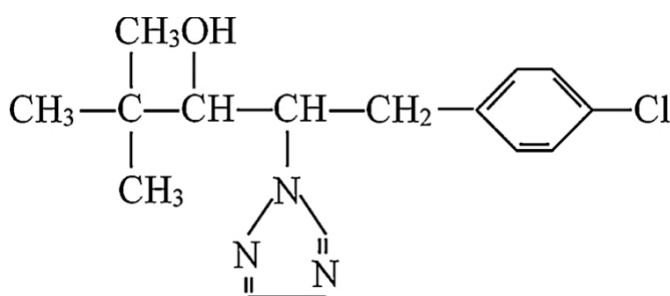
### 1.3. Augalų mikrodauginimas *in vitro*

Mikrodauginimas – tai greitas pasirinkto augalo dauginimas naudojant *in vitro* kultūros metodus. Augalų audinių kultūros potencialas yra gerai pripažintas, nes jis didina žemės ūkio produkciją. Nors dauginimas padeda didinti augalų kultūrą per trumpą laiką ir užtenka mažo pradinės medžiagos kiekio. Nors pats mikrodauginimo procesas yra pigus, tačiau patalpų įrengimas šiam procesui – brangus. Mikrodauginimui atlikti reikalingos ypatingai sterilios sąlygos, įrengtos patalpos su tam pritaikytais įrenginiais, taip pat naudojami grynai reagentai, sterilūs vienkartiniai ar pakartotiniai sterilizuojami daugkartiniai indai. Mokslininkai atlieka vis daugiau tyrimų, norėdami pagerinti mikrodauginimo metodus, padidinti norimų augalų derlių, sumažinti šio proceso ir patalpų įrengimo kainą. Mikrodauginimo *in vitro* privalumai: spartus dauginimo greitis, maži cheminių medžiagų sunaudojimo kiekiai, nedidelio ploto reikalaujantis procesas, didelis augalų šaknijimasis ir išgyvenimo procentas, visapusiškai reguliuojamas procesas, užtikrinama saugi ir sterili aplinka. Iš pradžių augaluose kurie yra mikrodauginami atsiranda tam tikri morfologiniai pokyčiai, tačiau laikui

bėgant jie mažėja [9]. Augalų fenotipų skirtumas gali būti laikomas laikinu arba nuolatiniu. Laikini pokyčiai apima padidėjusį šakojimąsi, didesnę jautrumą ligoms ir vienodo atsako į dirgiklius trūkumą. Tokiu būdu padaugintus augalus reikia stebėti, tam kad gauti ilgalaikius duomenis apie jų augimą, išlikimą, derlingumą ir atsparumą ligoms lauko sąlygomis, nes yra dar labai nedaug informacijos apie daugelį augalų.

#### 1.4. Paklobutrazolis

Įvairių augalų derliui padidinti vis dažniau yra naudojami augalų augimo reguliatoriai. Šie reguliatoriai ne tik padidina ar sumažina augalų vystymąsi, bet neretai padidina augalo atsparumą į patiriamą aplinkos stresą, apsaugo nuo kenkėjų ir įvairių patogenų. Vienas iš plačiai naudojamų triazolo grupės augalų augimo reguliatorių yra paklobutrazolis. Šio junginio cheminė struktūrinė formulė pateikta 1.3 paveiksle.



1.3 pav. Paklobutrazolio cheminė struktūrinė formulė [45]

Paklobutrazolis – tai sintetinis augimo reguliatorius. Šis triazolo grupės junginys yra gaunamas keliais būdais. Vienas iš keleto ir dažnai naudojamo paklobutrazolio sintetninimo metodų yra vykdant 1,2,4-triazolo ir 1-chloro-3,3-dimetil-2-butanono kondensaciją. Susidaręs junginys 1-(3,3-dimetil-2-oksobutil)-1,2,4-triazolas toliau kondensuojamas su 4-chlorobenzaldehidu ir taip gaunamas paklobutrazolis, kuris vėliau yra kristalizuojamas ir gryninamas įvairiais tirpikliais [46]. Vieni iš dažniausiai naudojamų ir rekomenduojamų paklobutrazolio gryninimui tirpiklių yra etanolis arba acetonitrilas.

Keletas mokslininkų tyrė paklobutrazolio termodinamines savybes ir tirpumą įvairiuose organiniuose tirpikliuose: toluene, 1,4-dioksane, acetone, 1-butanolyje, n-propanolyje, etanolyje, izopropanolyje, acetonitrile, etilo acetate. Tyrimais įrodyta, kad keliant temperatūrą tiriamosios medžiagos tirpumas didėja ir didžiausią tirpumą pasiekia panaudojant tolueno tirpiklį, esant 318 K (45 °C) temperatūrai [46]. Šis Xinbao Li ir kt. mokslininkų atliktas bandymas leidžia pasirinkti tinkamą tirpiklį ir temperatūrą norint optimizuoti paklobutrazolio gryninimo procesą.

Triazolai pasižymi fungicidinėmis ir augalų augimą reguliuojančiomis savybėmis. Paklobutrazolis yra žinomas kaip antagonistas augaluose natūraliai esantiems hormonams giberelinui ir abscizo rūgščiai [46, 47]. Jis veikia inhibitoriškai giberelino biosintezę, sumažindamas tarpmezginį stiebo augimą, taip augalas įgauna stambius, tvirtus stiebus, todėl augalai užauga žemesni bei tvirtesni. Taip pat paveikus paklobutrazoliu padidindamas šaknų augimo greitis, kuris lemia ankstyvą gausų derliaus susiformavimą [46].

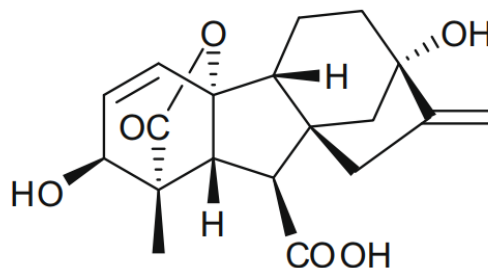
Mokslininkų atliktais tyrimais nustatyta, kad mažos koncentracijos paklobutrazolio tirpalas (26  $\mu\text{M}$ ) nepaveikia kai kurių augalų ląstelių augimo. Tačiau padidinus šio junginio koncentraciją iki 52  $\mu\text{M}$  ir daugiau ląstelių augimo greitis smarkiai sumažėjo [47]. Taip pat kiti mokslininkai tyrinėję paklobutrazolio įtaką augalui, nustatė, kad šis junginys ne tik slopina augalų stiebų augimą, didina šaknų augimo greitį, bet ir apsaugo augalą nuo grybelių ir patogeninių bakterijų [46], o svarbiausia padidina toleranciją biotiniui ir abiotiniui stresui [48]. Nustatyta, kad PBZ apsaugo augalą nuo aplinkos sukkelto streso padidindamas antioksidacinį aktyvumą arba sumažindamas oksidacinių fermentų aktyvumą augalo viduje [48]. S. Moradi ir kt. mokslininkai tyrė granatų daigų atsparumą po sukkelto 7 valandų  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrinio streso, naudodami skirtingos koncentracijos paklobutrazolio tirpalą purškiant lapus arba drėkinant dirvą šiuo tirpalu. Tyrimo metu nustatė, kad paklobutrazolis padidino atsparumą sukeltam stresui, santykinį chlorofilų kiekį lapuose, santykinį drėgmės kiekį, tirpių angliavandenių kiekį, askorbato peroksidazės ir gvajakolio peroksidazės fermentinį aktyvumą. Eksperimento metu nustatyta, kad didžiausia atsparumą stresui augalas įgauna naudojant 50 mg/l arba 75 mg/l koncentracijos paklobutrazolio tirpalą, taip pat ištyrė, kad paklobutrazolio tirpalą augalas puikiai pasisavina tiek apipurškiant augalą, tiek drėkinant dirvą šiuo tirpalu [48]. Taip pat kitų mokslininkų tyrimo metu nustatyta, kad paklobutrazolis sumažina fenolinių ir kitų biologiškai aktyviųjų cheminių junginių kiekius raudonšaknio šalavijo augale [47]. Mokslininkų tyrimuose galima pastebėti, kad paklobutrazolis įvairius augalus veikia skirtingai. Vienuose augaluose sumažina, kituose padidina arba nedaro jokios įtakos biologiškai aktyviųjų cheminių junginių susidarymui. Todėl kategoriškai teigti, jog šis junginys didina arba mažina biologiškai aktyviųjų cheminių medžiagų susidarymą augaluose negalima.

Dėl derliaus didinimo savybių paklobutrazolio pesticidai plačiai naudojami agrikulturnoje, ypač didelę įtaką daro ryžių, kviečių, žemės riešutų, vaisinių medžių ir vejų auginimui. Kadangi pesticidų kiekiai yra ribojami maisto produktuose, todėl svarbu užtikrinti leistiną jų kiekį. Daugelis mokslininkų pesticidų kiekiams nustatyti naudoja dujų chromatografijos, aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC), ultra aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos - tandeminės masių spektroskopijos (UPLC-MS/MS) metodus ir imunologinius tyrimus. Dėl šiuose metoduose naudojamų brangių ir didelių kiekių reagentų, vis dažniau naudojami greiti paklobutrazolio pesticidų likučių nustatymai panaudojant fluorescencijos spektrų analizę, kiekybiniam tyrimams atlikti. Paklobutrazolis užfiksuojamas 321-341 nm bangos ilgiuose [45]. Imunologiniai tyrimai nors ir mažiau tikslūs nei chromatografiniai metodai, bet yra pigesni, greitesni todėl puikiai tinka greitam paklobutrazolio kiekiui nustatyti vandens telkiniuose ir dirvoje [49].

### 1.5. Giberelinas

Kaip jau minėta anksčiau, giberelino biosintezę slopina augimo reguliatorius paklobutrazolis. Giberelinas – hormonas, kuris randamas augaluose ir grybuose. Augaluose yra daug mažesnė šio junginio koncentracija nei grybuose. Giberelino pavadinimas kilęs nuo grybų *Gibberella fujikuroi* – tai ryžių patogenai, kurie lemia stiebų peraugimą [50]. Šis natūralus augalo augimo reguliatorius, turi didelę įtaką augalo formavimuisi. Jis yra pagrindinis hormonas atsakingas už augalų žiedų vystymąsi. Taip pat šis junginys skatina augalų augimą, dalyvauja antriniuose metabolitų susidarymo procesuose. Egzistuoja nemažai giberelino rūšių. Šie junginiai yra tetracikliniai diterpenai ir tik keli iš 126 giberelinų yra ištirti kokią įtaką turi sėklų daigumui, daigų formavimosi procesui, stiebo pailgėjimui, augalų žiedų bei vaisių formavimuisi [50, 51]. Giberelinai skiriasi pagal jų tipus ir funkcinių grupių išsidėstymą molekulėje. Giberelinų rūšys numeruojamos pagal jų atradimo

eiliškumą ( $GA_1, GA_2 \dots GA_n$ ). Žemiau pateikta giberelino  $GA_3$  cheminė struktūrinė formulė (žr. 1.4 pav.).

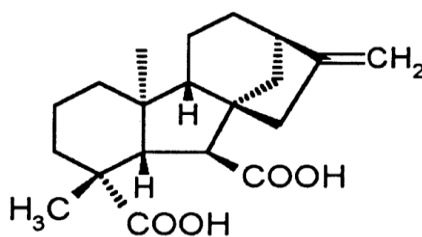


1.4 pav. Giberelino  $GA_3$  cheminė struktūrinė formulė [52]

Viena augalo rūšis savyje turi daugiau kaip 20 skirtingų giberelino rūšių, tačiau tik vienas iš jų pasižymi būdingu biologiniu aktyvumu ir aktyviomis hormoninėmis savybėmis. Likusios giberelino rūšys yra aktyvaus hormono deaktyvuoti produktai. Giberelinai:  $GA_1, GA_3, GA_4$  ir  $GA_7$ , yra labiausiai aktyvūs. Jų aktyvumas skiriasi skirtinguose augaluose. Giberelinai augaluose randami vegetatyvinio dauginimosi meristemų audiniuose, kuriuose giberelinų koncentracija svyruoja nuo 0,1 iki 100 ng/g šviežios masės. Pradėjus formuotis sėkloms šių junginių koncentracija gerokai padidėja [50].

Giberelinų biosintezę galima padalinti į tris stadijas [50]:

1. pirmoji stadija - tetraciklinio angliavandenilio ir ent-kaureno biosintezė plastidėse,
2. antroji stadija, ent-kaurenas oksidacija, susiformuojant pirmajai giberelino formai -  $GA_{12}$  (žr. 1.5 pav.). Šis procesas vyksta endoplazminiame tinkle,
3. trečioji stadija vyksta citozolyje, kuriame formuojamos ir padauginamos įvairios giberelinų atmainos.



1.5 pav. Giberelino  $GA_{12}$  cheminė struktūrinė formulė [52]

Įvairūs giberelinų dariniai, papildomai sudaryti iš dviejų  $\alpha, \beta$ -nesotaus ketono, pasižymi antivėžiniu aktyvumu [52]. Taip pat nustatyta, kad giberelinas antagonistiskai veikiamas abscizo rūgšties, todėl ji laikoma inhibitorine medžiaga giberelino veikimui [47]. Mokslininkai tyrinėja, kokią reikšmę giberelinas turi augalams vystytis. Jingiang Zhang ir kt. mokslininkai stebėjo augalo *Pseudostellaria heterophylla* šaknų formavimąsi panaudojant gibereliną, nustatė, kad šaknų diametras sumažėjo, nors jų ilgis padidėjo. Tačiau slopinant giberelino biosintezę su paklobutrazoliu sulėtėjo stiebo augimo greitis, skatindamas ksileno susidarymą, kuris padidina gumbinių šaknų vystymąsi [53]. Giberelinas augalo stiebo viduje skatina ląstelių dalijimąsi ir taip leidžia užaugti ilgesniam augalo stiebui. Augalui patyrus stresą ar užsikrėtus ligomis, hormonų pusiausvyrą yra išbalansuojama, todėl įvairios augalo



dalys sustoja vystytis. Jingiang ir kt. nustatė, kad paveikę augalą giberelinu yra išbalansuojami endogeniniai hormonai, kurie paveikia gumbinių šaknų formavimąsi. Po 60 dienų kasdien augalus laistant 150 mg/l giberelinų tirpalu, stiebai ilgėjo, padidėjo lapų kiekis bei augalo svoris, laistant 75 mg/l šiuo tirpalu, pailgėjo šaknų ilgis, tačiau sumažėjo gumbinių šaknų diametras, kartu mažėjant ir svoriui [53]. Tiriant giberelino poveikį ne tik šaknims bet ir stiebo ar žiedų vystymuisi, pastebėta, kad augalą paveikus giberelino tirpalu išauga gana aukšti augalai bei žiedų pumpurai susiformuoja ir prasiskleidžia anksčiau, suformuodami ankstyvą derlių. Inhibitorinėmis medžiagomis prislopinus giberelino sintezę augalai auga ir formuojasi lėčiau [50].

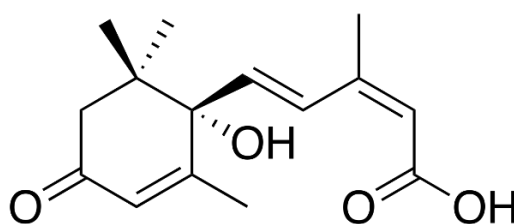
Giberelinas svarbus fitohormonas, kuris augalams suteikia ne tik pastebimus pokyčius, bet ir didina atsparumą aplinkos sukeltam stresui padidina biologiškai aktyviųjų cheminių junginių kiekius augalo viduje. Būtent šis junginys padidina augalų atsparumą sausrui, potvyniams ir ligoms [53]. Mokslininkai tyrinėdami giberelino poveikį biologiškai aktyviems junginiams susidaryti, pastebėjo, kad juo paveikus augalą susidaro didesni kiekiai fenolinių junginių. Zongsuo Liang ir kt. tyrė giberelino poveikį raudonšaknio šalavijo cheminės sudėties pokyčius. Mokslininkai nustatė, kad šis hormonas padidina fenolinių junginių koncentraciją, kadangi padidina fermentų, kurie atsakingi už fenolinių junginių susidarymą, aktyvumą augalo šaknyse. Taip pat ištyrė giberelino koncentracijos įtaką šių junginių susidarymui ir nustatė, kad veikiant 100  $\mu\text{M}$  ir didesnės koncentracijos giberelino tirpalu yra pasiekiamas gerokai didesnis biologiškai aktyviųjų cheminių junginių kiekis. [47].

Dėl savo savybių giberelinas dažniausiai naudojami sodininkystėje, agronomijoje ar net alaus gamyboje. Alaus gamyboje šis hormonas naudingas tuo, kad grūdo embrio sluoksnyje skatina  $\alpha$ -amilazės biosintezę, kuri vėliau katalizuoja grūduose esantį krakmolą išskirdama energiją. Ši energija panaudojama grūdų daigų augimui padidinti [50].

## 1.6. Abscizo rūgštis

Prieš 70 metų mokslininkai iš augalų išskyrė rūgštis, kurias identifiko plonasluoksnės chromatografijos metodu. Pastebėjo, kad augaluose yra įvairių augimo hormonų. Abscizo rūgštis viena iš jų. Dar kitaip šis natūralus junginys vadinamas augalo streso hormonu. Šis hormonas atrastas prieš daugiau nei 50 metų, jis pradeda kauptis augalui patyrus aplinkos stresą, pavyzdžiui, sausrą, šaltį, padidėjusį druskingumą [54]. Abscizo rūgštis leidžia augalui adaptuotis, apsisaugoti nuo patiriamo streso ir toliau puikiai vystytis.

Abscizo rūgštis – tai terpenoidas, nors natūraliai randamas yra S enantiomeras, tačiau komerciškai naudojamas S ir R abscizo rūgšties enantiomerų mišinys. Abu šie enantiomerai pasižymi fiziologiniu aktyvumu [55]. Šis hormonas sintetinamas beveik visose ląstelėse, kuriose yra chloroplastų arba amiloplastų [54]. Taip pat randamas kai kuriose bakterijose, grybuose, augaluose. Jo cheminė struktūrinė formulė pateikta 1.6 paveiksle.



1.6 pav. Abscizo rūgšties cheminė struktūrinė formulė [54]

Augaluose ABR biosintezė vyksta iš karotinoidų. Biosintezės reakcijos prasideda chloroplastuose arba kitose plastidėse [54]. Endogeninė abscizo rūgštis yra sintetinama iš ksantofilų ir kaupiama augaluose veikiant sausros, druskos, sausėjimo, šalčio ar infekcijos sukeltam stresui [56].

Moksliniais tyrimais įrodyta, kad giberelinas antagonistiskai veikia abscizo rūgšties biosintezę. Todėl šių dviejų medžiagų kiekių reguliavimas augalo viduje yra labai svarbus, ypač augalui pereinant nuo embriogenezės iki sėklų daiginimo proceso [47]. ABR hormonas padeda augalams suformuoti sėklas. Abscizo rūgštis dažniau naudojama kaip augalų augimo inhibitorius. Ji stabdo augalo ilgėjimą, skatina šaknų išsišakojimą, o augalui patiriant stresą, kai yra vandens trūkumas, šis hormonas slopina etileno sintezę ir taip skatina šaknų augimą, ilgėjimą. Jingiang Zhang ir kt. mokslininkai atliko tyrimą, kurio metu nustatė, kad *Pseudostellaria heterophylla* augalas paveiktas ABR padidino gumbuotų šaknų diametrą [53]. Abscizo rūgštis dalyvauja įvairiuose augalo formavimosi etapuose: embriono formavime, sėklos brandinime, sėklos ramybės būsenoje ir daiginimo procese, daigų vystyme, vegetaciniame vystymesi, šaknų augime, stomaliniame judėjime, žydėjime, reakcijoje į patogenus, augalo senėjime. Taip pat ji didina augalo atsparumą abiotiniam stresui (t.y. sausrai, druskingumai, žemai temperatūrai). [54]. Timothy J. Buran ir kt. ištyrė ar išoriškai augalą paveikus ABR pakinta šilauogių (lot. *Vaccinium darrowii*) vaisių kokybė. Tyrimai parodė, kad paveikus šio hormono tirpalu gaunamos tvirtesnės uogos, kadangi ABR prislopino vaisiaus nokinimą [57].

Abscizo rūgštis dalyvauja antriniuose metabolitų susidarymo procesuose, todėl padidinus jos koncentraciją augalų auginimo metu, pastebima, kad augalo sudėtyje padaugėja fenolinių rūgščių kiekis. Zongsuo Liang ir kt. tyrinėjo fenolinių rūgščių susidarymą raudonšaknio šalavyjo šaknyse, paveikus šiuo hormonu, nustatė, kad ABR padidina fenolinių rūgščių susidarymą, kadangi padidina tose reakcijose dalyvaujančių fermentų (fenilalanino amonio liazės ir tirozino aminotransferazės) aktyvumą [47].

Taip pat šis augalo augimo reguliatorius turi savybę padidinti antioksidantų kiekį ne tik augalo šaknyse, bet ir vaisiuose ar daržovėse. Timothy J. Buran ir kt. ištyrė ar išoriškai augalą paveikus abscizo rūgštimi pakinta šilauogių augalo (lot. *Vaccinium darrowii*) antioksidantų kiekis, fitocheminė sudėtis. Ši mokslininkų komanda nustatė, kad ABR neturėjo reikšminės įtakos šilauogių augalo antioksidantų ir fitocheminių junginių (anticianinų, flavonoidų, fenolinių rūgščių) kiekio pakitimui. Tačiau mokslininkai pastebėjo, kad pačių šilauogių augalo uogų maistinė vertė padidėjo. Kituose Li Zhao Gu ir kt. mokslininkų tyrimais nustatyta, kad abscizo rūgštis, nors ir sumažino augalų derlių, tačiau gerokai padidina antocianinų kiekį raudonlapėse salotose, kartu padidindama chlorofilo *b* ir bendrą karotinoidų kiekį žalialapėse salotose [57, 58]. Antioksidantai ir fitocheminiai junginiai turi teigiamą poveikį sveikatai, todėl medicinoje didelis dėmesys skiriamas šių medžiagų kiekiui bei aktyvumui. Fitohormonai veikia kaip fitoaleksinai, kurie apsaugo augalą nuo patirto streso. Įvairios aplinkos sąlygos gali skirtingai paveikti skirtingų rūšių augalus, pavyzdžiui, salotos paveiktos ultravioletine spinduliuote praranda flavonoidų, tačiau didesnis kiekis sudaro antocianinų. ABR padidina vandenilio peroksido ir superoksido sintezę augalui patiriant stresą ir taip sukelia oksidacinį stresą. Tačiau šis augalo hormonas tuo pačiu metu stimuliuoja antioksidacinę augalo apsaugos sistemą, kurios metu išskiriama daugiau antioksidantų, padidina jų antioksidacinį aktyvumą. Šie antioksidantai kaupiasi ir padeda augalui išvengti neigiamo aplinkos poveikio. Ankstesniais tyrimais nustatyta, kad raudonosiose vynuogėse abscizo rūgštis padidina antocianinų kiekį [59], o kukurūzų daiguose padidina chlorofilų ir karotinoidų kiekius [60].

Xiaoqiang Han ir kt. mokslininkai tyrė abscizo rūgšties darinių savybes, nustatė, kad susintetinti ABR dariniai pasižymi geresniu fotostabilumu: atsparesni ultravioletinei šviesai. Šis hormonas pasižymi inhibituojančiomis arba augimą skatinančiomis savybėmis, palaiko sėklas ir pumpurus ramybės būsenoje, turi įtakos žydėjimui. Abscizo rūgštis, dėl savo augalų augimą reguliuojančių savybių, plačiai naudojama agrikultūroje [61, 62].

### 1.7. *Paenibacillus* genties bakterijos

*Paenibacillus* gentyje yra simbiotinių bakterijų, kurios gyvena augalo vidiniuose audiniuose arba ant augalo paviršiaus ir su augalu sudaro simbiozės ryšius. Lazdelės formos ląstelės yra judančios, turi išsiskirsčiusius žiuželius. Kai kurios šios genties bakterijos geba gaminti augalo augimą stimuliuojančius hormonus (pvz., citokininą), antibiotinius peptidus bei hidrolizuojančius fermentus, kurie yra atsakingi už antagonistinę (priešišką) elgeseną daugelio augalų patogenų atžvilgiu. Dėl to didžioji dalis *Paenibacillus* rūšių priskiriamos augalo augimą skatinančių bakterijų sąrašui [63].

*Paenibacillus* bakterijos yra plačiai paplitusios. Šios bakterijos yra aerobai arba fakultatyvūs anaerobai, galintys formuoti endosporas. Didžioji dalis šių bakterijų randama dirvožemyje ir yra daugiau kaip 200 rūšių [64]. Jos pasižymi metaboline įvairove ir gali gyventi skirtingose buveinėse: dirvožemyje, vandenyje, medžiuose ir jų šaknyse, maisto produktuose, daržovėse, vabzdžių lervose, ligoninės klinikinės medžiagos [65]. Dirvožemyje esančios *Paenibacillus* bakterijos skatina augalų augimą, kadangi biologiškai fiksuoja azotą, didina fosfatų tirpumą, gamina fitohormono 3-indolilacto rūgštį ir išskiria sideroforus, kurie lemia lengvesnį geležies įsisavinimą [64]. Taip pat šios bakterijos apsaugo augalus nuo žolėdžių vabzdžių ir fitopatogenų, įskaitant įvairias kitas bakterijas, grybelius, nematodus ir virusus. Tokį apsauginį poveikį galima pasiekti, naudojant insekticidus, kurių sudėtyje yra *Paenibacillus* genties bakterijų [64]. Medicinoje gaminami įvairūs antimikrobiniai vaistai, kuriuose naudojami šių bakterijų išskirtos medžiagos, tokios kaip polimiksinai, fusaricidiniai. Šie junginiai yra neribosominiai lipopeptidai [64]. *Paenibacillus* genties bakterijų kolonija pateikta 1.7 paveiksle.



1.7 pav. *Paenibacillus* genties bakterijų kolonija mikroskopinėje lėkštelėje [66]

Jos gali būti ir gramneigiamos, ir gramteigiamos, lazdelės formos endosporas formuojantys aerobai ir fakultatyviniai anaerobai. *Paenibacillus* sp. pasižymi didele sintetinių junginių įvairove: augalų hormonai, hidroliziniai fermentai, antibiotikai, veikiantys tiek prieš gyvūnų, tiek prieš augalų patogeninius mikroorganizmus [65].

Kai kurios *Paenibacillus* rūšys ant sukietintos maitinamosios terpės formuoja specializuotas sudėtingas sūkurio formos struktūras. Pavyzdžiui, tokios struktūros būdingos *Paenibacillus vortex* bakterijų rūšiai. Sūkurio formos struktūrų formavimas padeda augančioms bakterijų kolonijoms greičiau judėti terpės paviršiumi [67].

Kitos naudingos medžiagos išskirtos *Paenibacillus* genties bakterijų yra egzopolisacharidai ir fermentai: amilazės, celiulazės, hemiceliulazės, lipazės, pektinazės, oksigenazės, dehidrogenazės, ligniną modifikuojantys fermentai, mutanazės. Šie fermentai naudojami ploviklių, maisto, pašarų, tekstilės, popieriaus, biokuro, sveikatos priežiūros, augalininkystės pramonėse [64].

### **1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

Augimo reguliatoriai – tai medžiagos, kurios skatina arba stabdo augalų augimą. Augaluose natūraliai susidaro įvairūs hormonai, atsakingi už augalų vystymąsi. Be natūralių augimo reguliatorių yra gaminami ir sintetiniai. Vienas iš sintetinių augimą reguliuojančių medžiagų yra paklobutrazolis. Ši medžiaga stabdo stiebų augimą, taip skatina augalų suformuoti tvirtus trumpus stiebus, padidina šaknų augimo greitį bei lemia anktyvaus derliaus susiformavimą. Paveikus augalus paklobutrazoliu padidėja antioksidacinis aktyvumas, chlorofilų *a* ir *b* santykis, tačiau sumažėja fenolinių junginių koncentracija. Tuo tarpu giberelinas yra natūralus augalų hormonas. Šis junginys skatina stiebų augimą, žiedų ir vaisių vystymąsi, didina šaknų ilgį, tačiau mažina jų diametrą. Paveikus augalus giberelinu padidėja fenolinių junginių koncentracija. Abscizo rūgštis, kaip ir giberelinas, yra natūraliai augaluose esantis hormonas. Šis hormonas skatina sėklų formavimąsi, stabdo stiebų augimą, skatina šaknų išsišakojimą, didina jų diametrą ir ilgį. Paveikus augalus abscizo rūgštimi padidėja fenolinių rūgščių, antioksidantų, chlorofilo *b*, karotinoidų koncentracija.

Be natūraliai augaluose esančių arba chemijos pramonėje sintetinamų augimo reguliatorių yra bakterijų, kurios sugeba gaminti augalų augimą reguliuojančius hormonus. Tokios bakterijos, kaip *Paenibacillus sp.*, gamina augimo hormoną – citokininą, įvairius peptidus ir fermentus. Taip pat šios bakterijos padeda augalams geriau pasisavinti makroelementus ir mikroelementus. Dėl savo gebėjimų jos laikomos augimą skatinančiomis bakterijomis.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Šiame skyriuje pateikiama informacija apie moksliniame tyrime naudotas medžiagas, jų paruošimą, darbo vietos parengimą darbui, taikytus metodus ir reikalingas darbo priemones tyrimams atlikti.

### 2.1. *Paenibacillus* preparato paruošimas

Mokslinio tiriamojo darbo metu naudojamos bakterijos – *Paenibacillus* sp., kurios išskirtos LAMMC Miškų instituto laboratorijoje auginamų hibridinės drebulės (*Populus tremuloides* × *P. tremula*; 51DF1001) *in vitro* kultūrų. Auginant šias bakterijas naudojama iš „Duchefa“ (Nyderlandai) įsigyta maitinamoji terpė Lysogeny broth LB – Lennox (10 g/L triptono, 5 g/L mielių ekstrakto, 5 g/L NaCl). Ruošiant bakterijas liofilizavimui, skysta maitinamoji terpė po bakterijų inkubavimo centrifuguojama, tada skystis nupilamas, o nuosėdos suspenduojamos 10 % sacharozės tirpale (naudojant 5 ml sacharozės tirpalo 100 ml pradinės maitinamosios terpės). Sacharozės tirpale suspenduotos bakterijos užšaldomos ir liofilizuojamos. Iš liofilizuotų bakterijų miltelių buvo paruoštas *Paenibacillus* preparatas. Bakterijų liofilizavimas ir preparato paruošimas atliktas UAB „MKDS“ laboratorijoje.

Po bakterijų liofilizavimo gauti milteliai prieš eksperimentus buvo tirpinami vandenyje, siekiant paruošti atitinkamų koncentracijų tirpalus. *Paenibacillus* preparato miltelių koncentracijos vandenyje buvo 2 g/l, 6 g/l ir 10 g/l. Į šiuos paruoštus tirpalus buvo pamerkti ir laikomi 30 min. *in vitro* sąlygomis užauginti ir nuskinti stevijos ūgliai, vėliau jie buvo sodinami į durpines tabletes. Stevijos mikrodauginimas pateiktas sekančiame 2.2. poskyriuje, o eksperimento sąlygos ir stevijos augalų paruošimas pateiktas žemiau šiame darbe esančiame 2.3. poskyriuje.

### 2.2. Stevijos augalo mikrodauginimas *in vitro*

Maitinamąją terpę sudaro makroelementai ir mikroelementai, vitaminai, kiti organiniai komponentai, augimo reguliatoriai, kietinančios medžiagos, cukrūs. Terpės sudėtis priklauso nuo augalo rūšies, eksplantų ir bandymo tikslo.

#### 2.2.1. Mitybinės terpės sudėtis

Stevijos augalo auginimui *in vitro* naudojami stiklainėliai (70 mm skersmens, 70 mm pločio, 75 mm aukščio) su 30 ml WPM terpe, kurios sudėtis pateikta 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. McCown Woody Plant Medium (WPM) mitybinės terpės sudėtis

Mikroelementai	mg/l	Makroelementai	mg/l	Vitaminai	mg/l
CoSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	CaCl <sub>2</sub>	72,50	Glicinas	2,00
FeNaEDTA	37,30	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	386,34	Myo-Inozitolis	100,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	Nikotino rūgštis (B3)	0,50
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	22,30	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990,00	Pirodoksino HCl	0,50
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,213	MgSO <sub>4</sub>	180,54	Tiamino HCl	1,00
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,60	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,00		

## 2.2.2. Mitybinės terpės paruošimas

**Įranga ir reagentai:** elektroninės svarstyklės, pH-metras, elektrinė plytelė, mėgintuvėliai, buteliai, dozatorius, distiliuotas vanduo, sacharozė, gelritas, Woody Plant Medium terpės vitaminų ir druskų mišinys, NaOH ir HCl tirpalai.

**Darbo eiga:** Į butelį įpilama 800 ml distiliuoto vandens, įberiama 2,46 g WPM terpės vitaminų ir druskų mišinio, išmaišoma. Įberiama 20 g sacharozės, gerai išmaišoma, kad neliktų neištirpusių medžiagų. Pripildomas butelis distiliuotu vandeniu iki 1 l tirpalo. Naudojamas pH-metras, pH reikšmė reguliuojama NaOH ir HCl tirpalais, kol nustatoma pH 5,8 vertė. Tirpalai padalijami į dvi talpas ir kaitinami, kol tirpalo temperatūra pasiekia 30-40 °C, įberiami gelrito milteliai. Tirpalai toliau kaitinami, kol gelritas ištirpsta. Paruošti tirpalai supilami atgal į vieną talpą ir gerai išmaišomi. Ši terpė pilama į mėgintuvėlius po 5,5 ml, naudojant dozatorių. Vėliau mėgintuvėliai, su juose esančia terpe, autoklavuojami 121 °C laipsnių temperatūroje 21 min., kad būtų išvengta kontaminacijos.

## 2.2.3. Mikrodauginimo procesas

Mokslinis tyrimas buvo atliekamas naudojant stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) augalo eksplantų kultūrą *in vitro*. Prieš eksperimentą augalai buvo laikomi stiklainėliuose su WPM mitybine terpe laikymo kameroje, kurioje nustatytas 16-os valandų fotoperiodas, normaliose sąlygose. Pamatavus 10 mm nuo augalo viršūnės, augalas buvo nupjaunamas ir uždedamas ant sterilios stiklinės *Petri* lėkštelės (55 mm skersmens ir 13 mm aukščio). Steriliu peiliu nuo augalo ekspanto pašalinami lapai ir šaknys.

Po to į kiekvieną sterilų stiklainėlį su WPM terpe pasodinama po penkis eksplantus. Svarbu, kad augalų eksplantų nebūtų pridėta per daug arba arti vienas šalia kito, nes gali netolygiai augti.

Naudojama laikymo kamera, kurioje yra 16 valandų fotoperiodas. Eksplantai auginami apie 3 savaites. Vėliau šių augalų klonai ir toliau mikrodauginami *in vitro*, kol pasiekiamas tyrimui reikalingas augalų kiekis. Šiame procese naudojamos darbo priemonės ir darbo eiga aprašyta žemiau.

**Darbo priemonės:** laminaras, 95% spiritas, petri lėkštelė, skalpelis, du maži pincetai, didelis pincetas, augalai, kuriuos dauginsime, mėgintuvėliai su nauja nenaudota terpe, stovėlis, šiukšlinė, šluostė.

**Darbo eiga:** augalų dauginimas vyksta laminare, todėl svarbu tinkamai paruošti darbo vietą. Pirmiausia spiritu nuvalomas laminaro darbinis paviršius. Reikalingi įrankiai dezinfekuojami, nudeginami ugnimi. Priemonės, kurios bus naudojamos darbo metu, sudedamos patogiai, kad netrukdytų darbo metu ir būtų lengvai pasiekiamos. Imami mėgintuvėliai su norimu padauginti augalu, mėgintuvėlis atidaromas, su nudegintu pincetu išimamas augalas ir padedamas į steriliai paruoštą stiklinę *Petri* lėkštelę. Augaliuko lapukai nuskinami, stiebas supjaustomas taip, kad gautųsi maždaug 1,5 cm eksplantai. Tada po vieną eksplantą dedami į naują stiklainėlį su terpe. Stiklainėlio viršus ir kamštukas nudeginami, stiklainėlis uždaromas ir padedamas į stovėlį. Procesas kartojamas su visais dauginimui paruoštais augalais.

## 2.3. Stevijos paruošimas ir eksperimento sąlygos

Tyrimai atlikti su saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) klonais, padaugintais ir išaugintais *in vitro* kultūroje. Pirminiai eksplantai buvo paruošti iš ūglių atkarpų su vegetatyviniais pumpurais,

dezinfekuotų 75% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH ir 0,1% AgNO<sub>3</sub> tirpalais. Po dezinfekcijos ūgliai buvo patalpinti ant maitinamosios terpės *in vitro* kultūroje ir atliekant reguliarius gyvybingų eksplantų perkėlimus ant šviežios maitinamosios terpės, buvo gautos stabiliai naujus ūglius formuojančios kultūros. Iš tokių kultūrų paimti ūgliai naudoti šiame darbe atliktuose tyrimuose. Ūglių dauginimui *in vitro* naudota Woody Plant Medium (WPM; McCown ir Lloyd, 1981) maitinamoji terpė (3 % sacharozės, 1 mg/l benzilaminopurino), sustandinta 0,8 % fitoagaro. Standartinės dirbtinės aplinkos sąlygos *in vitro* auginimo metu buvo tokios: 16 h fotoperiodas (apšvietimas 30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-2</sup>) ir 25/18 °C („diena“/„naktis“) temperatūros režimas. Plačiau apie mikrodauginimo metodą pateikta 2.2. skyriuje.

Prieš *in vitro* kultūroje išaugusių mikroūglių sodinimą į nesterilias sąlygas buvo paruošti mini šiltnamiai su daigintuvėmis (vienas mini šiltnamias skirtas 80 mikroūglių). Ūglių adaptacijai *ex vitro* sąlygomis naudotos 30 mm skersmens Jiffy-7 durpinės tabletės (Jiffy Products International AC, Norvegija). Prieš sodinimą tabletės buvo apie 1 val. mirkomos vandenyje, o po išbrinkimo sudėtos į daigintuves.

2,0–2,5 cm aukščio stevijų stambūs (vidutinis lapo plotis 11,9±0,6 mm) ir smulkūs (vidutinis lapo plotis 5,1±0,2 mm) mikroūgliai buvo pincetais nuskinti iš *in vitro* kultūros, skynimo metu taip pat pašalinant apatinius lapus. Prieš veikimą *Paenibacillus* preparatu bei prieš sodinimą į durpines tabletes, didžioji dalis ūglių buvo apdoroti augimo reguliatorių tirpalais, aprašytais 2.2 lentelėje. Ūgliai buvo pamerkti į 100 μmol/l augimo reguliatorių tirpalus (kaip tirpiklį naudojant distiliuotą vandenį), o ketvirtadalis ūglių (kontrolinis variantas) buvo pamerkti į distiliuotą vandenį be jokių augimo reguliatorių. Šiuose tirpaluose ūgliai buvo laikomi 20 val. (tamsoje, kambario temperatūroje).

**2.2 lentelė.** Tyrime naudoti augimo reguliatoriai (gamintojas – „Duchefa Biochemie“, Nyderlandai)

Augimo reguliatorius	Sutrumpinimas	Naudota koncentracija, atitinkanti 100 μmol/l
Abscizo rūgštis	ABR	26,43 mg/l
Giberelinų A <sub>4</sub> ir A <sub>7</sub> mišinys	GA <sub>4+7</sub>	33,2 mg/l
Paklobutrazolis	PBZ	29,38 mg/l

Prieš sodinimą į durpines tabletes, paruošti ūgliai buvo papildomai pamerkti į paruoštus atitinkamų koncentracijų *Paenibacillus* preparato tirpalus, išmaišant liofilizuotus bakterijų miltelius vandenyje. Buvo naudojamos tokios preparato koncentracijos: 0 g/l (t.y., vanduo be bakterijų miltelių), 6 g/l ir 10 g/l. Iš kiekvieno aukštesnėje pastraipoje aprašyto augimo reguliatorių poveikio varianto, įskaitant kontrolinį, ūgliai buvo tolygiai paskirstyti skirtingiems *Paenibacillus* preparato poveikiams. Po 30 min. trukusio mirkymo ūgliai buvo pasodinti į išbrinkusias Jiffy-7 tabletes daigintuvėse, kurios buvo uždengtos skaidriais dangteliais.

Kiekvieną bandymo variantą sudarė 40 mikroūglių, išskirstytų pakartojimais (4 × 10) po skirtingas daigintuves. Rezultatai buvo vertinami po 50 d. nuo mikroūglių adaptacijos pradžios.

#### 2.4. Biologiškai aktyviųjų junginių nustatymas

Biologiškai aktyvūs junginiai pasižymi didelio bioaktyvumu, todėl jų koncentracijos augale nustatymui svarbu tiksliai atlikti metodus. Mėginių ekstraktų paruošimas ir atliktų eksperimentų metodai pateikti sekančiuose skyreliuose.

### 2.4.1. Mėginių paruošimas

Apie 0,5 g stevijos ūglių sutrinta grūstuvėlyje. Homogenizuotas turinys užpildas 10 ml 75 % metanolio tirpalu ir paliktas 24 valandų ekstrakcijai naudojant inkubatorinę Kühner purtyklę (Adolf Kühner AG, Šveicarija) 150 kartų per minutę greičiu, 25 °C temperatūroje. Po ekstrakcijos visi mėginiai nufiltruoti per Rotilabo® - 113A celiuliozės membraninius (Ø 90 mm) filtrus (Carl Roth, Vokietija).

### 2.4.2. Suminės fenolinių junginių koncentracijos nustatymas

Bendroji fenolinių junginių koncentracija įvertinta spektrofotometriniu metodu naudojant *Folin-Ciocalteu* reagentą pagal Slinkard ir Singleton metodą ir matuojant 760 nm bangos spektre [69]. Mėginio paruošimui 100 µl metanolinio ekstrakto sumaišyta su 2,5 ml distiliuotu vandeniu ir 100 µl *Folin-Ciocalteu* (VWR International GmbH, Viena) reagentu. Gerai išmaišoma ir laikoma 6 min. Į mėginį įpilama 5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (99%, UAB Grida, Vilnius) ir paliekama tamsoje 30 min. prieš matavimą kambario temperatūroje. Matavimai atlikti naudojant Synergy HT Multi-Mode Microplate skaitytuvą (BioTek Instruments, Inc, Germany). Kiekvienam mėginio variantui atlikti trys analitiniai pakartojimai. Suminė fenolinių junginių koncentracija išreikštas pagal chlorogeninės rūgšties (>98%, TCI Europe, Belgija) ekvivalentą mg/g žalios masės.

Išmatavus standarto absorbciją, sudaroma kalibracinė kreivė, iš kurios gauname lygtį:

$$1) \text{ Fenolių: } y=0,206x + 0,1272 \text{ (R}^2 = 0,9888)$$

Suminė fenolinių junginių koncentracija, išreikšta pagal chlorogeninės rūgšties ekvivalentą mg/g žalios masės, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Koncentracija, mg/g} = \frac{c \cdot V}{m} \quad (2.1)$$

Čia c – koncentracija mg/ml, gauta iš kalibracinės kreivės; V – ekstrakto tūris, ml; m – atsvertas žaliavos kiekis, g.

### 2.4.3. Suminės flavonoidų koncentracijos nustatymas

Suminė flavonoidų koncentracija įvertinta spektrofotometriniu metodu pagal flavonoidų ir Al (III) komplekso susidarymą [70]. Absorbcija matuojama 470 nm bangos spektre, naudojant Synergy HT Multi-Mode Microplate skaitytuvą (BioTek Instruments, Inc, Germany). Mėginio paruošimui 1 ml 75 % metanolinio ekstrakto (LaboChema, Vilnius) sumaišyta su 0,3 ml 5 % (w/v) NaNO<sub>2</sub> (VWR International, Austrija) ir po 5 min supilti 0,5 ml AlCl<sub>3</sub> (2% w/v) (99%, Alfa Aesar, Vokietija). Mėginys sumaišytas ir po 6 minučių neutralizuotas supilant 0,5 ml 1M NaOH (99%, LaboChema, Lietuva). Kiekvienam mėginio variantui atlikti trys analitiniai pakartojimai. Suminė flavonoidų koncentracija išreikštas pagal katechino (>98%, Sigma-Aldrich, Kinija) ekvivalentą mg/g žalios masės.

Išmatavus standarto absorbciją, sudaroma kalibracinė kreivė, iš kurios gauname lygtį:

$$1) \text{ Flavonoidų: } y=0,22x - 0,01272 \text{ (R}^2 = 0,9805)$$

Suminė flavonoidų koncentracija, išreikšta pagal katechino ekvivalentą mg/g žalios masės, apskaičiuojamas pagal formulę:



$$\text{Koncentracija, mg/g} = \frac{c \cdot V}{m} \quad (2.2)$$

Čia  $c$  – koncentracija mg/ml, gauta iš kalibracinės kreivės;  $V$  – ekstrakto tūris, ml;  $m$  – žaliavos kiekis, g.

#### 2.4.4. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas

##### DPPH radikalų aktyvumo nustatymas

DPPH radikalų aktyvumas matuojamas po reakcijos su 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH), remiantis Ragaee ir kitų mokslininkų metodika [71]. 0,1 ml paruošto metanolinio ekstrakto sumaišyta su 0,4 ml 75% metanolis (LaboChema, Vilnius) ir 1 ml DPPH (0,1 mM koncentracijos) (>97%, TCI Europe, Belgija). Mėginio absorbcija matuojama po 16 minučių 515 nm bangos ilgiu, naudojant spektrofotometrą Genesys 6 (Thermospectronic, USA). DPPH ir metanolis naudojamas kaip palyginamasis tirpalas.

DPPH surišimo geba išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentus gramui žaliavos ir apskaičiuojama pagal formulę:

$$\text{TE} = \frac{c \cdot V}{m} \quad (2.3)$$

Čia  $c$  – trolokso koncentracija nustatyta iš kalibracinės kreivės mM/ml;  $V$  – ekstrakto tūris ml;  $m$  – tikslus atsvertas žaliavos kiekis g.

##### ABTS radikalų aktyvumo nustatymas

*Pradinio tirpalo paruošimas:* tamsaus stiklo buteliuke 50 ml distiliuoto vandens ištirpinama 0,056 g ABTS (>99%, Fluka, Vokietija) panaudojant ultragarso bangas. Į gautą tirpalą įdedama 200 μl 70 nM kalio persulfato (0,1982 g  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  tirpinama 10 ml distiliuoto vandens). Paruoštas tirpalas gerai sumaišomas ir paliekamas tamsoje 16 valandų.

*Darbinio tirpalo paruošimas:* po 16 valandų pirminis ABTS tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu tol, kol nustatoma  $0,700 \pm 0,2$  absorbcijos reikšmė, esant 734 nm bangos ilgiui. Kontrolei naudojama distiliuotas vanduo. Į mėgintuvėlį analizei imama 50 μl tiriamojo ekstrakto ir įpilama 2 ml darbinio ABTS tirpalo, laikoma tamsiai, po 10 min matuojama absorbcija.

*Standartinio tirpalo paruošimas:* 25 mg trolokso miltelių (97%, Sigma-Aldrich, JAV) ištirpinama 80 % metanolyje (LaboChema, Vilnius) 25 ml kolbutėje. Pirminio tirpalo koncentracija yra lygi 1 mg/ml. Gaminami 5 koncentracijų trolokso tirpalai. Imamas 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml bei 5 ml pirminio trolokso tirpalo ir pilama 80 % (V/V) etanolio iki 10 ml.

ABTS radikalų-katijonų surišimo geba išreiškiama standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentus gramui žaliavos ir apskaičiuojama pagal 2.3 formulę.

#### 2.4.5. Fotosintezės pigmentų nustatymas

Chlorofilai  $a$  ir  $b$  bei karotinoidai nustatyti pagal Wettstein metodiką [72]. Apie 0,2 g stevijos ūglių sutrinta grūstuvėlyje su  $\text{CaCO}_3$  (>98,5%, Duchefa Biochemie, Nyderlandai) ir užpilta 10-20 ml

acetonu (VWR International, France). Visi mėginiai nufiltruoti per Rotilabo ®-113A celiuliozės membraninius (Ø 90 mm) filtrus (Carl Roth, Vokietija). Perfiltruoti mėginiai užpildomi acetonu iki 30 ml. Pigmentų koncentracija 100 % acetono ištraukos filtrate nustatyta spektrofotometru T80 UV-VIS (PG Instruments, Jungtinė Karalystė) atitinkame bangos spektre:

1. 662 nm – chlorofilui *a* (chl<sub>a</sub>);
2. 644 nm – chlorofilui *b* (chl<sub>b</sub>);
3. 440,5 nm – karotinoidams (Chl<sub>karotinoidų</sub>).

Pigmentų koncentracija apskaičiuota pagal formules (čia D – optinis tankis prie atitinkamo bangos ilgio):

$$\text{Chl}_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{664} \quad (2.4)$$

$$\text{Chl}_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662} \quad (2.5)$$

$$\text{Chl}_{\text{karotinoidų}} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 (\text{Chl } a + b) \quad (2.6)$$

Pigmentų koncentracija žaliavoje (mg·g<sup>-1</sup>) nustatomas pagal formulę:

$$A = \frac{c \cdot V}{p \cdot 1000} \quad (2.7)$$

Čia C – pigmentų koncentracija, mg·g<sup>-1</sup>; V – pigmentų ekstrakto tūris, ml; p – augalinės medžiagos svoris, g; A – pigmentų koncentracija, mg·g<sup>-1</sup> žalios masės (ŽM).

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

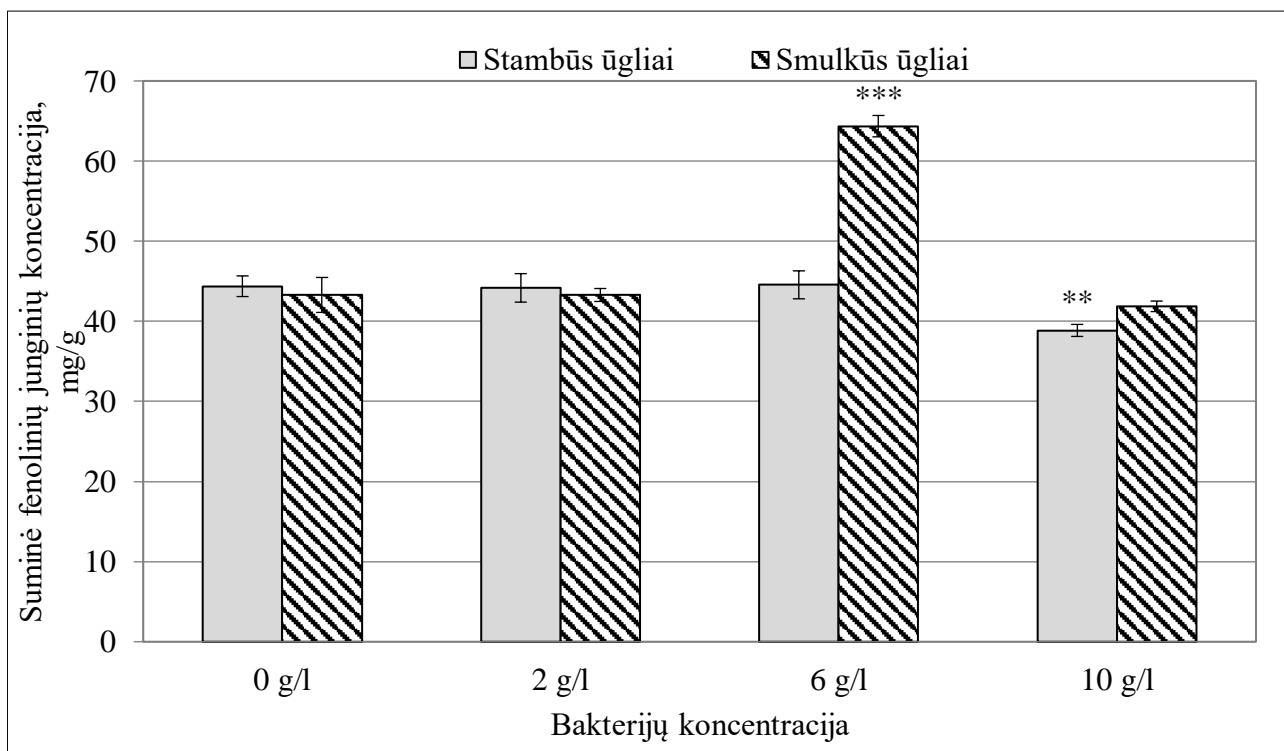
Šiame skyriuje pateikiami atliktų tyrimų rezultatai ir jų aptarimas. Gauti duomenys pavaizduoti grafikuose, taip pat juose nurodyti statistiškai patikimi skirtumai.

#### 3.1. *Paenibacillus* bakterijos koncentracijos poveikis biologiškai aktyviųjų cheminių junginių sintezei

Mokslinio tyrimo metu, tiriant *Paenibacillus* preparato poveikį *in vitro* adaptuojamoms stevijoms, buvo nustatytas šio preparato skirtingos koncentracijos poveikis svarbiausiems stevijų biocheminiams rodikliams: antrinių metabolitų fenolinių junginių bei flavonoidų koncentracijai, pigmentų karotinoidų bei chlorofilų koncentracijai, taip pat – antioksidaciniam stevijų ūglių aktyvumui pagal DPPH ir ABTS rodiklius. Biocheminių rodiklių nustatymo metodai pateikti antrame šio darbo skyriuje (žr. 2. skyrius).

Fenoliniai junginiai yra svarbūs biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai žmogaus organizmui ir augalams. Patekę į žmogaus organizmą su augaliniu maistu, jie atlieka daugybę apsauginių funkcijų. Plačiau apie šias savybes pateikta 1.2.1. skyrelyje.

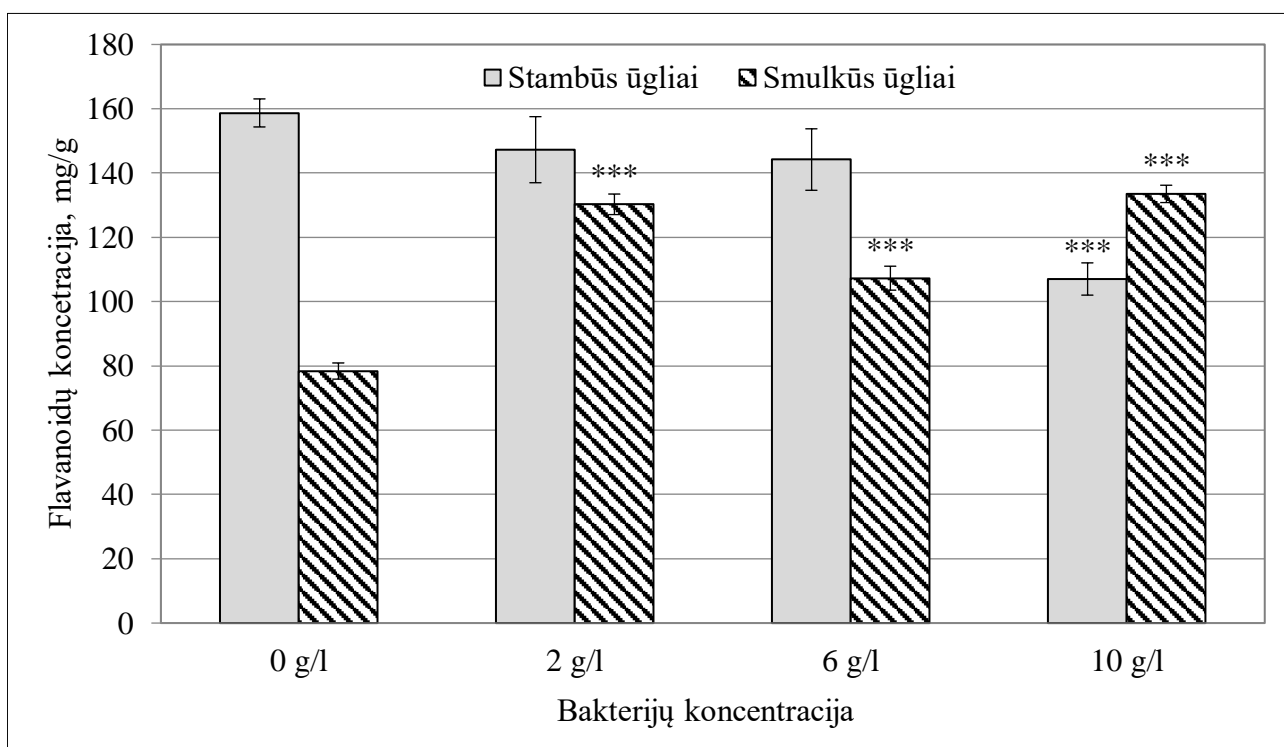
Šio tyrimo metu buvo ištirtos fenolinių junginių ir flavonoidų koncentracijos *Paenibacillus* preparatu paveiktuose stevijos ūgliuose (žr. 3.1 pav. ir 3.2 pav.). Nustatyta, kad fenolinių junginių koncentraciją stambiuose ūgliuose šiek tiek sumažino 10 g/l preparato koncentracija, 2 g/l ir 6 g/l koncentracijos tirpalai neturėjo reikšmingos įtakos fenolinių junginių susidarymui (žr. 3.1 pav.). Smulkiuose ūgliuose fenolinių junginių koncentraciją ženkliai padidino 6 g/l preparato koncentracija (žr. 3.1 pav.).



**3.1 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka suminei fenolinių junginių koncentracijai *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

Flavonoidai yra atsakingi už augalo augimą ir vystymąsi, taip pat apsaugo žmogaus organizmą nuo įvairių ligų. Plačiau apie flavonoidus pateikta 1.2.2. skyrelyje.

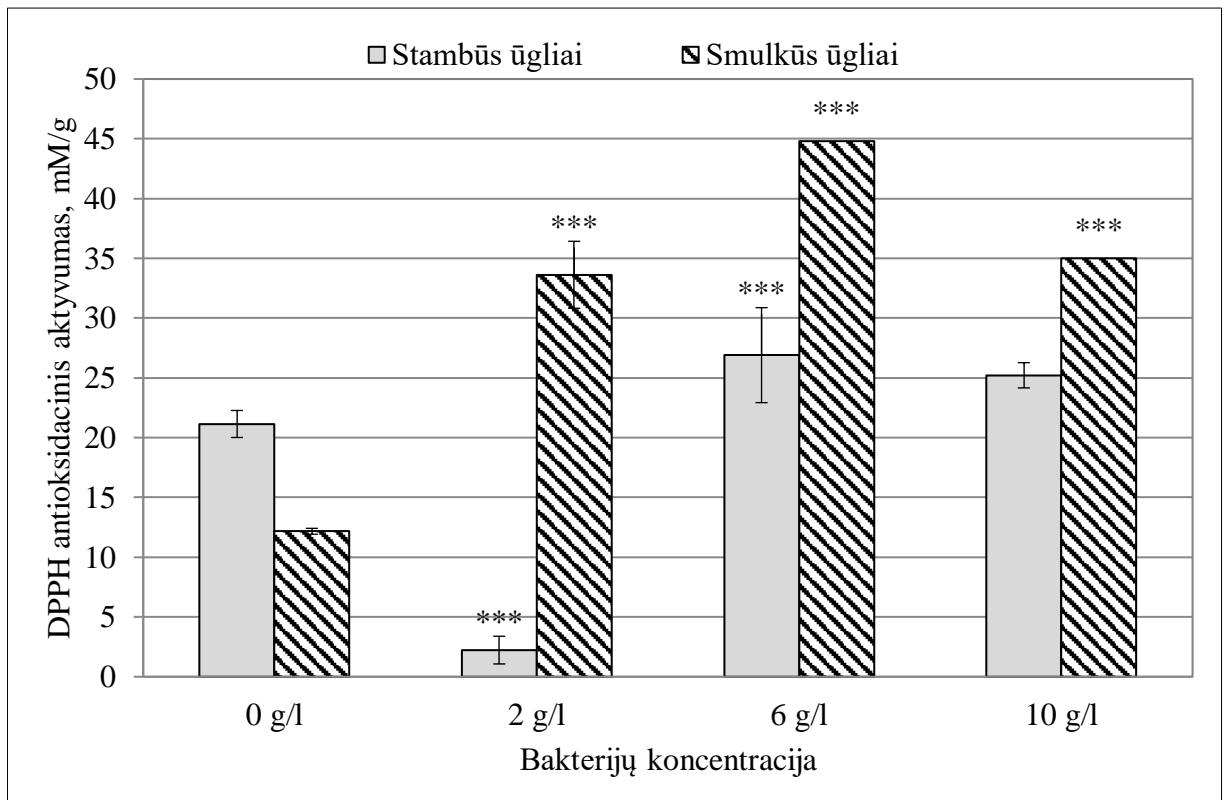
Šio tyrimo rezultatai parodė ryškius teigiamus arba neigiamus bakterinio preparato sukeltus pokyčius flavonoidų koncentracijos kitimui. Galima pastebėti, kad didinant bakterijos koncentraciją stambiuose stelijos ūgliuose susidarė mažesnė flavonoidų koncentracija (žr. 3.2 pav.). Stambių ūglių kontroliniame mėginyje flavonoidų koncentracija siekė 158,69 mg/g, o paveikus 10 g/l koncentracijos bakteriniu preparatu šių junginių koncentracija sumažėjo iki 107,04 mg/g (žr. 3.2 pav.). Tuo tarpu smulkiuose ūgliuose 2 g/l ir 10 g/l koncentracijos bakteriniai preparatai smarkiai padidino flavonoidų koncentraciją (žr. 3.2 pav.). 6 g/l koncentracijos bakterinis preparatas šiek tiek mažiau, lyginant su 2 g/l ir 10 g/l koncentracijos bakterinio preparato poveikiu, padidino flavonoidų koncentraciją (žr. 3.2 pav.).



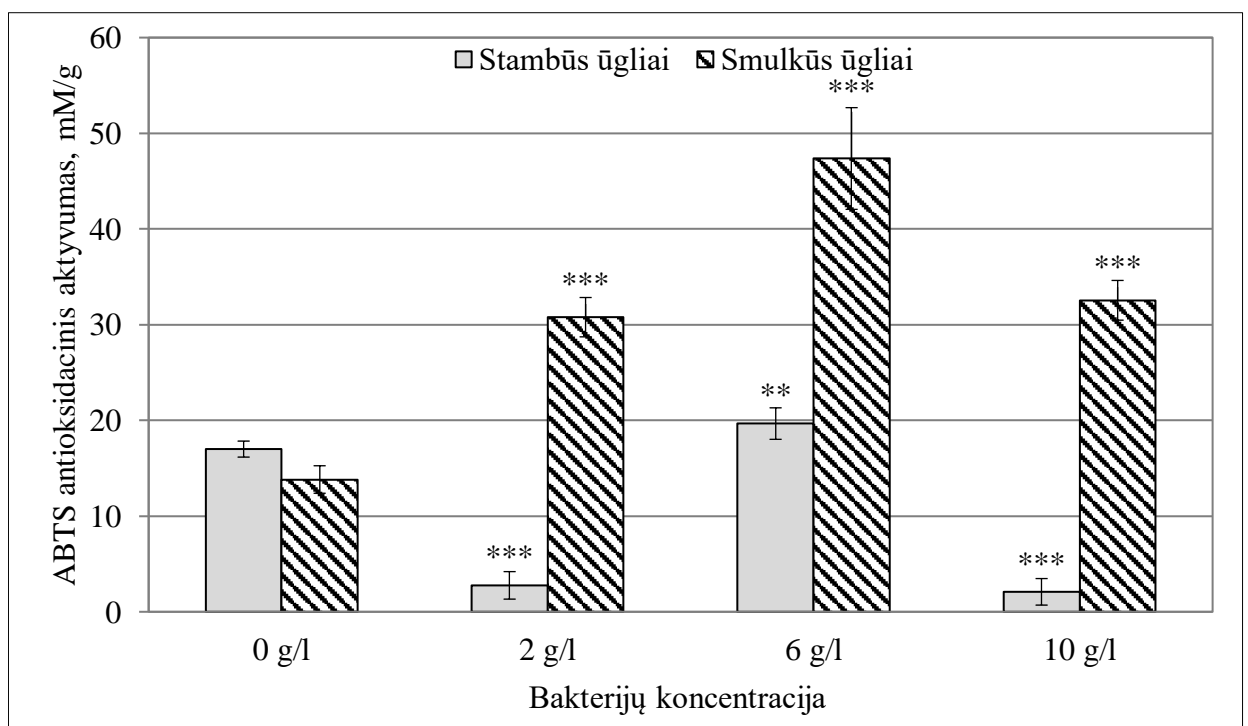
**3.2 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka flavonoidų koncentracijai *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*\* $P < 0,001$ .

Vertinant augalų maistines savybes, svarbūs rodikliai yra jų gebėjimas sintetinti antioksidantus. Antioksidantų pagrindinė funkcija yra saugoti įvairias ląsteles nuo laisvųjų radikalų pažeidimų [22]. O maisto pramonėje plačiai naudojami kaip maisto produktų galiojimo trukmę prailginantys komponentai [68].

Šiame tyrime gauti rezultatai parodė, kad stambiuose ūgliuose DPPH antioksidacinį aktyvumą stipriai sumažino 2 g/l preparato koncentracija (3.3 pav.), o ABTS antioksidacinį aktyvumą – ir 2 g/l, ir 10 g/l koncentracijos tirpalai (3.4 pav.). Tuo tarpu smulkiuose ūgliuose ir DPPH (3.3 pav.), ir ABTS (3.4 pav.) antioksidacinį aktyvumą daugiau negu du kartus padidino visos tirtos preparato koncentracijos, tačiau labiausiai (apie 4 kartus) – 6 g/l koncentracija.



**3.3 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka DPPH antioksidaciniam aktyvumui *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*\*P < 0,001.

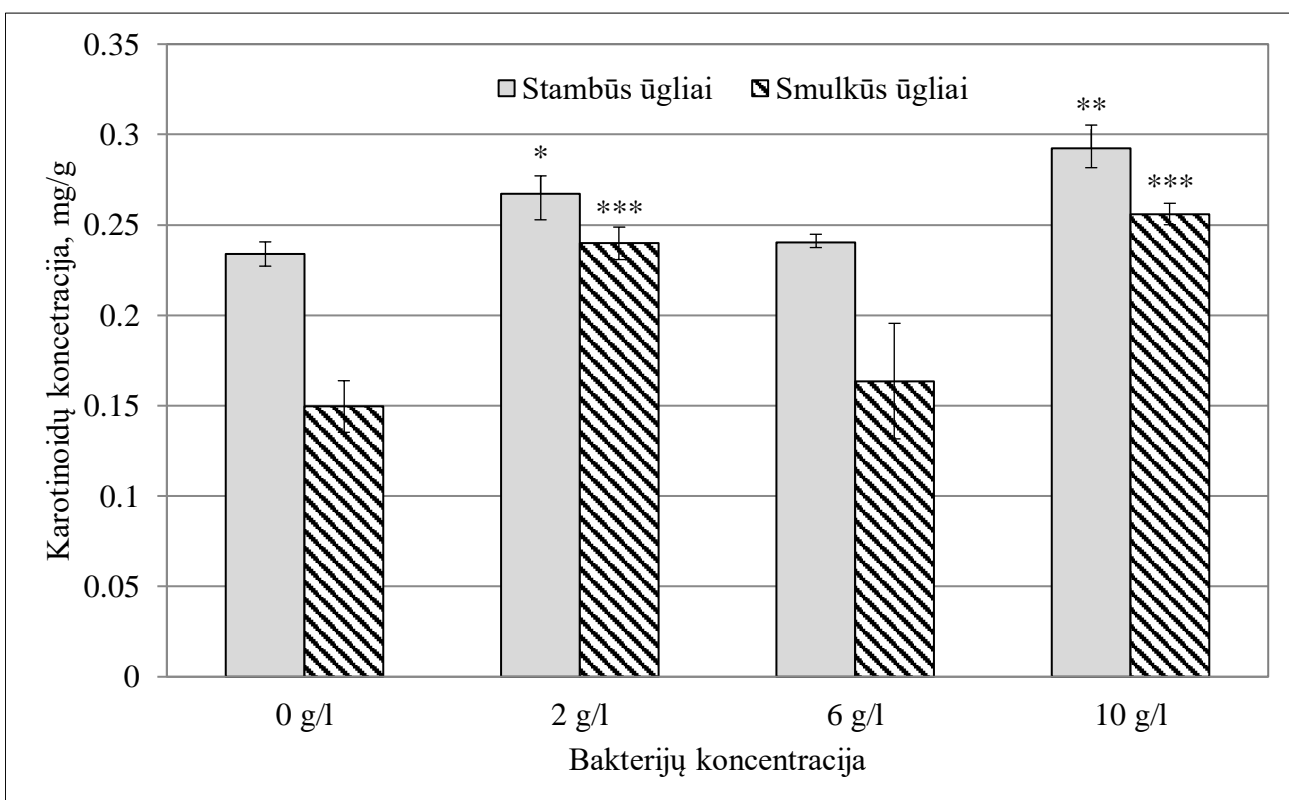


**3.4 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka ABTS antioksidaciniam aktyvumui *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

Atsižvelgiant į gautus rezultatus galima teigti, jog paveikus sąlyginai smulkius *in vitro* kultūroje išaugintus stevijos ūglius *Paenibacillus* preparatu, galima gauti itin geros maistinės kokybės ūglius, pasižyminčius aukštu antioksidaciniu aktyvumu.

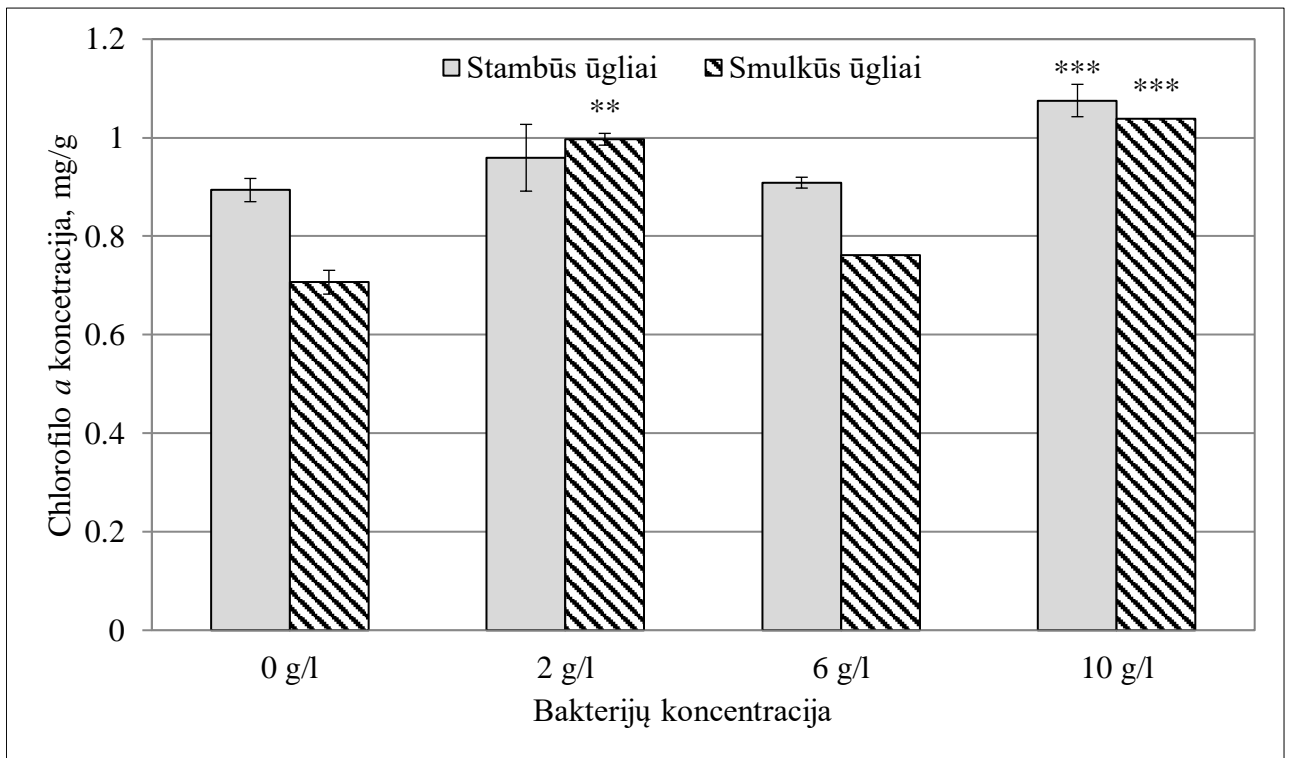
Chlorofilai ir karotinoidai absorbuoja saulės energiją, šią energiją panaudoja padidindami fotosintezės efektyvumą augale [37]. Plačiau apie fotosintezės pigmentus pateikta 1.2.3. skyrelyje.

Tyrimo metu gauti rezultatai parodė, kad karotinoidų koncentracijai esminės įtakos turėjo 10 g/l bakterinio preparato koncentracijos poveikis, padidinęs karotinoidų koncentraciją tiek stambiuose, tiek smulkiuose stevijos ūgliuose (3.5 pav.). Taip pat 2 g/l preparato koncentracija padidino karotinoidų kiekį stambiuose ir smulkiuose ūgliuose, tačiau su 6 g/l preparato koncentracijos tirpalu, lyginant su 2 g/l ir 10 g/l koncentracijos tirpalais, gaunama mažesnė karotinoidų koncentracija (3.5 pav.).

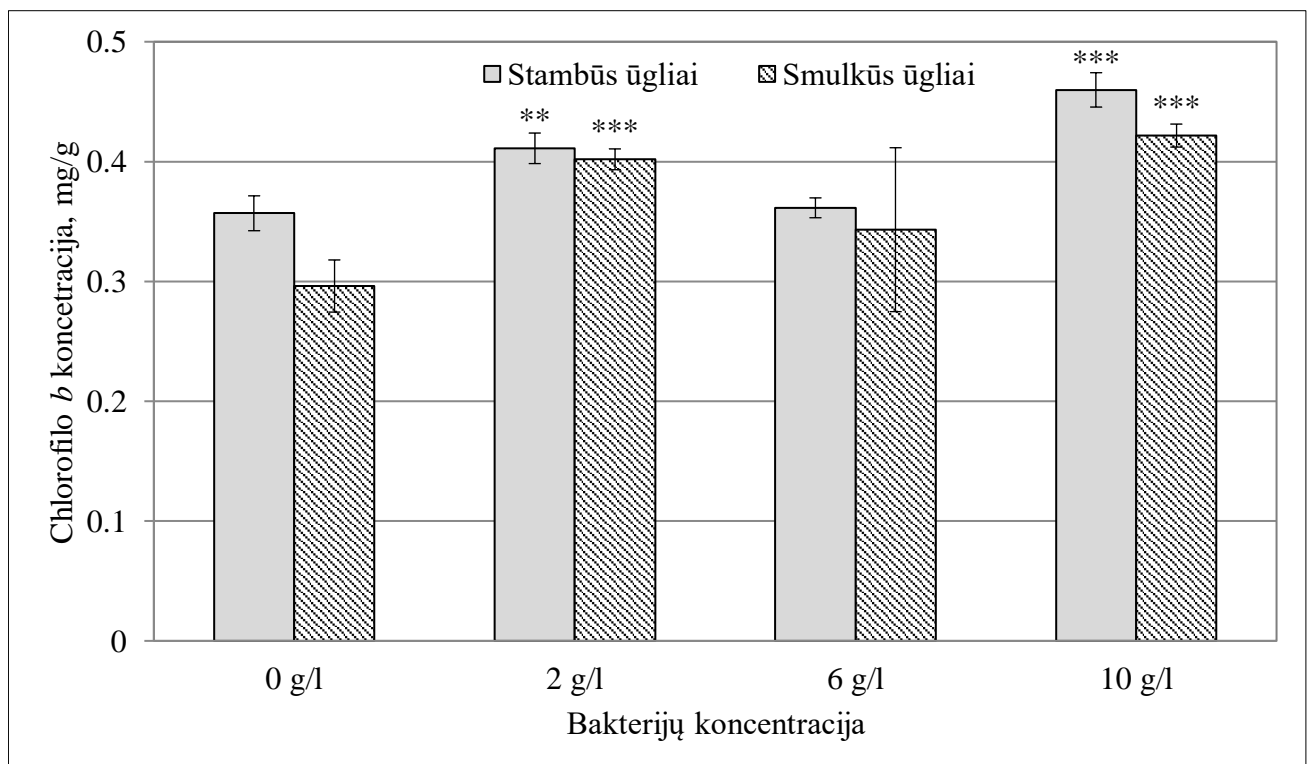


**3.5 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka karotinoidų koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

*Paenibacillus* preparato sąlygoti chlorofilų *a* ir *b* koncentracijos pokyčiai pateikti 3.6 ir 3.7 paveiksluose. Gauti duomenys parodė, kad chlorofilo *a* koncentracija statistiškai patikimai padidėjo šiais atvejais: stambiuose ūgliuose – po 10 g/l koncentracijos poveikio, o smulkiuose ūgliuose – po 2 g/l ir 10 g/l koncentracijų poveikio (3.6 pav.). Tuo tarpu chlorofilo *b* koncentracija statistiškai patikimai padidėjo tiek stambiuose, tiek smulkiuose ūgliuose – po po 2 g/l ir 10 g/l koncentracijų poveikio (3.7 pav.).

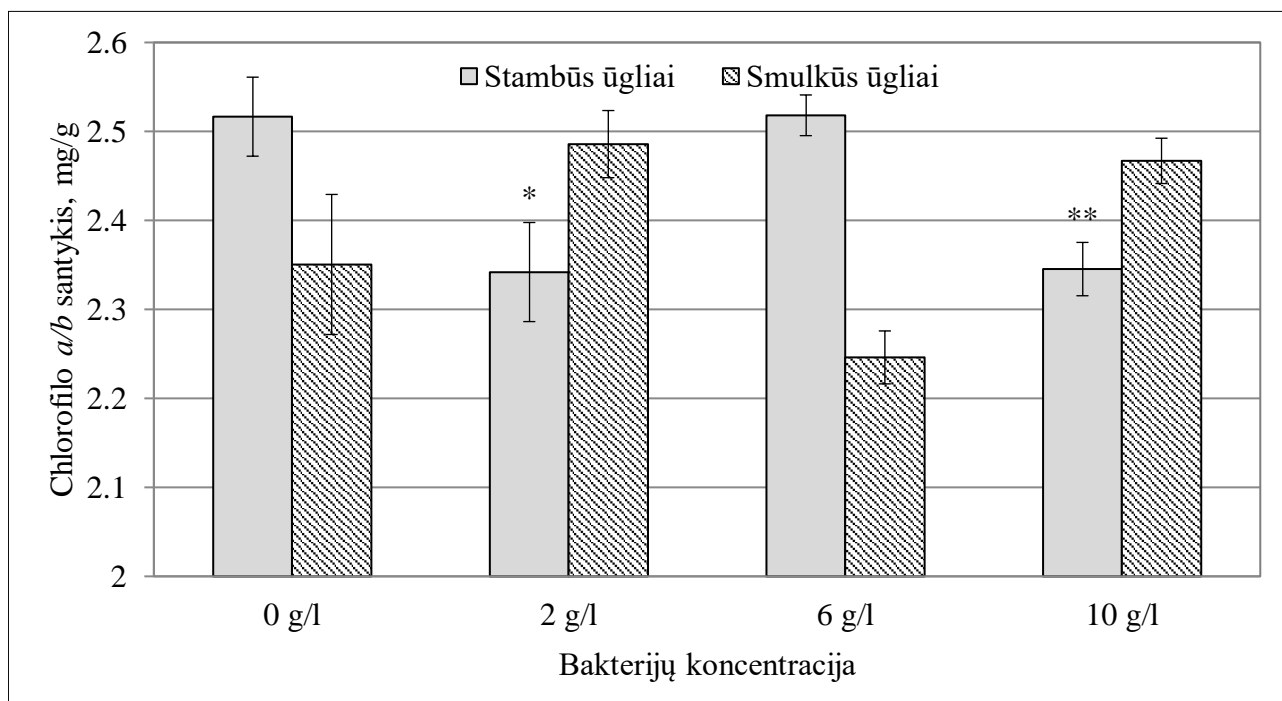


**3.6 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka chlorofilo *a* koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.



**3.7 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka chlorofilo *b* koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

Chlorofilo *a* ir *b* tinkamas santykis užtikrina efektyvų fotosintetinio aparato veikimą. Optimalus santykis chlorofilo *a* ir *b* atitinkamai yra 3:1. Atlikti tyrimai parodė, kad chlorofilų *a/b* santykis dėl bakterinio preparato poveikio reikšmingai nepasikeitė (žr. 3.8 pav.), nes nustatytas bakterijų poveikis atskirų chlorofilų (*a* ir *b*) koncentracijos kitimui buvo gana tolygus (žr. 3.6 ir 3.7 pav.).



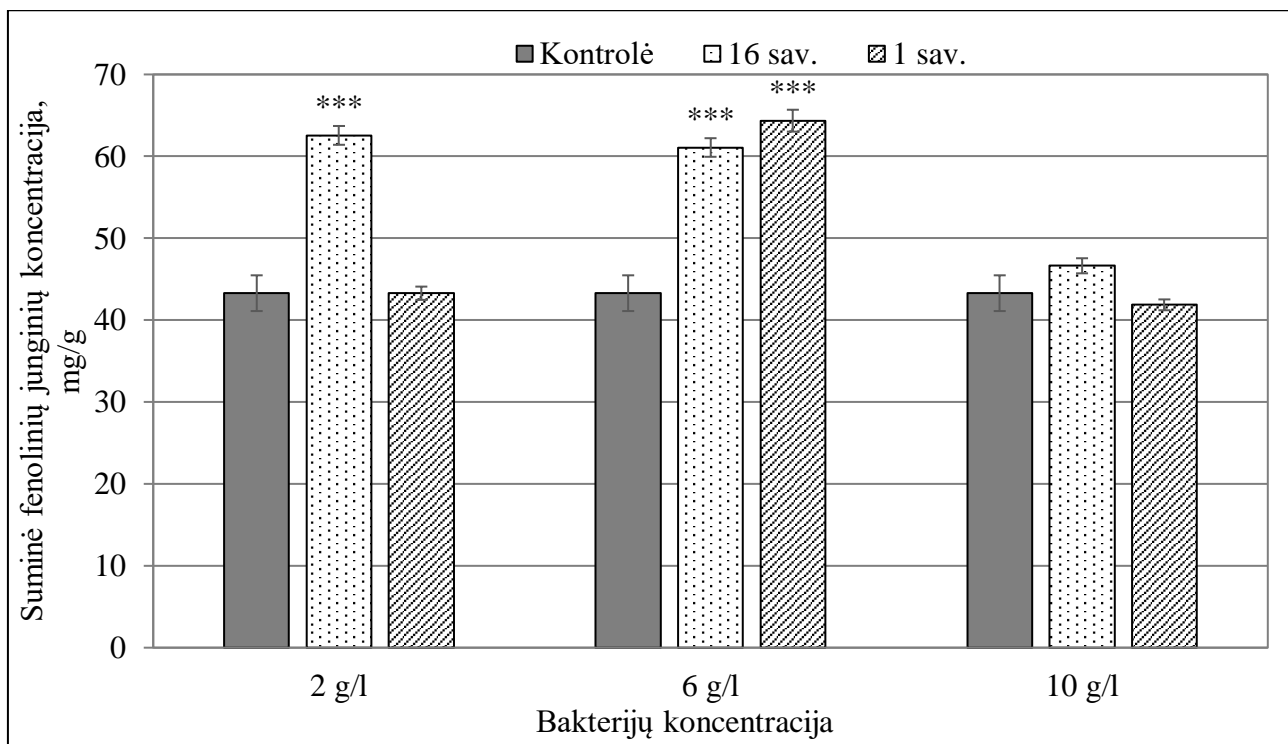
**3.8 pav.** Bakterijos koncentracijos įtaka chlorofilo *a/b* santykio kitimui *Stevia rebaudiana* augalų stambiuose ir smulkiuose ūgliuose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01;

### 3.2. *Paenibacillus* bakterijos laikymo trukmės poveikis biologiškai aktyviųjų cheminių junginių sintezei stevijos augaluose

Mokslinio tyrimo metu, tiriant *Paenibacillus* preparato 1 sav. ir 16 sav. senumo poveikį *in vitro* adaptuojamoms stevijoms, buvo nustatytas šio preparato skirtingos koncentracijos poveikis svarbiausiems stevijų biocheminiams rodikliams: antrinių metabolitų fenolinių junginių bei flavonoidų koncentracijai, pigmentų karotinoidų bei chlorofilų koncentracijai, taip pat – antioksidaciniam stevijų ūglių aktyvumui pagal DPPH ir ABTS rodiklius. Biocheminių rodiklių nustatymo metodai pateikti antrame šio darbo skyriuje (žr. 2. skyrių).

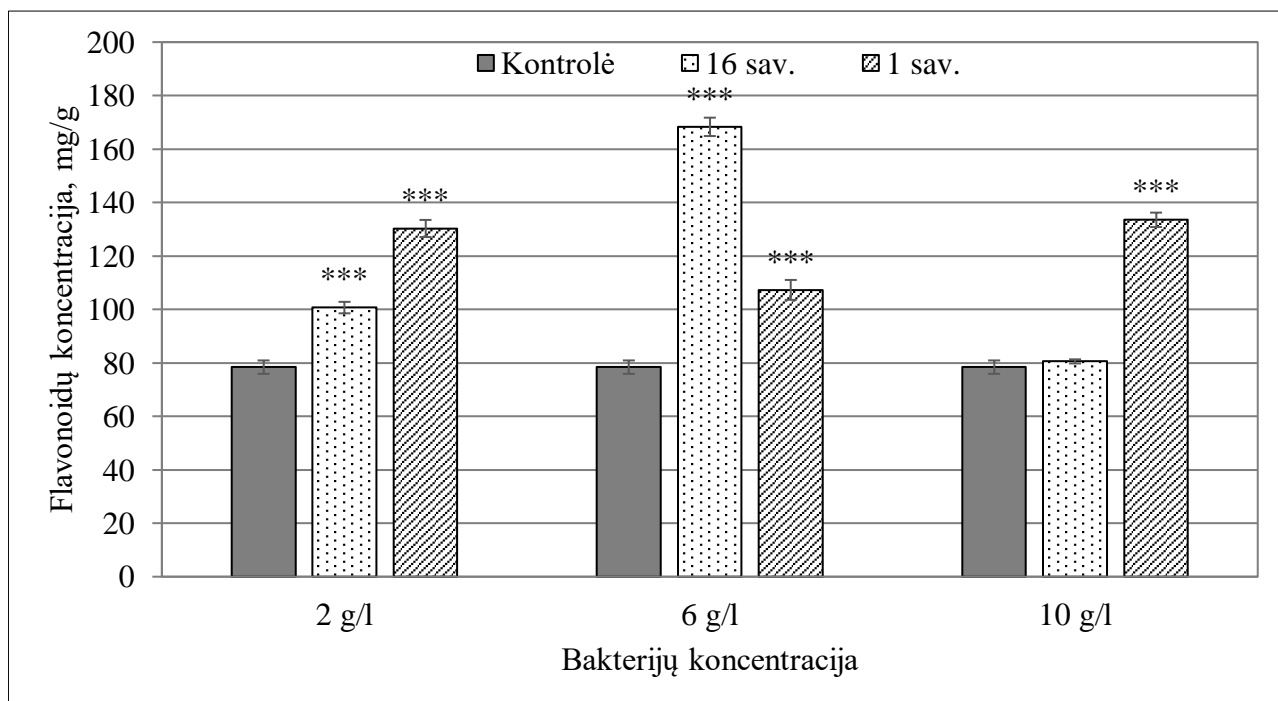
Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad fenolinių junginių koncentracija stevijos ūgliuose padidėjo naudojant 2 g/l ir 6 g/l senesnio (16 sav.) preparato koncentraciją bei 6 g/l šviežio (1 sav.) preparato koncentraciją (žr. 3.9 pav.).





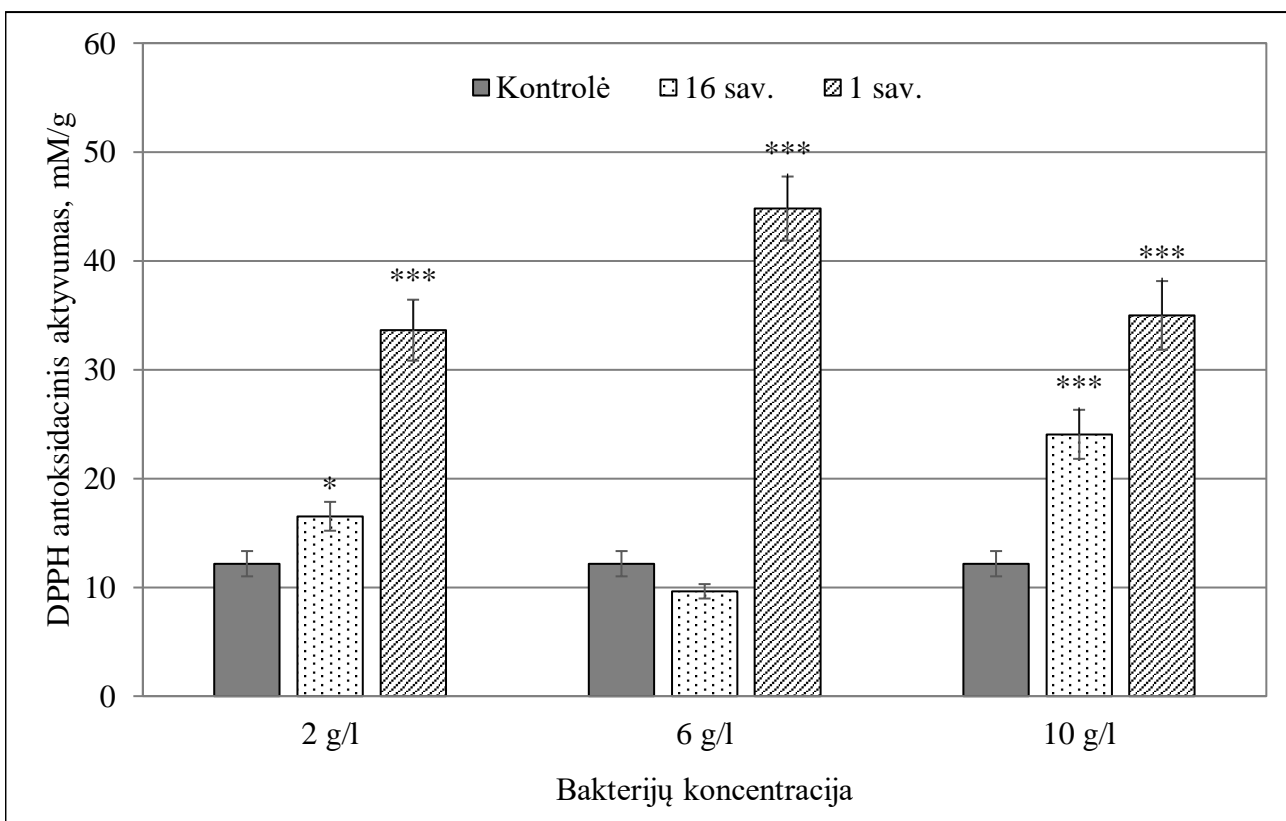
**3.9 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka bendrai fenolinių junginių koncentracijai *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*\*P < 0,001.

Tyrimo metu flavonoidų koncentracija gerokai padidėjo stevijos ūgliuose, kurie paveikti buvo šviežio (1 sav.) 2 g/l ir 10 g/l bakterinio preparato koncentracijos, tačiau dar stipresnį teigiamą poveikį šiam rodikliui turėjo senesnio (prieš 16 sav. liofilizuotas) 6 g/l bakterinio preparato koncentracijos (žr. 3.10 pav.).

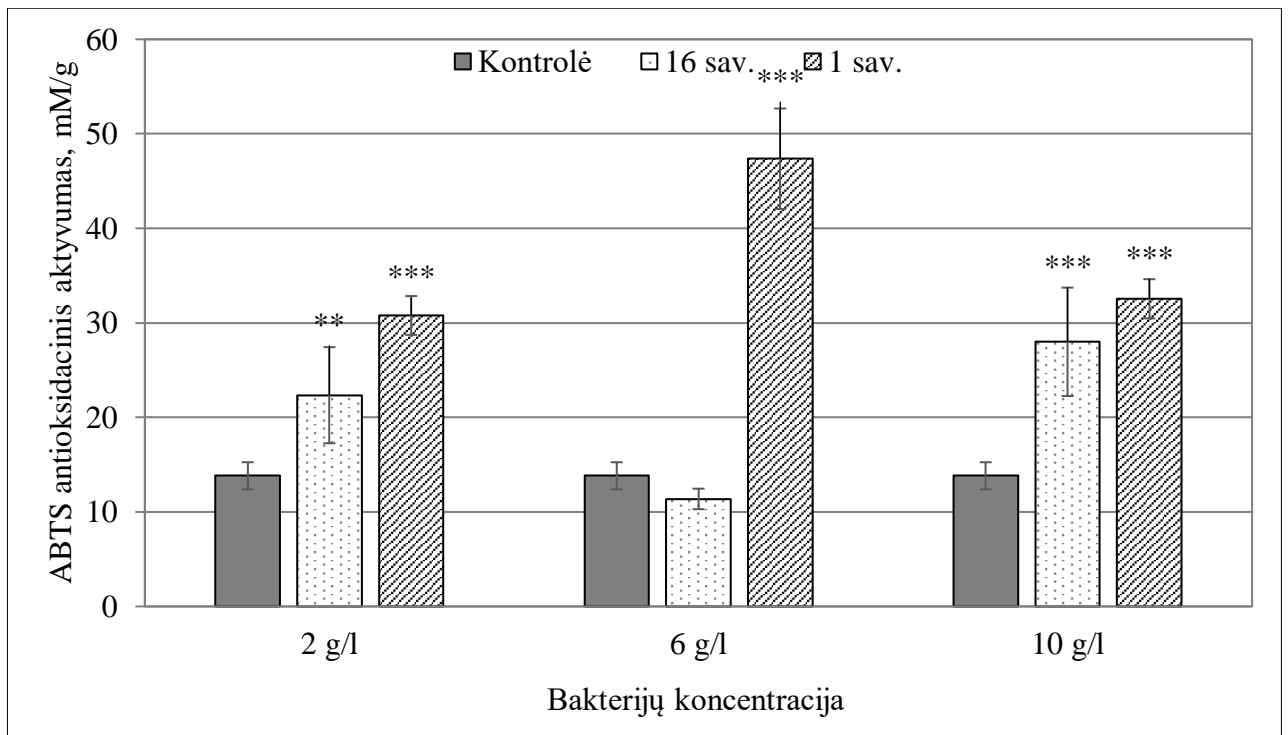


**3.10 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka flavonoidų koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*\*P < 0,001.

Tyrimai parodė, kad didžiausias teigiamas poveikis stevijos ūglių antioksidacinio aktyvumo pokyčiams, lyginant su kontroliniu variantu, nustatytas po 6 g/l koncentracijos šviežio (1 sav.) bakterinio preparato poveikio (žr. 3.11 ir 3.12 pav.). Truputį silpnesnis teigiamas poveikis, lyginant su 6 g/l koncentracijos preparatu, DPPH ir ABTS antioksidaciniam aktyvumui nustatytas panaudojus 2 g/l bei 10 g/l šviežio bakterinio preparato koncentracijas (žr. 3.11 ir 3.12 pav.). Tuo tarpu senesnio (16 sav.) bakterinio preparato teigiamas poveikis stevijos ūglių antioksidaciniam aktyvumui nebuvo toks ryškus, kaip šviežio preparato. Tačiau su senesniu (16 sav.) 10 g/l koncentracijos bakteriniu preparatu buvo pasiektas didžiausias antioksidacinis aktyvumas, lyginant su kitomis senesnio preparato koncentracijomis (žr. 3.11 ir 3.12 pav.).

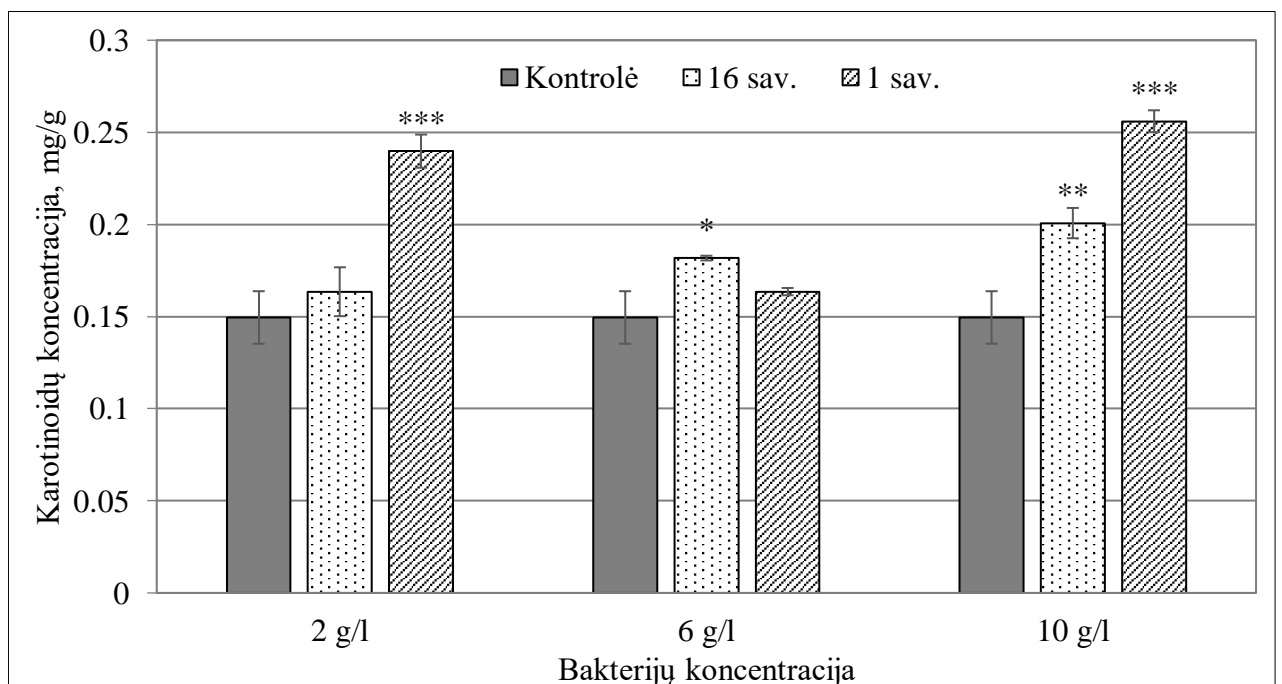


**3.11 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka DPPH antioksidaciniam aktyvumui *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001.



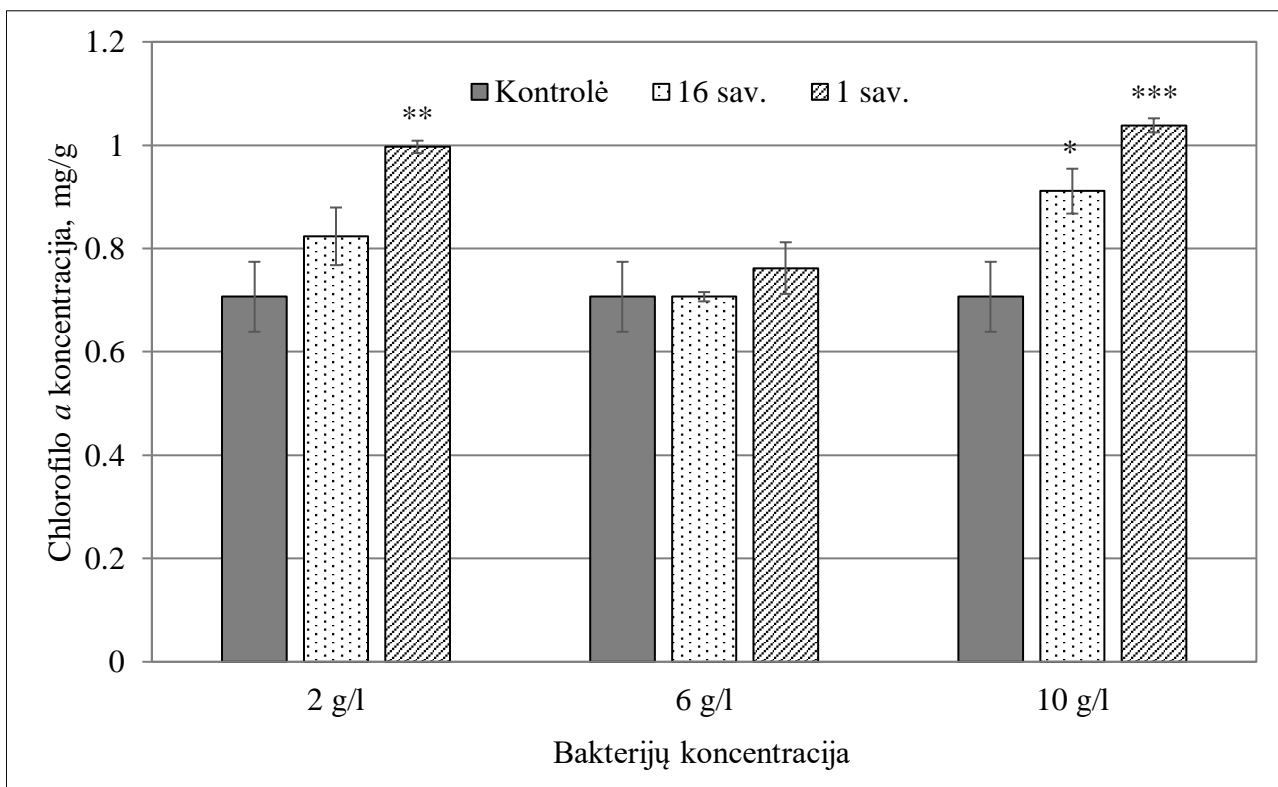
**3.12 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka ABTS antioksidaciniam aktyvumui *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

Šio tyrimo metu nustatyta, kad karotinoidų kiekį stevijos ūgliuose labiausiai padidino 2 g/l ir 10 g/l šviežio (1 sav.) bakterinio preparato koncentracijos (žr. 3.13. pav). Šiuose variantuose, lyginant su kontroliniu, buvo nustatyta 1,5 karto didesnė karotinoidų koncentracija, kuri siekia iki 0,26 mg/g.



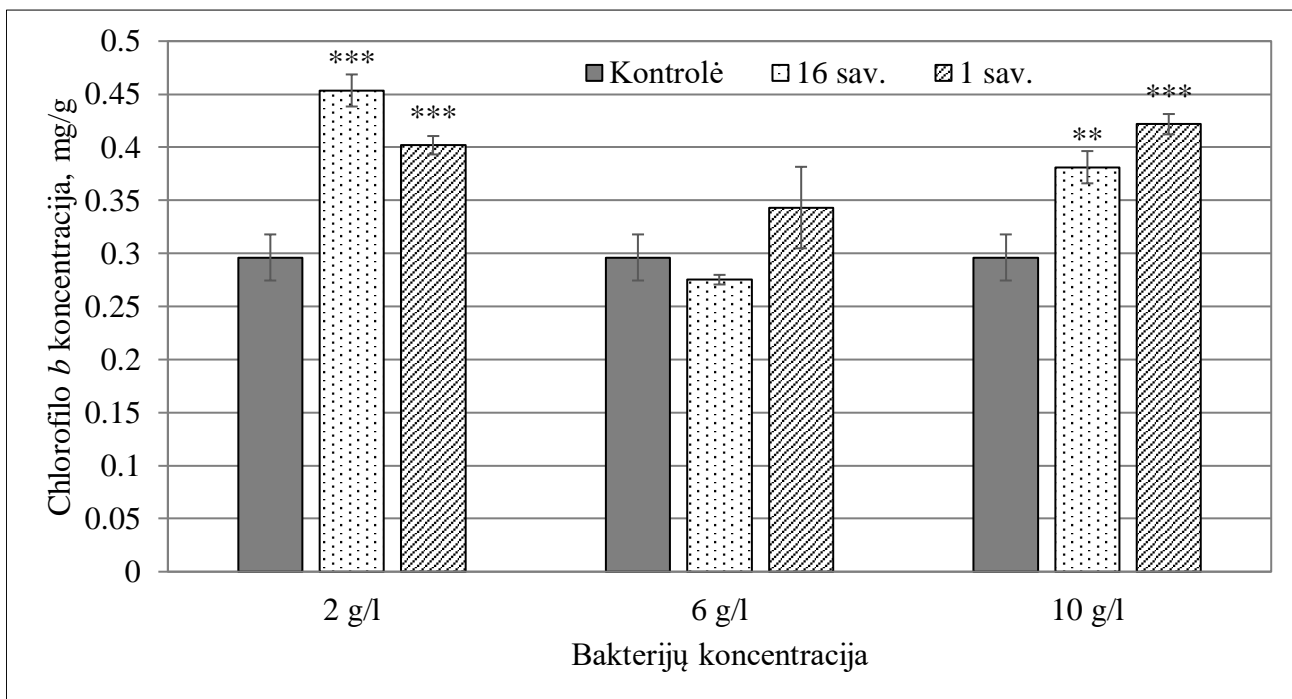
**3.13 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka karotinoidų koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

Tolimesnio tyrimo metu nustatyta, kad svarbiausio fotosintezės pigmento – chlorofilo *a* – koncentraciją stevijos ūgliuose taip pat labiausiai padidino 2 g/l ir 10 g/l šviežio (1 sav.) bakterinio preparato koncentracijos (žr. 3.14 pav.). Šių koncentracijų senesnis (16 sav.) preparatas pasižymėjo šiek tiek mažesniu teigiamu poveikiu, lyginant su šviežiu preparatu (žr. 3.14 pav.).



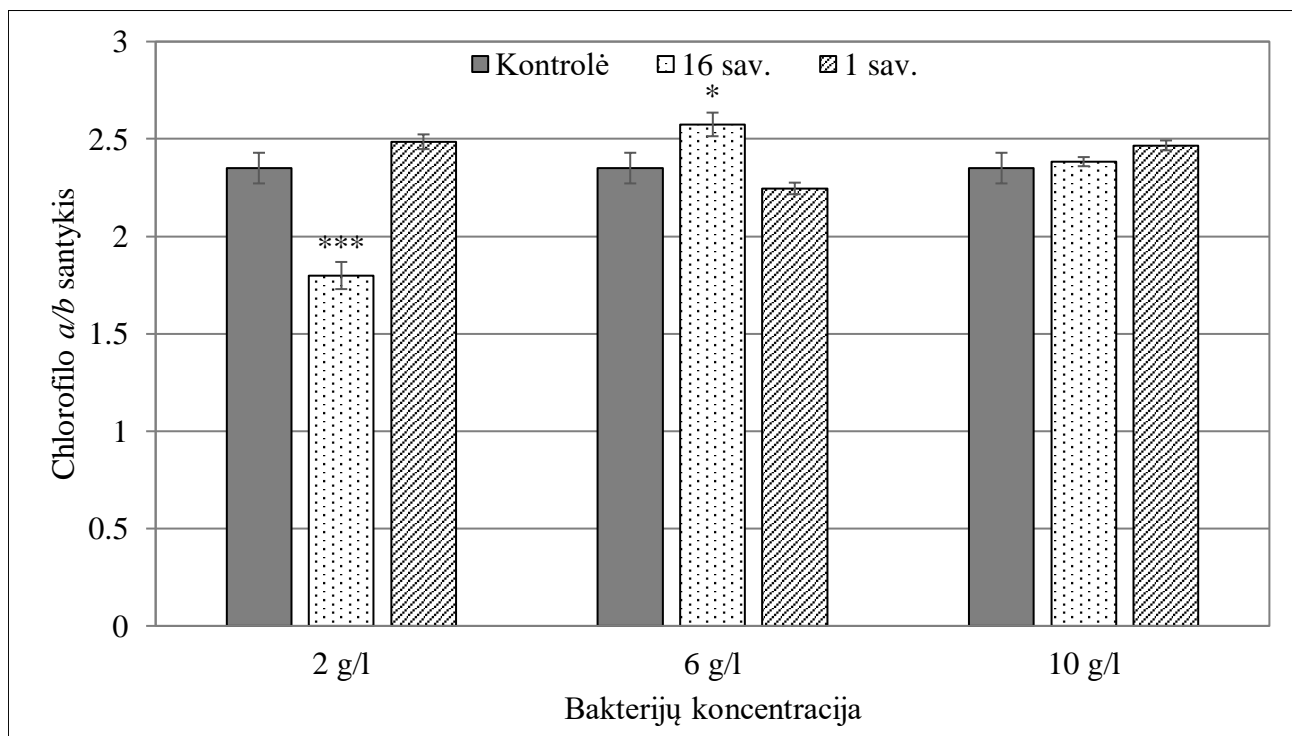
**3.14 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka chlorofilo *a* koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Chlorofilo *b* susidarymui gana stiprų teigiamą poveikį turėjo tiek šviežio, tiek senesnio preparato 2 g/l ir 10 g/l koncentracijos (žr. 3.15 pav.). Didžiausia chlorofilo *b* koncentracija gauta stevijos ūglius paveikus senesniu 2 g/l bakterinio preparato koncentracija (žr. 3.15 pav.). Šiame mėginyje chlorofilo *b* koncentracija siekia iki 0,45 mg/g.



**3.15 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka chlorofilo *b* koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

Optimalus chlorofilo *a* ir *b* santykis yra 3:1, tačiau atlikto tyrimo metu nepastebėtas reikšmingas teigiamas poveikis stevijos ūglius paveikus bakteriniu preparatu (žr. 3.16 pav.).



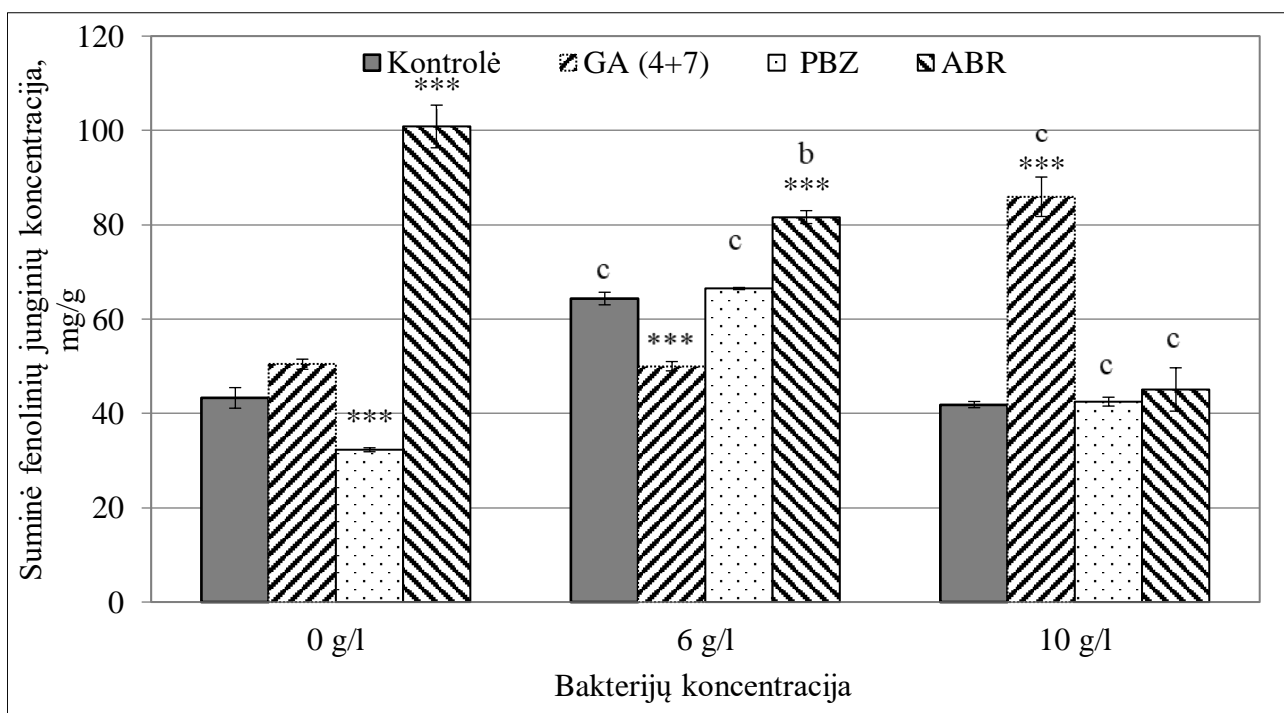
**3.16 pav.** Bakterijos laikymo trukmės įtaka chlorofilo *a/b* santykio kitimui *Stevia rebaudiana* augaluose. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001;

Atlikti tyrimai leidžia daryti išvadą, kad tiek 16 sav. laikyta bakterija, tiek po 1 sav. paruošta 6 g/l bakterijos koncentracija yra optimaliausias variantas norint paspartinti cheminių junginių sintezę, padidinti antioksidantų gamybą.

### 3.3. *Paenibacillus* bakterijos koncentracijos ir augimo reguliatorių poveikis stevijos vystymuisi ir biologiškai aktyviųjų cheminių junginių sintezei

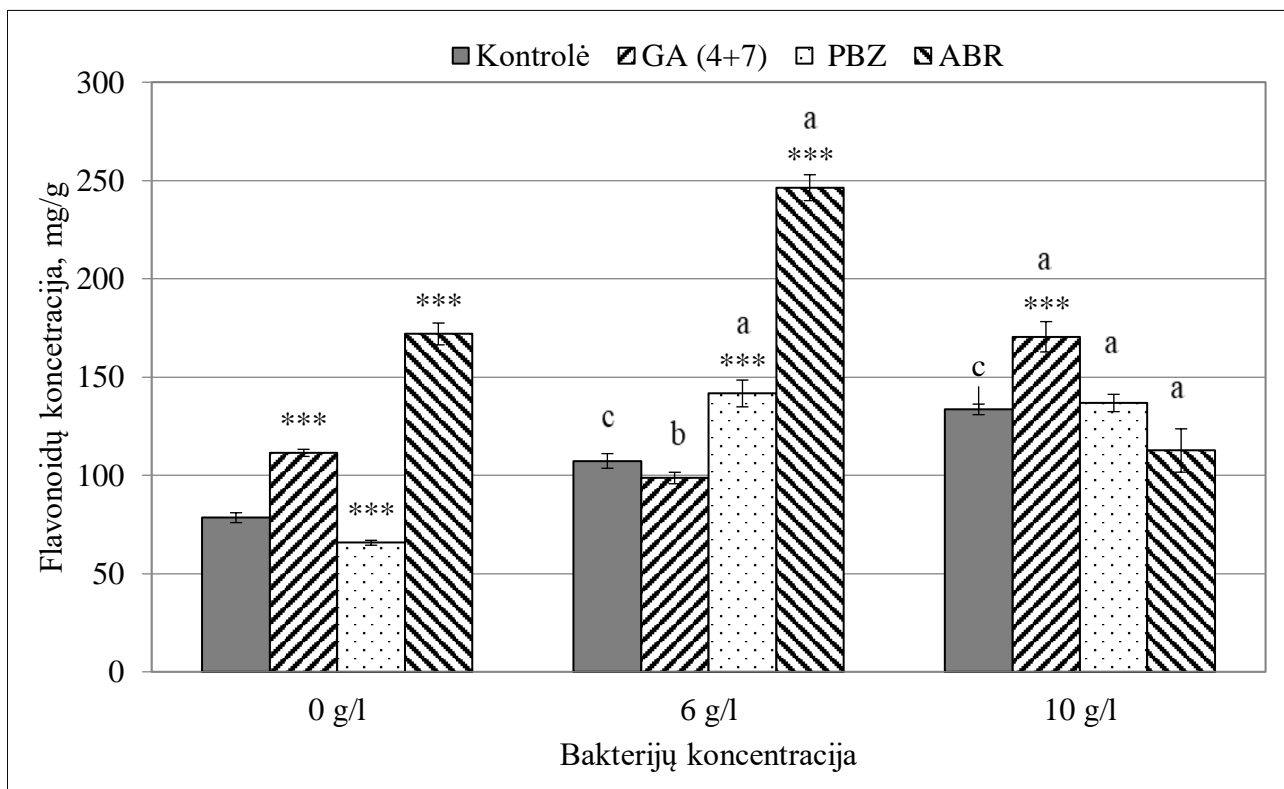
Šio mokslinio tyrimo metu, tiriant *Paenibacillus* preparato bei cheminių augimo reguliatorių poveikį *ex vitro* adaptuojamoms stevijoms, buvo nustatyti ir šių medžiagų poveikiai svarbiausiems stevijų biocheminiams rodikliams: antrinių metabolitų fenolių bei flavonoidų koncentracijai, pigmentų karotinoidų bei chlorofilų koncentracijai, taip pat – antioksidaciniam stevijų ūglių aktyvumui pagal DPPH ir ABTS rodiklius. Biocheminių rodiklių nustatymo metodai pateikti antrame šio darbo skyriuje (žr. 2. skyrius).

Tiriamų preparatų poveikis fenolinių junginių koncentracijoms stevijų ūgliuose pavaizduotas 3.17 pav. Tyrimai parodė, kad vienas iš tirtų hormoninių augimo reguliatorių – ABR – sukėlė ryškesnius pokyčius negu *Paenibacillus* preparatas. Vertinant bendrą fenolinių junginių koncentraciją ir atliekant palyginimą su jokia preparatu nepaveiktu variantu, nustatyta, kad 6 g/l *Paenibacillus* preparato padidino fenolinių junginių koncentraciją 1,48 karto, o ABR (be bakterinio preparato) – net 2,33 karto (žr. 3.17 pav.). Itin aukšta fenolinių junginių koncentracija buvo nustatyta ir varianto, paveikto GA<sub>4+7</sub> ir 10 g/l *Paenibacillus* preparato, ūgliuose, šiek tiek mažesni teigiamą poveikį, lyginant su GA<sub>4+7</sub> ir 10 g/l bakterinio preparato koncentracija, parodė ir bandinys su ABR ir 6 g/l bakterinio preparato koncentracija (žr. 3.17 pav.).



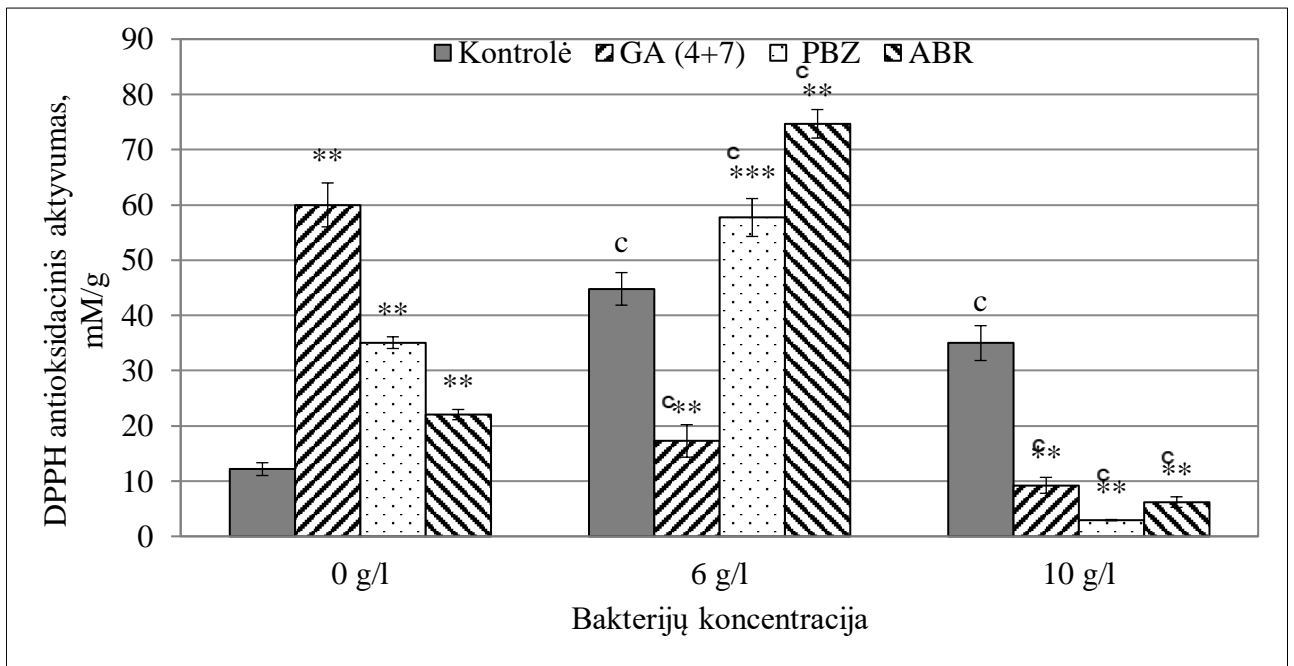
**3.17 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir abscizo rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka bendrai fenolinių junginių koncentracijai *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_b < 0,01$ ;  $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*\* $P < 0,001$ .

Tolesnių tyrimų metu gauti rezultatai parodė, kad ABR (be bakterinio preparato) poveikis sąlygojo 2,19 karto didesnę flavonoidų koncentraciją, tačiau ypatingai išsiskyrė ABR ir 6 g/l *Paenibacillus* preparato kombinacijos poveikis: taikant pastarąjį stevijų apdorojimo variantą, buvo gauta net 3,13 karto didesnė flavonoidų koncentracija, lyginant su jokia preparatu nepaveiktu variantu (žr. 3.18 pav.). Taip pat teigiamu, bet ne tokiu ryškiu poveikiu pasižymėjo bandinys su GA<sub>4+7</sub> ir 10 g/l bakterinio preparato koncentracija, lyginant su bakterijomis nepaveiktu GA<sub>4+7</sub> mėginiu (žr. 3.18 pav.).

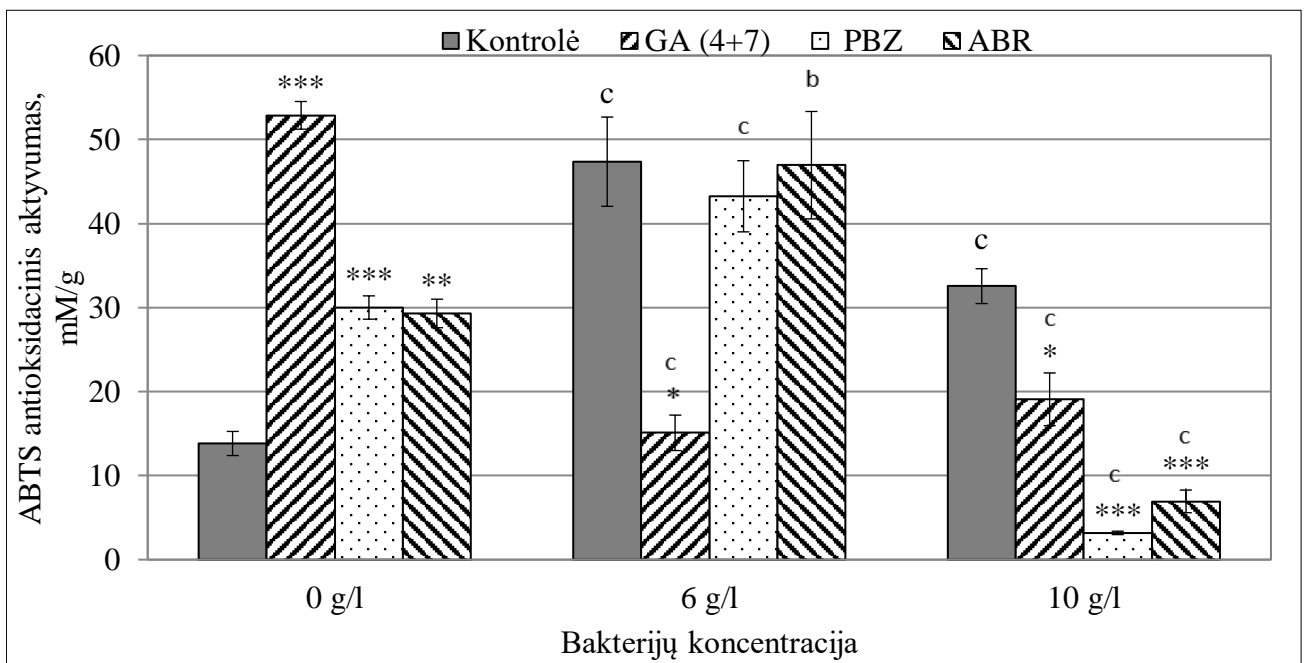


**3.18 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir abscizo rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka flavonoidų koncentracijai *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_a < 0,05$ ;  $P_b < 0,01$ ;  $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\*\* $P < 0,001$ .

Vertinant *Paenibacillus* preparato poveikį antioksidaciniam aktyvumui nustatyta, kad abi tirtos šio preparato koncentracijos sustiprino tiek DPPH, tiek ABTS antioksidacinį efektyvumą kontroliniuose tirpaluose (žr. 3.19 ir 3.20 pav.). Tačiau 6 g/l poveikis buvo stipresnis negu 10 g/l poveikis. Lyginant su jokia preparatu nepaveiktu variantu, 6 g/l *Paenibacillus* preparato poveikis sąlygojo 3,68 karto didesnę DPPH antioksidacinį aktyvumą (žr. 3.19 pav.) ir 3,42 karto didesnę ABTS antioksidacinį aktyvumą (žr. 3.20 pav.). Taip pat labai ryškus teigiamas poveikis gautas ABR ir 6 g/l preparato koncentracija, lyginant su bakterijomis nepaveiktu ABR mėginiu tiek DPPH, tiek ABTS antioksidaciniam aktyvumui (žr. 3.19 ir 3.20 pav.).



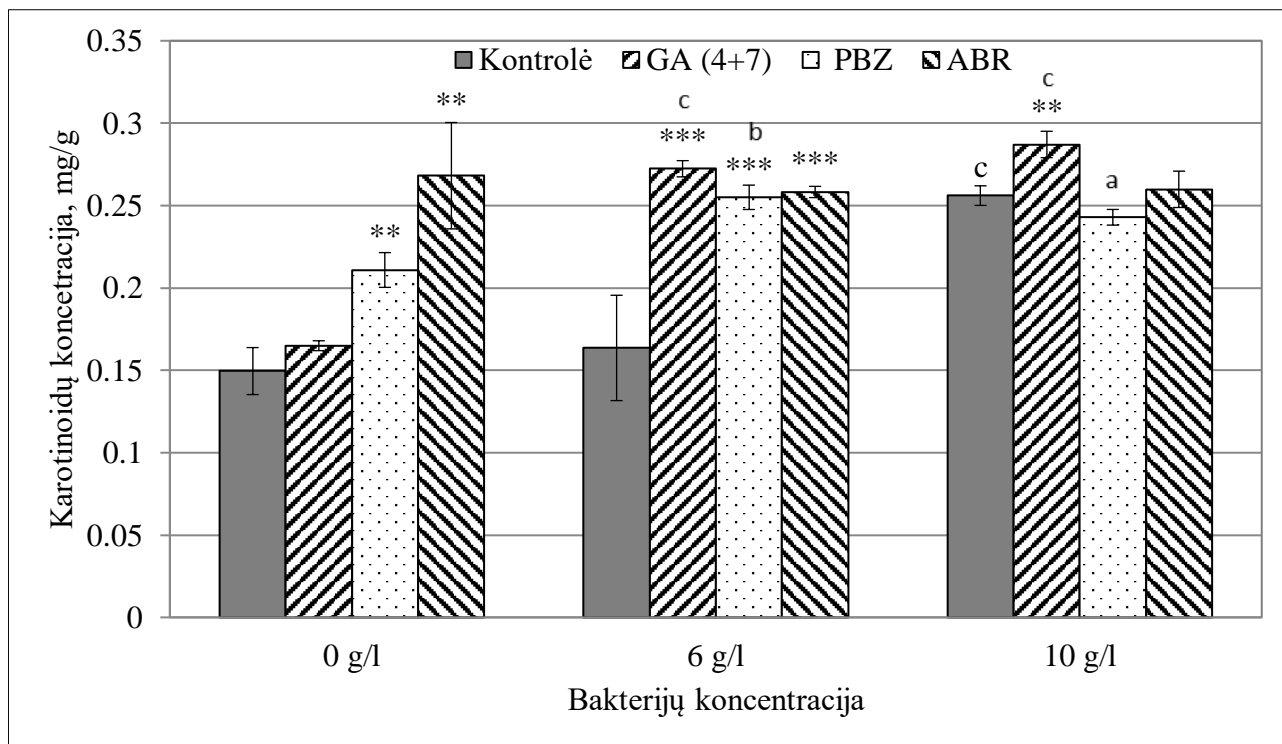
**3.19 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir abscizo rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka DPPH antioksidaciniam aktyvumui *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Raidė žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .



**3.20 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir abscizo rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka ABTS antioksidaciniam aktyvumui *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_b < 0,01$ ;  $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

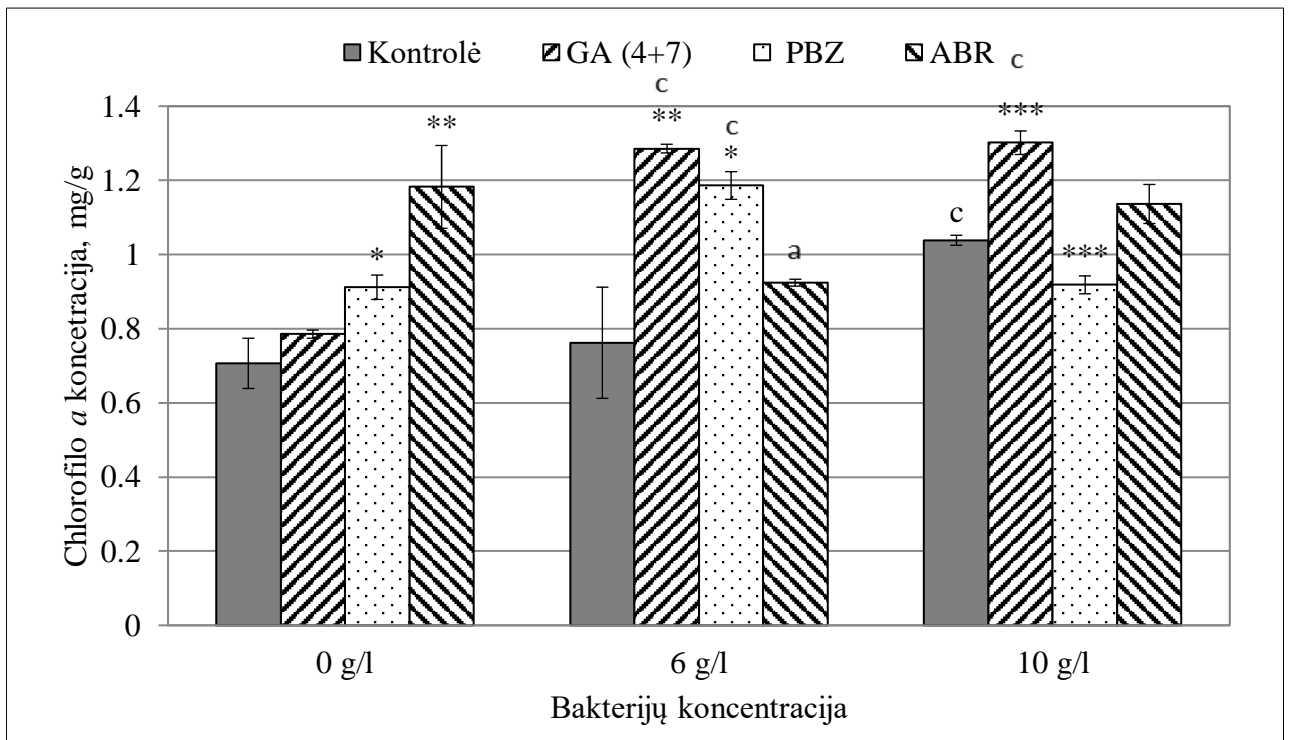


Tyrimo rezultatai parodė, kad karotinoidų koncentraciją patikimai padidino 10 g/l preparato koncentracija, t.y 1,71 karto, lyginant su jokiau preparatu nepaveiktu variantu (žr. 3.21 pav.). Reguliatorių teigiamu poveikiu išsiskyrė ABR, kuri, veikdama atskirai nuo bakterinio preparato, taip pat patikimai padidino karotinoidų koncentraciją, t.y. 1,79 karto, lyginant su jokiau preparatu nepaveiktu variantu (žr. 3.21 pav.). Didžiausias karotinoidų koncentraciją stėvijų ūgliuose sąlygojo bendras GA<sub>4+7</sub> ir *Paenibacillus* preparato (tiek 6 g/l, tiek 10 g/l) poveikis, tačiau šių kombinacijų pranašumas prieš atskirai panaudotą ABR arba 10 g/l bakterinio preparato teigiamus poveikius nebuvo itin ryškus (žr. 3.21 pav.).



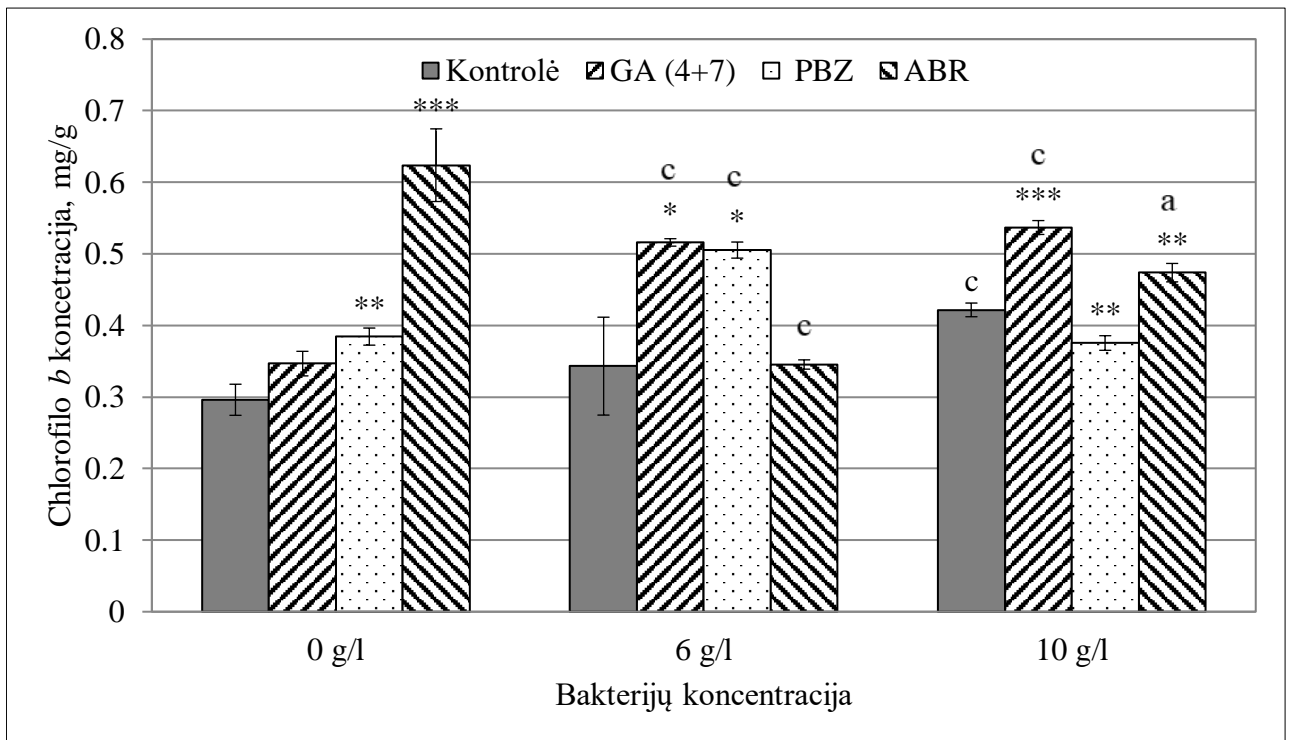
**3.21 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir abscizo rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka karotinoidų koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_a < 0,05$ ;  $P_b < 0,01$ ;  $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Tyrimo metu gautas labai panašus bakterijų ir hormonų poveikis chlorofilo *a* ir karotinoidų koncentracijos pokyčiui. Chlorofilo *a* koncentraciją patikimai padidino 10 g/l preparato koncentracija, t.y. 1,47 karto, lyginant su jokiau preparatu nepaveiktu variantu (žr. 3.22 pav.). Reguliatorių teigiamu poveikiu išsiskyrė ABR, kuri, veikdama atskirai nuo bakterinio preparato, taip pat patikimai padidino chlorofilo *a* koncentraciją, t.y. 1,67 karto, lyginant su jokiau preparatu nepaveiktu variantu (žr. 3.22 pav.). Didžiausias chlorofilo *a* koncentraciją stėvijų ūgliuose sąlygojo bendras GA<sub>4+7</sub> ir *Paenibacillus* preparato (tiek 6 g/l, tiek 10 g/l) poveikis, tačiau šių kombinacijų pranašumas prieš atskirai panaudotą ABR arba 10 g/l bakterinio preparato teigiamus poveikius nebuvo itin ryškus (žr. 3.22 pav.).



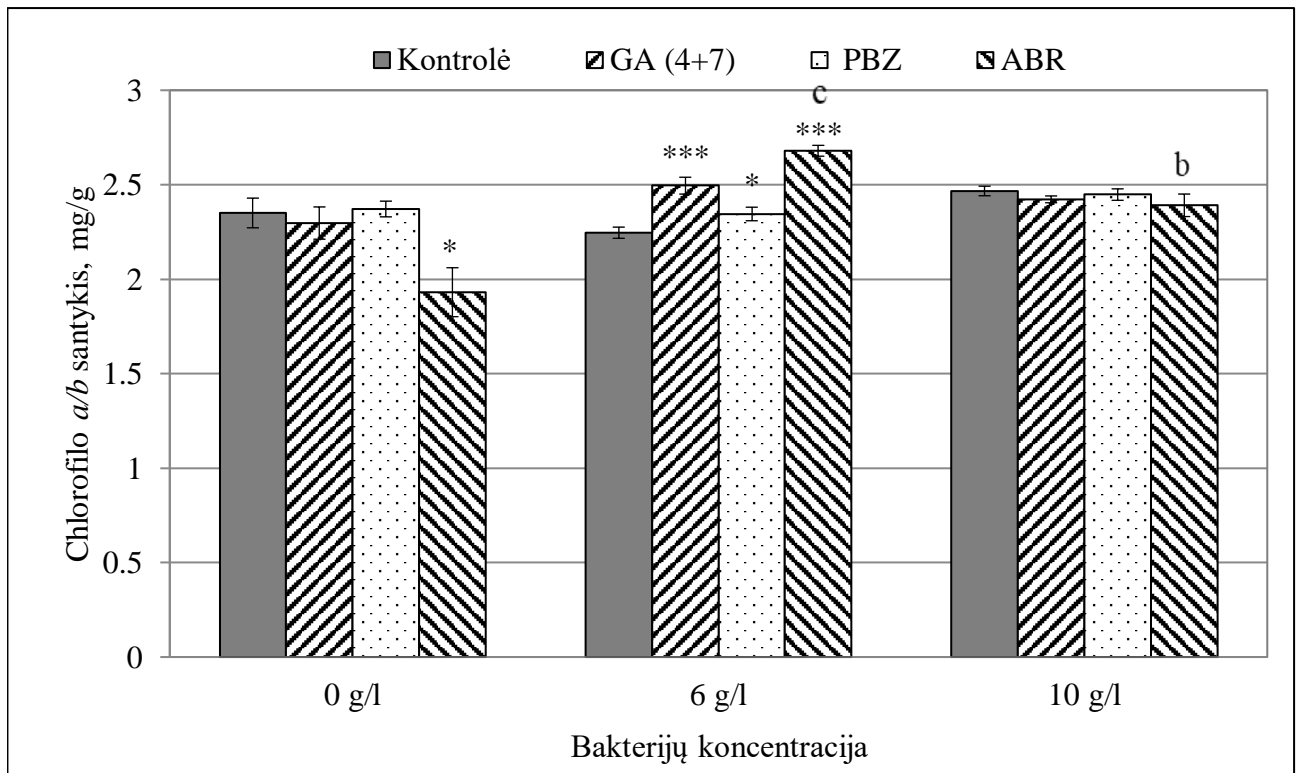
**3.22 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino ( $GA_{4+7}$ ) ir absizino rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka chlorofilo *a* koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_a < 0,05$ ;  $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Vertinant tyrimo metu gautus chlorofilo *b* koncentracijos rezultatus, galima pastebėti, kad ABR be bakterinio preparato poveikio pasižymi didžiausiu teigiamu poveikiu chlorofilo *b* susidarymui. Šiame mėginyje pasiekta iki 0,62 mg/g chlorofilo *b* koncentracija (žr. 3.23 pav.). Kiti mėginiai nepasižymėjo ryškesniu poveikiu chlorofilo *b* susidarymui.



**3.23 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir absizino rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka chlorofilo *b* koncentracijos kitimui *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_a < 0,05$ ;  $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkręsto kontrolinio varianto pažymėti: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Atlikto tyrimu metu pastebėta, kad bakterijos ir hormonai nepasiekė optimalaus chlorofilo *a* ir *b* santykio, kuris atitinkamai yra 3:1. Didžiausią santykį pavyko pasiekti stevijos ūglius paveikus ABR ir 6 g/l bakterinio preparato koncentracija, šis santykis siekia 2,68 mg/g (žr. 3.24 pav.).



**3.24 pav.** Skirtingų naudojamų augalų hormonų paklobutrazolio (PBZ), giberelino (GA<sub>4+7</sub>) ir abscizo rūgšties (ABR) ir bakterijų koncentracijos įtaka chlorofilo *a/b* santykio kitimui *Stevia rebaudiana* augalų ūgliuose. „Kontrolė“ – bakterijomis nepaveikti augalai. Skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus skirtumus ( $P_b < 0,01$ ;  $P_c < 0,001$ ) tarp skirtingomis bakterijos koncentracijomis paveiktų augalų grupes. Patikimi skirtumai nuo bakterijomis neužkrėsto kontrolinio varianto pažymėti: \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;

#### 4. Rekomendacijų dalis

Atlikti tyrimai parodė, kad paveikus stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) augalą įvairiais augimo regulatoriais bei bakterijomis, augalo viduje susidaro didesnė koncentracija biologiškai aktyviųjų cheminių junginių, kurie teigiamai veikia žmogaus sveikatą. Atsižvelgiant į šių medžiagų tirpumą riebaluose [73], 4.1 paveiksle pateikiama eterinio aliejaus, išskirto iš stevijos (*Stevia rebaudiana* Bertoni) lapų, principinė aparatūrinė schema. Šią schemą sudarančių įrenginių žymėjimai ir paaiškinimai pateikti 4.1. lentelėje.

Pirmiausia stevijos augalo lapai patalpinami į ekstrakcijos talpą (C-1). Vėliau anglies dioksido dujos iš jų laikymo talpos (A-1) stūmokliniu siurbliu (S-1), pro atidarytus vožtuvus (V-1, V-2), tiekiamas į talpą (B-1), kuri yra kaitinama iki 30 °C laipsnių temperatūros [74, 75]. Į šią talpą tiekiamos anglies dioksido dujos, kol susidaro 200 bar slėgis [74, 75]. Susidariusio slėgio rodiklis išmatuojamas slėgio matuokliu (P-1). Kai anglies dioksido dujos kaitinamojoje talpoje (B-1) pasiekia nurodytus parametrus, šios dujos būna superkritinėje, dar vadinama virškritinėje, būsenoje. Tokioje būsenoje anglies dioksidas yra skystas ir pasižymi efektyviu įvairių medžiagų tirpinimu. Slėgio reikšmei palaikyti yra naudojamas atgalinio slėgio reguliatorius (V-3). Taip pat reikalingos temperatūros užtikrinimui yra įrengtas šilumokaitis (HE-1) ir termometras (T-1), temperatūros pokyčiams stebėti. Sklandžiam procesui palaikyti naudojamas skysčių srauto matuoklis (FM-1) ir mechaninis vožtuvas (V-4), pro kuriuos 10 ml/min. greičiu prateka skystas anglies dioksidas [76].

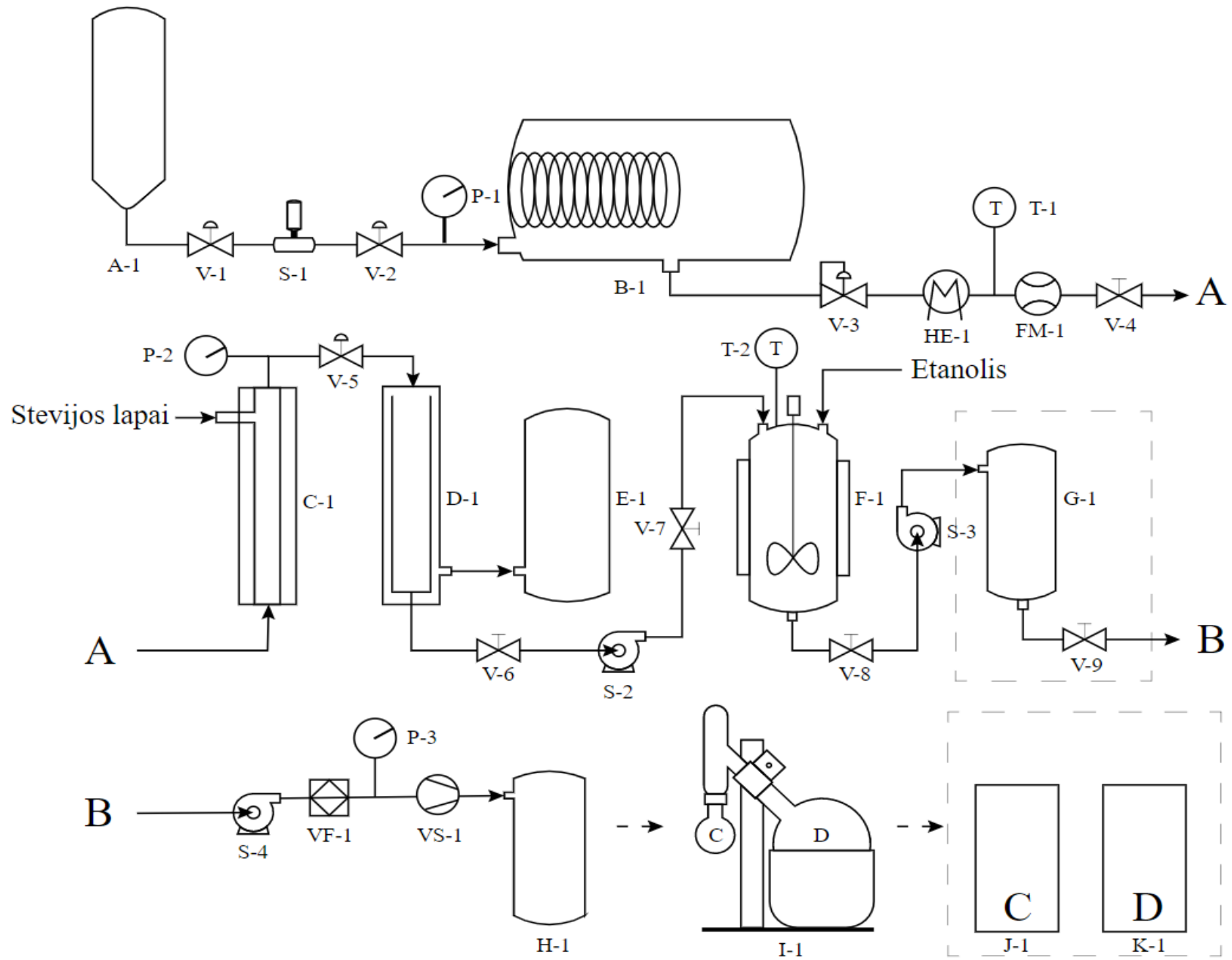
Skystas anglies dioksidas tiekiamas į ekstrakcijos talpą (C-1), kurioje iš anksto yra patalpinti stevijos lapai. Stevijos lapuose esantys biologiškai aktyvūs cheminiai junginiai pereina į anglies dioksido skystį ir taip pro talpos (C-1) višų ir atidarytą vožtuvą (V-5) patenka į separatorių (D-1). Ekstrakcijos metu svarbu palaikyti reikiamą slėgį, tam įrengtas papildomas slėgio matuoklis (P-2).

Anglies dioksidas patekęs į separatorių, kuriame nėra sudarytas 6,5-300 bar slėgis ir palaikoma 25-120 °C laipsnių temperatūra [77], iš skystos būsenos tampa dujomis ir yra surenkamas į atskirą tam skirtą talpą (E-1). Tuo tarpu likęs ekstraktas išcentrinio siurblio (S-2) sudarytu slėgiu, pro atidarytus vožtuvus (V-6, V-7), tiekiamas į maišyklę (F-1). Į šią maišyklę tiekiamas 0,5 ml/min. greičiu etanolio tirpalas [76]. Šio proceso metu kaitinimo elementais palaikoma 30 °C laipsnių temperatūra [74, 75, 78]. Ši reikšmė matuojama prie maišyklės pritvirtintu termometru (T-2). Masė maišyklėje (F-1) valandą laiko maišoma 200 aps/min. [79]. Vėliau susidaręs etanolio ekstraktas išcentrinio siurbliu (S-3) pro atidarytą vožtuvą (V-8) yra tiekiamas į ekstrakto laikymo talpyklą (G-1), kuri 4 valandas laikoma -70 °C laipsnių temperatūroje [80].

Praėjus 4 valandoms, išcentrinio siurblio (S-4) sudarytu slėgiu, pro atidarytą vožtuvą (V-9) skystis tiekiamas link vakuuminio filtro (VF-1). Vakuuminio siurblio (VS-1) sudarytu vakuumu skystis pereina pro filtrą (VF-1) ir toliau yra tiekiamas į sekančią laikymo talpą (H-1). Slėgio matuokliu (P-3) stebimas slėgis, kuris lemia efektyvų filtracijos procesą. Filtracijos metu iš riebaluose tirpių medžiagų ir etanolio tirpalo pašalinami riebalai ir vaškai. Iš laikymo talpos (H-1) filtratas supilamas į apvaliadugnę kolbą, kuri vėliau pritvirtinama prie rotacinio vakuuminio garintuvo (I-1). Šio proceso metu iš aliejaus ir etanolio tirpalo pašalinamas alkoholis. Nustatomas 200 mbar slėgis, palaikoma 30 °C laipsnių temperatūra 60 min. [80, 81]. Pasibaigus garinimo procesui surinktas etanolis kaupiamas ir laikomas etanolio surinkimo talpoje (J-1), o likęs eterinis aliejus perpilamas į eterinio aliejaus laikymo talpą (K-1).

**4.1. lentelė.** Principinės aparatūrinės schemos prietaisų pavadinimai ir žymėjimai

<b>Prietaiso pavadinimas</b>	<b>Prietaiso žymėjimas</b>
CO <sub>2</sub> talpa	A-1
Talpa su aukštos temperatūros kaitinimo elementu	B-1
Ekstrakcijos talpa	C-1
Separatorius	D-1
Talpa su panaudotu CO <sub>2</sub>	E-1
Maišyklė su kaitinimo elementu	F-1
Ekstrakto laikymo talpa	G-1, H-1
Rotacinis vakuuminis garintuvas	I-1
Talpa su panaudotu etanolium	J-1
Talpa su produktu	K-1
Pneumatinis vožtuvas	V-1, V-2, V-5
Atgalinio slėgio reguliatorius	V-3
Mechaninis vožtuvas	V-4, V-6, V-7, V-8, V-9
Skysčių srauto matuoklis	FM-1
Šilumokaitis	HE-1
Slėgio matuoklis	P-1, P-2, P-3
Stūmoklinis siurblys	S-1
Išcentrinis siurblys	S-2, S-3, S-4
Vakuuminis siurblys	VS-1
Termometras	T-1, T-2
Vakuuminis filtras	VF-1



4.1 pav. Eterinio aliejaus, išskirto iš stevijos (lot. *Stevia rebaudiana* Bertoni) lapų, principinė aparatūrinė schema

## Išvados

1. Nustatyta, kad didžiausios vertės biologiškai aktyviųjų cheminių junginių, stevijos ūglius paveikus skirtingomis bakterinio preparato koncentracijomis, buvo: 64,36 mg/g fenolinių junginių (paveikus 6 g/l bakteriniu preparatu), 158,69 mg/g flavonoidų (nepaveikus bakterijomis), 44,80 mM/g DPPH ir 47,37 mM/g ABTS antioksidacinis aktyvumas (paveikus 6 g/l bakteriniu preparatu), 0,29 mg/g karotinoidų (paveikus 10 g/l bakteriniu preparatu), 1,08 mg/g chlorofilo *a* (paveikus 10 g/l bakteriniu preparatu), 0,46 mg/g chlorofilo *b* (paveikus 10 g/l bakteriniu preparatu), 2,52 chlorofilo *a/b* santykis (paveikus 6 g/l bakteriniu preparatu arba nepaveikus bakterijomis).
2. Nustatyta, kad didžiausios vertės biologiškai aktyviųjų cheminių junginių, stevijos ūglius paveikus šviežiu (1 sav.) arba senesniu (16 sav.) bakteriniu preparatu, buvo: 64,36 mg/g fenolinių junginių (paveikus 1 sav. bakteriniu preparatu), 168,30 mg/g flavonoidų (paveikus 16 sav. bakteriniu preparatu), 44,8 mM/g DPPH ir 47,37 mM/g ABTS antioksidacinis aktyvumas (paveikus 1 sav. bakteriniu preparatu), 0,26 mg/g karotinoidų (paveikus 1 sav. bakteriniu preparatu), 1,04 mg/g chlorofilo *a* koncentracija (paveikus 1 sav. bakteriniu preparatu), 0,45 mg/g chlorofilo *b* (paveikus 16 sav. bakteriniu preparatu), 2,58 chlorofilo *a/b* santykis (paveikus 16 sav. bakteriniu preparatu).
3. Nustatyta, kad didžiausios vertės biologiškai aktyviųjų cheminių junginių, stevijos ūglius paveikus augimo reguliatoriu giberelinu, paklobutrazoliu arba abscizo rūgštimi ir bakterijomis, buvo: 100,84 mg/g fenolinių junginių (paveikus ABR be bakterijų), 246,33 mg/g flavonoidų (paveikus ABR ir 6 g/l bakteriniu preparatu), 74,68 mM/g DPPH antioksidacinis aktyvumas (paveikus ABR ir 6 g/l bakteriniu preparatu) ir 52,88 mM/g ABTS antioksidacinis aktyvumas (paveikus GA<sub>4+7</sub> be bakterijų), 0,29 mg/g karotinoidų (paveikus GA<sub>4+7</sub> ir 10 g/l bakteriniu preparatu), 1,30 mg/g chlorofilo *a* (paveikus GA<sub>4+7</sub> ir 10 g/l bakteriniu preparatu), 0,62 mg/g chlorofilo *b* (paveikus ABR be bakterijų), 2,68 chlorofilo *a/b* santykis (paveikus ABR ir 6 g/l bakteriniu preparatu).



## Literatūros sąrašas

1. SYLVETSKY, Allison C.; ROTHER, Kristina I. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology & behavior*, 2016, 164: 446-450. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 spalio 2 d.]. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.03.030. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938416301184>
2. BERNHOFT, Aksel. A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals*, 2010, 50: 11-17. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 rugsėjo 21 d.]. ISBN: 978-82-7099-583-7. Prieiga per: <http://english.dnva.no/binfil/download.php?tid=48677>
3. BLOMHOFF, Rune. Role of dietary phytochemicals in oxidative stress. *Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals*, 2010, 52-70. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gegužės 7 d.]. ISBN: 978-82-7099-583-7. Prieiga per: <http://english.dnva.no/binfil/download.php?tid=48677>
4. İNANÇ, A. Levent. Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 2011. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 rugsėjo 20 d.]. ISSN: 1304-7582. Prieiga per: [https://www.researchgate.net/profile/Ahmet-Inanc/publication/267786661\\_Chlorophyll\\_Structural\\_Properties\\_Health\\_Benefits\\_and\\_Its\\_Occurrence\\_in\\_Virgin\\_Olive\\_Oils/links/5a2eb6c00f7e9bfe816ff2b6/Chlorophyll-Structural-Properties-Health-Benefits-and-Its-Occurrence-in-Virgin-Olive-Oils.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ahmet-Inanc/publication/267786661_Chlorophyll_Structural_Properties_Health_Benefits_and_Its_Occurrence_in_Virgin_Olive_Oils/links/5a2eb6c00f7e9bfe816ff2b6/Chlorophyll-Structural-Properties-Health-Benefits-and-Its-Occurrence-in-Virgin-Olive-Oils.pdf)
5. GHACHERI, Matin, et al. Study of gene expression and steviol glycosides accumulation in *Stevia rebaudiana* Bertoni under various mannitol concentrations. *Molecular biology reports*, 2019, 46.1: 7-16. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 spalio 30 d.]. DOI: 10.1007/s11033-018-4250-4. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-018-4250-4>
6. RIZWAN, Farhana, et al. Renoprotective effects of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), amlodipine, valsartan, and losartan in gentamycin-induced nephrotoxicity in the rat model: Biochemical, hematological and histological approaches. *Toxicology reports*, 2019, 6: 683-691. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 rugpjūčio 22 d.]. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.07.003. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750019301428>
7. NOOR, Wan Noranida Wan Mohd; IBRAHIM, Nordiana; ABEDIN, NurFadhlina Zainal. The Growth and Yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown on Organically Amended Sandy Medium. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 birželio 4 d.]. ISSN 2221-8386. Prieiga per: [https://www.researchgate.net/profile/Amit-Kumar-Mondal-2/publication/270162812\\_Design\\_and\\_Development\\_of\\_Object\\_Recognition\\_and\\_Sorting\\_Robot\\_for\\_Material\\_Handling\\_in\\_Packaging\\_and\\_Logistic\\_Industries/links/54a2360b0cf256bf8baf7f30/Design-and-Development-of-Object-Recognition-and-Sorting-Robot-for-Material-Handling-in-Packaging-and-Logistic-Industries.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Amit-Kumar-Mondal-2/publication/270162812_Design_and_Development_of_Object_Recognition_and_Sorting_Robot_for_Material_Handling_in_Packaging_and_Logistic_Industries/links/54a2360b0cf256bf8baf7f30/Design-and-Development-of-Object-Recognition-and-Sorting-Robot-for-Material-Handling-in-Packaging-and-Logistic-Industries.pdf)
8. POOTHONG, Sukalya; KHEN, Thanh; CHUMPHUKAM, Orada. In vitro mineral nutrition for improving growth and multiplication of stevia. *Agriculture and Natural Resources*, 2018, 52.5: 477-483. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 vasario 16 d.]. DOI: 10.1016/j.anres.2018.11.007. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452316X18301455>
9. YADAV, Ashok Kumar, et al. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2011, 91.1: 1-27. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020

- rugpjūčio 30 d.]. DOI: 10.4141/CJPS10086. Prieiga per:  
<https://cdnsiencepub.com/doi/full/10.4141/cjps10086>
10. GONZÁLEZ, Cesar, et al. Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review. *Fruits*, 2014, 69.2: 127-141. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 vasario 23 d.]. DOI: 10.1051/fruits/2014003. Prieiga per:  
<https://fruits.edpsciences.org/articles/fruits/abs/2014/02/fruits140003/fruits140003.html>
  11. YADAV, Sudesh Kumar; GULERIA, Praveen. Steviol glycosides from Stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2012, 52.11: 988-998. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gegužės 28 d.]. DOI: 10.1080/10408398.2010.519447. Prieiga per:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.519447>
  12. ABOU-ARAB, Esmat A.; ABU-SALEM, Ferial M. Evaluation of bioactive compounds of Stevia rebaudiana leaves and callus. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 2010, 1.4: 209-224. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 balandžio 25 d.]. DOI: 10.1002/jsfa.6016. Prieiga per:  
[https://www.researchgate.net/publication/223515252\\_Cultivation\\_of\\_Stevia\\_Stevia\\_rebaudiana\\_Bert\\_Bertoni\\_A\\_Comprehensive\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/223515252_Cultivation_of_Stevia_Stevia_rebaudiana_Bert_Bertoni_A_Comprehensive_Review)
  13. 2008 m. gruodžio 16 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (EB) Nr. 1333/2008 dėl maisto priedų. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 lapkričio 27 d.]. Prieiga per:  
<http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1333/2020-12-23>; 2016 m. spalio 13 d. Komisijos reglamentas (ES) 2016/1814 dėl steviolio glikozidų (E 960) specifikacijų. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 lapkričio 27 d.]. Prieiga per: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/1814/oj>
  14. GUPTA, Ena, et al. Nutritional and therapeutic values of Stevia rebaudiana: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013, 7.46: 3343-3353. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gegužės 22 d.]. DOI: 10.5897/JMPR2013.5276. Prieiga per:  
[https://www.researchgate.net/publication/306153941\\_Nutritional\\_and\\_therapeutic\\_values\\_of\\_Stevia\\_rebaudiana\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/306153941_Nutritional_and_therapeutic_values_of_Stevia_rebaudiana_A_review)
  15. RIPPE, James M.; ANGELOPOULOS, Theodore J. Relationship between added sugars consumption and chronic disease risk factors: current understanding. *Nutrients*, 2016, 8.11: 697. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 birželio 18 d.]. DOI: 10.3390/nu8110697. Prieiga per:  
<https://www.mdpi.com/2072-6643/8/11/697>
  16. MKUU, Rahma, et al. Prevalence and factors associated with overweight and obesity in kenyan adult. *Preventive Medicine Reports*, 2021, 101340. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 balandžio 23 d.]. DOI: 10.1016/j.pmedr.2021.101340. Prieiga per:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211335521000310>
  17. MOORADIAN, Arshag D.; SMITH, Meridith; TOKUDA, Masaaki. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical nutrition eSPen*, 2017, 18: 1-8. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 rugsėjo 22 d.]. DOI: 10.1016/j.clnesp.2017.01.004. Prieiga per:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2405457717300232>
  18. TOEWS, Ingrid, et al. Association between intake of non-sugar sweeteners and health outcomes: systematic review and meta-analyses of randomised and non-randomised controlled trials and observational studies. *bmj*, 2019, 364. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 spalio 15 d.]. DOI: 10.1136/bmj.k4718. Prieiga per: <https://www.bmj.com/content/364/bmj.k4718>

19. TANDEL, Kirtida R. Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 2011, 2.4: 236. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 rugpjūčio 1 d.]. DOI: 10.4103/0976-500X.85936. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22025850/>
20. SAVITA, S. M., et al. Stevia rebaudiana—A functional component for food industry. *Journal of Human Ecology*, 2004, 15.4: 261-264. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 sausio 5 d.]. DOI: 10.1080/09709274.2004.11905703. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09709274.2004.11905703>
21. KOVAČEVIĆ, Danijela Bursać, et al. Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *Food chemistry*, 2018, 254: 150-157. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 spalio 30 d.]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.192. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618302164>
22. CHIRAG, P. J., et al. Antioxidant activity of herbal plants: A recent review. *J Drug Discov Ther*, 2013, 1.8: 01-08. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 balandžio 4 d.]. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.09.047. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14969719/>
23. ANTROPOVA, Irina G., et al. Radiation Chemical Investigation of Antioxidant Activity of Biologically Important Compounds from Plant Materials. *ACS omega*, 2020, 5.11: 5976-5983. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 kovo 15 d.]. DOI: 10.1021/acsomega.9b04335. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsomega.9b04335>
24. KARAKÖSE, Hande; MÜLLER, Anja; KUHNERT, Nikolai. Profiling and quantification of phenolics in Stevia rebaudiana leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63.41: 9188-9198. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 vasario 23 d.]. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01944. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b01944>
25. ANULIKA, N. Paul, et al. The chemistry of natural product: Plant secondary metabolites. *Int. J. Technol. Enhanc. Emerg. Eng. Res*, 2016, 4.8: 1-9. ISSN 2347-4289. Prieiga per: [https://www.researchgate.net/profile/Osamiabe-Ignatius-Enodiana/publication/308174475\\_The\\_Chemistry\\_Of\\_Natural\\_Product\\_Plant\\_Secondary\\_Metabolites/links/57dc6e6e08ae5292a379b6b4/The-Chemistry-Of-Natural-Product-Plant-Secondary-Metabolites.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Osamiabe-Ignatius-Enodiana/publication/308174475_The_Chemistry_Of_Natural_Product_Plant_Secondary_Metabolites/links/57dc6e6e08ae5292a379b6b4/The-Chemistry-Of-Natural-Product-Plant-Secondary-Metabolites.pdf)
26. GABASTON, Julien, et al. Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Industrial Crops and Products*, 2017, 103: 267-273. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gruodžio 16 d.]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.04.009. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669017302303>
27. GANTHALER, Andrea, et al. Foliar phenolic compounds in Norway spruce with varying susceptibility to *Chrysomyxa rhododendri*: analyses of seasonal and infection-induced accumulation patterns. *Frontiers in plant science*, 2017, 8: 1173. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 balandžio 4 d.]. DOI: 10.3389/fpls.2017.01173. Prieiga per: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01173/full>
28. MARČIULYNAS, Adas, et al. The Resistance of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Half-sib Families to *Heterobasidion annosum*. *Forests*, 2019, 10.3: 287. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 kovo 3 d.]. DOI: 10.3390/f10030287. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/1999-4907/10/3/287>
29. SHUKLA, Shruti, et al. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47.9: 2338-2343.

- [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 lapkričio 14 d.]. DOI: 10.1016/j.fct.2009.06.024. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691509002981>
30. PACIFICO, Severina, et al. New insights into phenol and polyphenol composition of *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2019, 163: 45-57. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 vasario 10 d.]. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.09.046. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708518314122>
  31. KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 liepos 1 d.]. DOI: 10.1155/2013/162750. Prieiga per: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>
  32. SAMANTA, Amallesh; DAS, Gouranga; DAS, Sanjoy Kumar. Roles of flavonoids in plants. *Carbon*, 2011, 100.6: 12-35. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 22 d.]. ISSN: 0975-0525. Prieiga per: [https://www.researchgate.net/profile/Sanjoy-Das-6/publication/279499208\\_Roles\\_of\\_flavonoids\\_in\\_Plants/links/5667098108ae8905db8b8b47/Roles-of-flavonoids-in-Plants.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sanjoy-Das-6/publication/279499208_Roles_of_flavonoids_in_Plants/links/5667098108ae8905db8b8b47/Roles-of-flavonoids-in-Plants.pdf)
  33. MANDAL, Santi M.; CHAKRABORTY, Dipjyoti; DEY, Satyahari. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, 2010, 5.4: 359-368. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 vasario 24 d.]. DOI: 10.4161/psb.5.4.10871. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.5.4.10871>
  34. TAVARINI, Silvia, et al. Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition, and antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63.31: 7041-7050. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 liepos 30 d.]. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02147. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b02147>
  35. YAHIA, Elhadi M. (ed.). *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health, 2 Volumes*. John Wiley & Sons, 2017. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 kovo 24 d.]. ISBN: 978-1-119-15794-6. DOI: 10.1002/9781119158042.
  36. ZEPKA, Leila Queiroz; JACOB-LOPES, Eduardo; ROCA, María. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 2019, 26: 94-100. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gruodžio 3 d.]. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.04.004. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799319300025>
  37. HASHIMOTO, Hideki; URAGAMI, Chiasa; COGDELL, Richard J. Carotenoids and photosynthesis. *Carotenoids in nature*, 2016, 111-139. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 balandžio 22 d.]. DOI: 10.1007/978-3-319-39126-7\_4. Prieiga per: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-39126-7\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-39126-7_4)
  38. ALEXIEVA, V., et al. Interaction between stresses. *Bulg. J. Plant Physiol*, 2003, 29.3-4: 1-17.
  39. VAHTMÄE, Ele, et al. Predicting macroalgal pigments (chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b, carotenoids) in various environmental conditions using high-resolution hyperspectral spectroradiometers. *International Journal of Remote Sensing*, 2018, 39.17: 5716-5738. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 lapkričio 10 d.]. DOI: 10.1080/01431161.2017.1399481. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01431161.2017.1399481>
  40. PLAZA, Merichel; TURNER, Charlotta. Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71: 39-54. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gruodžio 23 d.]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615001363>

41. KHANAL, Nityananda, et al. Differential mechanisms of photosynthetic acclimation to light and low temperature in *Arabidopsis* and the extremophile *Eutrema salsugineum*. *Plants*, 2017, 6.3: 32. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 birželio 6 d.]. DOI: 10.3390/plants6030032. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2223-7747/6/3/32>
42. ŠLAPAKAUSKAS, Vytautas, DUCHOVSKIS, Pavelas. Augalų produktyvumas. – Klaipėda: IDP Solutions, 2008. p. 253. ISBN: 9789955865049.
43. ACOSTA-MOTOS, José Ramón, et al. Antioxidant metabolism and chlorophyll fluorescence during the acclimatisation to ex vitro conditions of micropropagated *Stevia rebaudiana bertonii* plants. *Antioxidants*, 2019, 8.12: 615. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 lapkričio 13 d.]. DOI:10.3390/antiox8120615. Prieiga per: <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/12/615>
44. HAJIHASHEMI, Shokoofeh, et al. Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 1430. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 liepos 21 d.]. DOI: 10.3389/fpls.2018.01430. Prieiga per: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01430/full>
45. YU, Yinshan, et al. Fluorescence detection of paclobutrazol pesticide residues in apple juice. *Optik*, 2020, 224: 165542. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gruodžio 2 d.]. DOI: 10.1016/j.ijleo.2020.165542. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0030402620313784>
46. LI, Xinbao, et al. Solubility determination and thermodynamic modeling of paclobutrazol in nine organic solvents from T=(278.15 to 318.15) K and mixing properties of solutions. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2017, 104: 261-273. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 kovo 15 d.]. DOI: 10.1016/j.jct.2016.09.038. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002196141630297X>
47. LIANG, Zongsuo, et al. Effects of abscisic acid, gibberellin, ethylene and their interactions on production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza bunge* hairy roots. *PloS one*, 2013, 8.9: e72806. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 rugpjūčio 30 d.]. DOI: 10.1371/journal.pone.0072806. Prieiga per: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072806>
48. MORADI, S., et al. Paclobutrazol application enhances antioxidant enzyme activities in pomegranate plants affected by cold stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2017, 92.1: 65-71. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 balandžio 13 d.]. DOI: 10.1080/14620316.2016.1224605. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002196141630297X>
49. LIU, Zhenjiang, et al. Highly efficient detection of paclobutrazol in environmental water and soil samples by time-resolved fluoroimmunoassay. *Science of the Total Environment*, 2016, 569: 1629-1634. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 balandžio 12 d.]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.089. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969716312608>
50. SPONSEL, Valerie M. Gibberellins. 2003. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 gruodžio 1 d.]. DOI: 10.1210/en.2002-220852. Prieiga per: <https://academic.oup.com/endo/article/144/3/967/2502116>
51. DAVIES, Peter J. (ed.). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*. Springer Science & Business Media, 2004. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 birželio 15 d.]. ISBN 1-4020-2685-4.
52. CHEN, Jingbo, et al. Synthesis of gibberellin derivatives with anti-tumor bioactivities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2009, 19.18: 5496-5499. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 balandžio 3 d.]. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.07.090. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960894X09010245>

53. ZHANG, Jinqiang, et al. Gibberellin disturbs the balance of endogenesis hormones and inhibits adventitious root development of *Pseudostellaria heterophylla* through regulating gene expression related to hormone synthesis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28.1: 135-147. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 vasario 17 d.]. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.09.022. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20304290>
54. LI, Jigang, et al. Abscisic acid. *Hormone metabolism and signaling in plants*, 2017, 161-202. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 balandžio 30 d.]. DOI: 10.1016/B978-0-12-811562-6.00005-0. Prieiga per: [http://sklppb.cau.edu.cn/upload/editorfiles/2017.5.24\\_8.32.46\\_4988.pdf](http://sklppb.cau.edu.cn/upload/editorfiles/2017.5.24_8.32.46_4988.pdf)
55. WILKINSON, Sally; HARTUNG, Wolfram. Food production: reducing water consumption by manipulating long-distance chemical signalling in plants. *Journal of experimental botany*, 2009, 60.7: 1885-1891. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 rugpjūčio 23 d.]. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.04.006. Prieiga per: <https://academic.oup.com/jxb/article/60/7/1885/685700?login=true>
56. LI, Zheng, et al. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58.10: 6503-6509. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 kovo 15 d.]. DOI: 10.1021/jf1006962. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf1006962>
57. BURAN, Timothy J., et al. Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities, and phytochemical contents of southern high bush blueberries. *Food chemistry*, 2012, 132.3: 1375-1381. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 balandžio 4 d.]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.124. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814611017286>
58. LI, Zheng, et al. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58.10: 6503-6509. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 vasario 1 d.]. DOI: 10.1021/jf1006962. Prieiga per: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf1006962>
59. PEPPI, M. Cecilia; FIDELIBUS, Matthew W.; DOKOOZLIAN, Nick. Abscisic Acid Application Timing and Concentration Affect Firmness, Pigmentation, and Color of Flame Seedless' Grapes. *HortScience*, 2006, 41.6: 1440-1445. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 kovo 28 d.]. DOI: 10.21273/HORTSCI.41.6.1440. Prieiga per: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/41/6/article-p1440.xml>
60. JIANG, Mingyi; ZHANG, Jianhua. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42.11: 1265-1273. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 kovo 9 d.]. DOI: 10.1093/pcp/pce162. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11726712/>
61. HAN, Xiaoqiang, et al. Synthesis, resolution and biological evaluation of cyclopropyl analogs of abscisic acid. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2015, 23.18: 6210-6217. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 kovo 8 d.]. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.042. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968089615006264>
62. WENJIAN, Liu, et al. Synthesis, photostability and bioactivity of 2, 3-cyclopropanated abscisic acid. *Phytochemistry*, 2013, 96: 72-80. [interaktyvus]. [žiūrėta 2020 liepos 13 d.]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.09.029. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003194221300397X>

63. HANAK, Anne M., et al. Draft genome sequence of the growth-promoting endophyte *Paenibacillus* sp. P22, isolated from *Populus*. *Genome announcements*, 2014, 2.2. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 balandžio 26 d.]. DOI: 10.1128/genomeA.00276-14. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24723717/>
64. GRADY, Elliot Nicholas, et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial cell factories*, 2016, 15.1: 1-18. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 balandžio 8 d.]. DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-016-0603-7>
65. LORENTZ, R. H., et al. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. *Letters in applied microbiology*, 2006, 43.5: 541-547. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 kovo 21 d.]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01995.x. Prieiga per: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2006.01995.x>
66. Vaizdinė priemonė: Prof. Eshel Ben-Jacob.
67. INGHAM, Colin J.; JACOB, Eshel Ben. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC microbiology*, 2008, 8.1: 1-16. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 5 d.]. DOI: 10.1186/1471-2180-8-36. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-8-36>
68. DUDONNE, Stephanie, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, 57.5: 1768-1774. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 21 d.]. DOI: 10.1021/jf803011r. Prieiga per: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19199445/>
69. SLINKARD, Karen; SINGLETON, Vernon L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 1977, 28.1: 49-55. [žiūrėta 2021 gegužės 1 d.].
70. DRÓZDŹ, Paulina; PYRZYNSKA, Krystyna. Extracts from pine and oak barks: phenolics, minerals and antioxidant potential. *International journal of environmental analytical chemistry*, 2021, 101.4: 464-472. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 18 d.]. DOI: 10.1080/03067319.2019.1668381. Prieiga per: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03067319.2019.1668381>
71. RAGAEI, Sanaa; ABDEL-AAL, El-Sayed M.; NOAMAN, Maher. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food chemistry*, 2006, 98.1: 32-38. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.039. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814605004632>
72. WETTSTEIN, D. Formula of chlorophyll determination. *Exp. Cell Res*, 1957, 12.3: 427-489. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 5 d.]. DOI: 10.1016/0014-4827(57)90165-9.
73. HOSSAIN, M. Amzad, et al. Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian J. Tradit. Med*, 2010, 5.2: 56-61. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 19 d.]. Prieiga per: [https://www.researchgate.net/publication/224003681\\_Chemical\\_composition\\_of\\_the\\_essential\\_oils\\_of\\_Stevia\\_Rebaudiana\\_Bertoni\\_leaves](https://www.researchgate.net/publication/224003681_Chemical_composition_of_the_essential_oils_of_Stevia_Rebaudiana_Bertoni_leaves)
74. BIMAKR, Mandana, et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing*, 2011, 89.1: 67-72. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 19 d.]. DOI:

- 10.1016/j.fbp.2010.03.002. Prieiga per:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308510000325?via%3Dihub>
75. YODA, Simone K., et al. Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>+ water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Engineering*, 2003, 57.2: 125-134. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 21 d.]. DOI: 10.1016/S0260-8774(02)00281-9. Prieiga per:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877402002819>
76. PIECZYKOLAN, Aleksandra, et al. Effects of Supercritical Carbon Dioxide Extraction (SC-CO<sub>2</sub>) on the content of tiliroside in the extracts from *Tilia L.* flowers. *Open Chemistry*, 2019, 17.1: 302-312. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 23 d.]. DOI: 10.1515/chem-2019-0040. Prieiga per: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/chem-2019-0040/html>
77. AMINIAN, Ali; ZARENEZHAD, Bahman. A generalized neural network model for the VLE of supercritical carbon dioxide fluid extraction of fatty oils. *Fuel*, 2020, 282: 118823. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 21 d.]. DOI: 10.1016/j.fuel.2020.118823. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236120318196>
78. BERGS, Dominik, et al. Preparative purification of rebaudioside A from aqueous extracts using chromatography: a process idea. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2012, 7.4: 295-303. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 21 d.]. DOI: 10.1007/s00003-012-0784-x. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00003-012-0784-x>
79. FORMIGONI, M., et al. *Stevia rebaudiana* leaves pretreated with ethanol and characterization of the ethanolic extract by UPLC-HRMS. *Food Chemistry*, 2018, 241: 452-459. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 19 d.]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.022. Prieiga per: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617314826>
80. VÁZQUEZ, Luis; AKOH, Casimir C. Concentration of stearidonic acid in free fatty acid and fatty acid ethyl ester forms from modified soybean oil by winterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, 88.11: 1775-1785. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 28 d.]. DOI: 10.1007/s11746-011-1857-1. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11746-011-1857-1>
81. ORTIZ-VIEDMA, Jaime, et al. Antioxidant and antimicrobial effects of *Stevia rebaudiana* Bert.) extracts during preservation of refrigerated salmon paste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017, 119.10: 1600467. [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 gegužės 23 d.]. DOI: doi.org/10.1002/ejlt.201600467. Prieiga per: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201600467>