



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Farmacija

Biomedicinos mokslų instituto Farmacijos ir farmakologijos centras

Ardanas Kozyro 5 kursas 2 grupė

VIENTISŲJŲ STUDIJŲ MAGISTRO
BAIGIAMASIS DARBAS

A. auricula-judae bioaktyvumo tyrimai

A. auricula-judae Biological Activity Assays

Darbo vadovas

dr. Asta Judžentienė

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovė

doc. dr. Kristina
Garuolienė

Vilnius, 2026

Studento elektroninio pašto adresas: ardanas.kozyro@mf.stud.vu.lt

TURINYS

SANTRAUKA.....	4
SUMMARY	6
PADĖKA	8
SANTRUMPOS	9
ĮVADAS.....	10
TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	11
1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA.....	12
1.1. Auriculariales – ausiagrybiečiai.....	12
1.2. Paprastasis ausiagrybis (<i>Auricularia auricula-judae</i> (Bull.) Quél).....	12
1.2.1. Taksonomijos ir nomenklatūros problemos	13
1.3. Etnofarmakologija ir istorinis naudojimas	14
1.4. Cheminė sudėtis.....	15
1.5. Oksidacinis stresas ir antioksidantai	16
1.6. Fenoliniai junginiai <i>Auricularia</i> vaisiakūniuose ir jų antioksidacinis aktyvumas	16
1.7. Polisacharidai.....	18
1.8. Nelakieji junginiai (ESCh/DMD/TOF).....	19
2.1. Tyrimo objektas.....	21
2.2. Naudoti prietaisai bei reagentai	21
2.3. Metodai.....	23
2.3.1. Žaliavos paruošimas tyrimams	23
2.3.2. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai:.....	23
2.3.3. Dujų chromatografija / masių spektrometrija	27
2.3.4. Efektyvioji skysčių chromatografija/ masių spektrometrija.....	30
2.3.5. Toksiškumo įvertinimas <i>A. auricularia</i> ekstraktui	31
2.4. Statistinė duomenų analizė	31
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	32
3.1. Paprastojo ausiagrybio ekstraktų lakiųjų junginių nustatymas.....	32
3.1.1. Lakiųjų junginių nustatymas vandens: dichlormetano: metanolio ekstrakto	32
3.1.2. Pentano ekstrakto lakiųjų junginių nustatymas	33
3.1.3. Lakiųjų junginių nustatymas kietafazės mikroekstrakcijos metodu (SPME)	34
3.2. Nelakiųjų junginių nustatymas ESCh/MS/DMD/ToF metodu	35
3.3. Antioksidacinis aktyvumas.....	37
3.3.1. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu panaudojant Folin-Ciocalteu reagentą.....	37
3.3.2. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas spektrofotometrinio metodu, panaudojant DPPH ⁺ (2,2-difenil-1-pikrihidrazilo radikalas)	38

3.3.3. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas spektrofotometriniu metodu panaudojant ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sufon rūgšties radikalas).....	39
3.4. Toksiškumo įvertinimas <i>A .auricula- judae</i> ekstraktams.....	40
4. IŠVADOS	41
Literatūros sąrašas	42
Priedai.....	48

SANTRAUKA

Ardano Kozyro magistro baigiamasis darbas: *Auricularia auricula-judae* biologinio aktyvumo tyrimai.

Tyrimo tikslas: Įvertinti *Auricularia auricula-judae* vaisiakūnių ekstraktų farmakologinį aktyvumą.

Tyrimo uždaviniai:

- 1) Įvertinti bendrą fenolinių junginių kiekį bei antioksidacinį aktyvumą Paprastojo ausiagrybio vaisiakūniuose;
- 2) Nustatyti ausiagrybio vaisiakūniuose kaupiamus nelakius junginius naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą;
- 3) Identifikuoti ausiagrybio vaisiakūniuose kaupiamus lakius junginius, naudojant dujų chromatografijos metodą;
- 4) Įvertinti ekstraktų toksiškumą, testams naudojant *Artemia sera* lervas.

Tyrimo metodika:

Paprastojo ausiagrybio žaliava buvo surinkta, išdžiovinta bei susmulkinta. Bioaktyvios medžiagos išskirtos paruošus ekstraktus su skirtingo poliškumo tirpikliais: vandeniu, metanolio, dichlormetanu ir heksanu. Fenolinių junginių kiekis nustatytas Folin-Ciocalteu kolorimetriniu metodu, išreiškus mg GRE/g (galo rūgšties ekvivalentu) sausoje žaliavoje. Antioksidacinis aktyvumas įvertintas spektrofotometriniais DPPH ir ABTS radikalų surišimo metodais, išreiškus $\mu\text{M TE/g}$ (Troloxo ekvivalentu) sausos žaliavos. Lakiosios medžiagos analizuotos pritaikius DCh/MS, o nelakiosios - ESCh/DMD/TOF metodus. Ekstrakto toksiškumas ištirtas naudojant *Artemia sera* lervas.

Duomenys apdoroti naudojant „Rcmdr“ ir „MS Excel“ programas, reikšmingais laikant kai $p < 0.05$

Tyrimo rezultatai ir išvados:

Fenolinių junginių kiekis buvo didžiausias vandeniniame ekstrakte ($3,23 \pm 0,18$ mg GRE /g SM), ir mažėjant vandens daliai, reikšmės taip pat mažėjo ($1,78 \pm 0,04$ ir $0,92 \pm 0,12$ mg GRE /g SM).

Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vandeniu ekstrahuotas ir 1:1 80% H₂O:MeOH mišiniu atskiestas bei perfiltruotas ausiagrybio ekstraktas - $4,72 \pm 0,2$ ir $9,39 \pm 0,67$ $\mu\text{M TE/ g SM}$. Toliau sekė, vandeninis $2,09 \pm 0,5$ μM ir $6,84 \mu\text{M} \pm 0,55$ TE/ g SM, atitinkamai DPPH ir ABTS radikalų surišimo testuose. Panaši tendencija buvo stebima ir nusodinus ekstraktus centrifuguojant. Nusodinto mėginio aktyvumas buvo ~ 40% didesnis. Tai sietina su įvairių balastinių medžiagų pašalinimu, dėl to radikalas tapo lengviau pasiekiamas veikliosioms medžiagoms. Aktyvumą

tikėtina nulemia ESCh/DMD/TOF metodu aptiktos vanilinė ir askorbo rūgštys, chlorogeninės rūgšties dariniai, flavonoidas 5,7-dihidroksichromonas bei melaninas. DCh/MS metodu aptikti riebalų rūgščių metilo esteriai, šakotas fenolinis junginys, seskviterpenas β -selinenas, bei ilgos grandinės alkanai. Kurie gali prisidėti prie antibakterinio, priešuždegiminio poveikių ar žarnyno veiklos reguliavimo. Visi aukščiau išvardinti bioaktyvūs poveikiai pasiekiami be ūmaus toksiškumo *Artemia sera* lervoms.

Raktažodžiai:

Paprastasis ausiagrybis (*Auricularia auricula-judae*); fenoliniai junginiai; antioksidacinis aktyvumas; dujų chromatografija su masių spektrometrija (DCh/MS); efektyvioji skysčių chromatografijos sistema su fotodiodine matricos detekcija ir skrydžio laiko masių spektrometru (ESCh/DMD/TOF); lakieji junginiai; nelakieji junginiai; toksiškumas *Artemia sera* krevetėms.

SUMMARY

Ardano Kozyro master's thesis: *Auricularia auricula-judae* biological activity assays.

Aim of study: To assess pharmacological activity of *Auricularia auricula-judae* fruitbody extracts.

Objectives of study:

- 1) To determine the total phenolic content of compounds and antioxidant activity of *Auricularia auricula-judae* fruitbody extracts;
- 2) To qualifiedly evaluate non-volatile compounds in wood ear fruitbody extracts using liquid chromatography method;
- 3) To identify volatile compounds in wood ear fruitbody extracts using gass chromatography method;
- 4) To reveal toxic activity of the extracts against *Artemia sera* larvae.

Methods:

Fruitbodies of wood ear was gathered, dried and pulverised. Bioactive compounds were extracted by using different polarity solvents: water, methanol, dichloromethane and hexane. Total phenolic compound was determined by using calorimetric Folin-Ciocalteu method, expressed in mg GAE/g (galic acid equivalents) of DW (dry weight). Radical scavenging activity was evaluated by using spectrophotometric DPPH• and ABTS•⁺ assays, expressed in $\mu\text{M TE/g}$ (trolox equivalents) DW. Volatile compounds were identified using GS/MS, while phenolic constituents were tentatively identified by HPLC/DAD/TOF. Toxicity of *A. auricula* extract were evaluated using *Artemia sera* nauplius as a model animal.

Results and concusions:

Total phenolic content of compounds was found to be the highest in aqueous extract ($3,23 \pm 0,18$ mg GRE /g DW) and dwindled with decreasing ratio of water in a mixture ($1,78 \pm 0,04$ and $0,92 \pm 0,12$ mg/g DW). Antioxidant activity was highest in water extract diluted 1:1 with 80% H₂O:MeOH mixture and filtered through syringe ($4,72 \pm 0,2$ $\mu\text{M TE/ g}$ and $9,39 \pm 0,67$ $\mu\text{M TE/ g DW}$). Followed by unprocessed water extract $2,09 \pm 0,5$ μM and $6,84 \mu\text{M} \pm 0,55$ TE/ g DW for DPPH and ABTS radical scavenging assays, respectively. Similar tendency was observed by comparing precipitated and non-precipitated extracts, where the centrifuged one showed ~40% higher activity. This could be explained by elimination of radical shielding compounds from solution. Antioxidative activity could be linked to vanillic, ascorbic, chlorogenic acid derivatives, flavonoid 5,7-dihydroxychromone as well as melanin identified in HPLC/DAD/TOF. Fatty acids esters, sesquiterpene β -selinene, branched phenolic acid and long-chain alkanes identified by GC/MS could contribute to anti-inflammatory,

anti-bacterial activities and gut microbiota modulation. All bioactive activities listed above were achieved without any acute toxicity for *Artemia salina* nauplius.

Keywords: *Auricularia* spp.; *Auricularia auricula-judae*; polysaccharides; phenolic compounds; antioxidant activity; GC-MS; HPLC-DAD-TOF; volatile compounds; non-volatile compounds; *Artemia salina*.

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti darbo vadovei dr. Astai Judžentienei už visas konsultacijas, patarimus ir visokeriopą paramą viso tyrimo metu.

Už pagalbą bei naudingus praktinius patarimus – FTMC medžiagų analizės laboratorijos komandai: dr. Jurgai Būdienei, Konstantinui Brazinski, Viktorijai Rapalytei.

SANTRUMPOS

Spp.- rūšys (species);

TKM- Tradicinė kinų medicina;

ROS – Reactive oxygen species (reaktyvūs deguonies junginiai);

BFJK- bendras fenolinių junginių kiekis;

DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalų surišimo metodas;

ABTS- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninės rūgšties) radikalų surišimo metodas;

DCh/MS- dujų chromatografija/masių spektrometrija;

ESCh/DMD/TOF- efektyvioji skysčių chromatografija su fotodiodinės matricos detekcija ir skrydžio laiko masių spektrometru.

IVADAS

Grybai nuo seno laikomi natūraliu vaistinių medžiagų šaltiniu, o *Auricularia* genties grybai (pvz.; *A. auricula-judae*, *A. polytricha*, *A. heimuer*), tradiciškai vartojami Azijos šalyse ne tik kaip maisto produktas, bet ir kaip natūralus vaistas. Šie grybai plačiai auginami, pavyzdžiui, *A. heimuer* yra ketvirtoji pagal populiarumą pasaulyje kultivuojama grybų rūšis (1). Tuo tarpu kai *A. auricula-judae* bei *A. mesenterica* natūraliai auga ir Lietuvoje (2).

Auricularia spp. grybų ekstraktuose gausu biologiškai aktyvių junginių: polisacharidų, fenolių, sterolių, taninų ir kitų metabolitų (3,4). Jie pasižymi antimikrobinėmis, imunoreguliacinėmis, antioksidacinėmis ir netgi priešvėžinėmis savybėmis (5,6). Polisacharidai sudaro didžiąją dalį grybo sausosios masės (7). Tyrimų duomenimis, šie junginiai gali reguliuoti žarnyno mikroflorą, lėtinti senėjimo procesus ar mažinti kraujo lipidų kiekį (8). Ausiagrybio ekstraktai taip pat turi plačias pritaikymo galimybes pramonėje. Pavyzdžiui, *A. heimuer* hidrokoloidai pasižymi didele drėgmės sulaikymo talpa (panašia į aukštos molekulinės masės hialurono rūgštis), todėl gali būti naudojami kaip natūralūs drėkintuvai įvairiuose gaminiuose (9). Tokios savybės leidžia manyti, kad šių grybų junginius galima panaudoti ne tik kaip maisto papildus, bet ir kaip medžiagas vaistų ar kosmetikos priemonių kūrime (10).

Siekiant įvertinti *Auricularia* ekstraktų cheminę sudėtį ir biologinį aktyvumą, tyrime numatytas bendro fenolinių junginių kiekio (BFJK) nustatymas bei DPPH ir ABTS radikalų surišimo tyrimai. Cheminių junginių profiliui išaiškinti bus panaudoti DCh/MS ir ESCh/DMD/TOF metodai. Pastarasis leis charakterizuoti nelakius poliarizuotus junginius (pvz.: fenolius, pigmentus, polisacharidų dekstranus). DCh/MS padės identifikuoti ekstrakte esančias lakias, mažesnės molekulinės masės medžiagas (pvz.: riebalų rūgštys, terpenai). Galiausiai, ekstraktų saugumo įvertinimui bus atliktas *Artemia sera* lervų mirtingumo testas. Tai paprasta ir jautri procedūra bendram toksiškumui nustatyti (11). Tokiu būdu pasirinkti metodai leis ištirti *Auricularia auricula-judae* ekstraktų chemines bei biologines savybes.

TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tyrimo tikslas: Įvertinti *Auricularia auricula-judae* vaisiakūnių ekstraktų farmakologinį aktyvumą.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti bendrą fenolinių junginių kiekį bei antioksidacinį aktyvumą Paprastojo ausiagrybio vaisiakūniuose;
2. Nustatyti ausiagrybio vaisiakūniuose kaupiamus nelakius junginius naudojant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą;
3. Identifikuoti ausiagrybio vaisiakūniuose kaupiamus lakius junginius, naudojant dujų chromatografijos metodą;
4. Įvertinti ekstraktų toksiškumą, testams naudojant *Artemia sera* lervas.

1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA

1.1. Auriculariales – ausiagrybiečiai

Vaisiakūniai vienmečiai, vidutinio dydžio, ausies, susiraukšlėjusio gumbo arba netaisyklingos lėkštelės formos. Bekočiai, drebučių konsistencijos. Sausros metu jie susitraukia ir sukietėja, tačiau esant pakankamai drėgmės, vėl padidėja ir suminkštėja. Vaisiakūnių paviršius gali būti lygus, pūkuotas, rievėtas. Pasižymi įvairia spalvine įvairove. Papėdsporės formuojasi ant septuotų keturląsčių papėdžių (fragmobazidžių), kurios kartu su steriliomis hifų išaugomis (plaukeliais) sudaro himenį. Nelytiškai dauginasi konidijomis, kurios padeda grybui plisti. Dauguma šios eilės grybų yra saprotrofai. Įprastai auga ant negyvos medienos, tačiau yra ir parazitinių grybų rūšių. Dalis grybų valgomi (12).

1.2. Paprastasis ausiagrybis (*Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél)

Paprastasis ausiagrybis (*Auricularia auricula-judae*) priskiriamas papėdgrybių (*Basidiomycota*) skyriui, ausiagrybinių (*Auriculariaceae*) šeimai (13). Jo vaisiakūniai yra ausies kaušelio formos, 3–10 cm skersmens bei 0,2–0,5 cm storio. Prie substrato dažniausiai prisitvirtina lateraliai, kartais per labai plona kotą. Vaisiakūniai yra drebučių konsistencijos, elastingi. Sausros metu jie smarkiai susitraukia, tačiau, gavę drėgmės vėl padidėja. Įprastai būna alyvuogiškai rudos, rečiau pilkšvai violetinės spalvos. Išorinis (viršutinis) paviršius padengtas minkštais, rausvo atspalvio plaukeliais. Vidinis (apatinis) paviršius tamsesnis, pilkšvai rudo atspalvio, išsilankstęs arba banguotas. Jame išsidėstęs lygusis himenoforas, dengiantis vaisiakūnio paviršių. Trama plona ir bespalvė. Jaunesnių vaisiakūnių - tampri ir minkšta, tačiau, su amžiumi sausėja, kietėja. Papėdsporės cilindriškos ir lenktos, bespalvės, jų matmenys $16\text{--}18 \times 6\text{--}8 \mu\text{m}$ dydžio (12,14,15).



pav. 1 Paprastasis ausiagrybis (*Auricularia auricula-judae*)

Tai ksilotrofinis grybas, auga dažnai netvarkingomis grupėmis ant negyvų, o kartais ir gyvų medžių ir krūmų šakų. Dažniausiai šešėlingose, drėgnose miško pakraščiuose, paupiuose ar krūmynuose (12,16). Kaip substratą grybas įprastai renkasi: uosius, klevus, ąžuolus ir ypač dažnai juodąjį

šeivamedį. Auga ištisus metus. Dažniausiai aptinkamas nuo vėlyvo rudens iki ankstyvo pavasario. Ypač šiltomis, drėgnomis dienomis, kai temperatūra viršija 0 °C. „GBIF“ platformos duomenimis, tai dažnas grybas šiaurės vakarų Europoje, retesnis- rytinėje dalyje (17).

1.2.1. Taksonomijos ir nomenklatūros problemos

Ilgą laiką mokslinėje literatūroje buvo manyta, kad *Auricularia auricula-judae* yra viena rūšis, kuri paplitusi visame pasaulyje. Wu ir kt. atlikto filogenetinio ir morfologinio tyrimo metu buvo nustatyta, kad *A. auricula-judae* yra paplitęs tik Europoje. Pagrindinis nesusipratimas kyla, dėl komerciškai auginamų grybų Kinijoje, kuri yra didžiausia šių grybų augintoja pasaulyje. Kultivuojama rūšis genetiškai skiriasi nuo europinio ausiagrybio. 2014 m. ji buvo išskirta ir aprašyta kaip atskira rūšis *Auricularia heimuer*. Azijinės rūšies vaisiakūniai dažniausiai tamsesni- tamsiai rudi, o džiūvant tampa beveik juodi. Iš čia ir pavadinimas „Juodasis medžio grybas“ (išvertus paraidžiui iš kinų kalbos). Tuo tarpu kai, *A.-auricula-judae* įprastai šviesesni, rausvai rudo ar alyvuogių atspalvio, kartais su violetiniu atspalviu. Skirtumai matomi ir skerspjūvyje: *A. heimuer* beveik visuomet stebima medula (tai centrinė, tankiai susipynusių hifų juosta, einanti per vaisiakūnio vidurį, dar kitaip vadinama grybo šerdimi). Toks morfologinis ypatumas grybui suteikia tvirtesnę bei kietesnę tekstūrą. Europinė rūšis medulos neturi, arba ji labai neryški. Šio grybo hifai išsidėstę tolygiau, todėl *A. auricula-judae* pasižymi minkštesne, labiau drebutine konsistencija, lyginant su *A. heimuer*. Skirtumai stebimi ir mikroskopuojant: europinės rūšies sporos didesnės ir ilgesnės, o bazidės stambesnės, lyginant su Azijoje augančiu (18,19). Toks taksonominis *Auricularia* genties patikslinimas nėra tik formalus botaninis pavadinimas. Jis turi esminę reikšmę vertinant farmakologinį aktyvumą ir lyginant tyrimų rezultatus. Taip yra todėl, kad didžioji dalis per paskutinius 20 metų publikuotų mokslinių straipsnių apie *A. auricula* įvairius bioaktyvumus yra atlikti Kinijoje. O tyrimuose buvo naudotos vietinės kultivuojamos ar surinktos gamtoje rūšys. Remiantis naujausiais filogenetiniais duomenimis, šiuose tyrimuose objektas tikėtina, kad buvo *A. heimuer*, nors autoriai jį galėjo klaidingai įvardinti kaip *A. auricula-judae*. Tai sukuria šiokią tokią mokslinę spragą: tikrojo, Europoje paplitusio *A. auricula-judae* cheminė sudėtis ir biologinis aktyvumas yra ištirti tik fragmentiškai. Skirtingos, nors ir giminingos grybų rūšys, augdamos skirtingose klimato zonose ir ant skirtingų substratų, gali sukaupti nevienodą bioaktyvių junginių kiekį ar net skirtingus jų profilius. Pavyzdžiui, *A. heimuer* vaisiakūniai yra tamsesni už Europinės rūšies, o tai gali indikuoti didesnę melanino, pasižymintį antioksidaciniu poveikiu, kiekį. Galima daryti išvadą, kad šviesesnė Europinė rūšis galimai gali turėti ir kitokį fenolinių junginių profilį, negu aprašoma literatūroje. Atsižvelgiant į anksčiau minėtus taksonominius aspektus, tikslus *A. auricula-judae* cheminės sudėties ir biologinio aktyvumo vertinimas yra aktualus moksliniu požiūriu. Europinės kilmės pavyzdžių analizė leistų atskirti, šios rūšies savybes nuo Azijos regione

dominuojančios *A. heimuer*. Tai leistų nustatyti, ar Europinės kilmės grybai savo fitocheminiu profiliu ir aktyvumu prilygsta, plačiai naudojamiems Azijiniams analogams.

1.3. Etnofarmakologija ir istorinis naudojimas

Auricularia genties grybai yra vieni seniausių žmonijos kultivuojamų grybų, kurių reikšmė bėgant amžiams tik augo. Jie Kinijoje kultivuojami jau daugiau nei 2 tūkstančius metų. Pirmieji bandymai datuojami, tarp 600-300 pr. Kr., kai ant rąstų rastų grybų sporos buvo platinamos „kaištelių“ metodu. Rūšis nebuvo izoliuojama, rąstai ant kurių rasti grybai, būdavo surenkami ir padarius iš jų kaištelių, įjungiami į kitus panašius rąstus. Tai pats primityviausias kultivavimo lauko sąlygomis metodas (20). Šiandien šių grybų kultivavimo mastas yra milžiniškas- nuo 1978 m. įvairių funkcinių grybų auginimo mastas padidėjo daugiau, kaip 40 kartų. (nuo 1mln tonų iki ~ 45mln. t), *Auricularia* gentis užima vieną iš lyderiaujančių pozicijų (21,22). Kinija, būdama pagrindine eksportuotoja, užaugina apie 84% visų pasaulio kultivuotų grybų. Vien *A. heimuer* ir *A. cornea*. 2023 m. buvo kultivuotos daugiau nei 10 mln. tonų (22). Toks masinis vartojimas nėra atsitiktinis, jis glaudžiai susijęs su giliomis etnofarmakologinėmis tradicijomis. Rytų Azijos regione ausiagrybiai yra neatsiejama tradicinės medicinos dalis jau daugiau kaip 2000 metų. Senoviniuose traktatuose, tokiuose kaip „Shennong Bencao Jing“, šie grybai priskiriami „kraują gaivinančių“ ir „stazę šalinančių“ priemonių grupei. Todėl TKM jie plačiai vartojami kraujotakai gerinti, siekiant sumažinti kraujo klampumą ir tokiu būdu apsisaugoti nuo trombozų susidarymo (23). Toks poveikis buvo patvirtintas ir šiuolaikiniais tyrimais. 2003 m. atliktas tyrimas įrodė antikoaguliacinį bei trombocitų agregaciją slopinantį poveikį, panašų į aspirino (24). Paskutiniaisiais dešimtmečiais susidomėjimas grybais yra dar ženkliau išaugęs. Vykdomi tūkstančiai tyrimų, kurių metu atrasta daugybė gydomųjų savybių, tokių kaip antioksidacinės, priešvėžinės, antibiotinės, priešdiabetinės ir t.t.. (25). Tuo tarpu, XVII amžiaus Vakarų Europos herbalistai kvestionavo jo, valgomumą bei pritaikymą medicinoje (26). Tuo metu *A. auricula-judae* vartojimas istoriškai buvo grindžiamas „Panašumo Doktrina“. Vokiečių filosofas Jakobas Biomė savo darbe „Signatura Rerum“ teigė, kad organizmo išvaizda nurodo jo gydomąją paskirtį (27). Dėl panašumo į žmogaus ausį, gerklės klostes bei akies sandarą, šio grybo preparatai buvo naudojami: ausų, gerklės ir akių ligų gydyme (28). 1601 m. prancūzų kilmės mikologijos pradininkas Šarlis de Lekliūzas savo darbe „Rariorum Plantarum Historia“ rašė apie „Judo ausies“ grybo panaudojimą skaudančios gerklės gydymui (29). Po kelių dešimtmečių anglų botanikas Džonas Parkinsonas savo veikale „Theatrum Botanicum“ aprašė specifinius receptus, kur ausiagrybiai buvo verdami piene ar mirkomi acte, o gautas preparatas naudotas gerklės skausmui malšinti(30). „Judo ausies“ pavadinimas kilo iš folkloro, biblinės legendos apie Judą Iskariją, kuris tikima, jog pasikorė ant juodojo šeivamedžio, ant kurio dažniausiai ir auga šie grybai (31).

Lyginant istorinį vartojimą su moderniais tyrimais, matyti, aiškos paralelės. TKM naudotas „kraujo

valymas“ dabar tiriamas kaip antitrombinis aktyvumas. Tuo tarpu kai, Europos liaudies medicinoje taikytas gerklės skalavimas gali būti siejamas, su šių grybų priešuždegiminėmis savybėmis bei gleivinių raminiu.

1.4. Cheminė sudėtis

Šiuolaikiniai *Auricularia* genties grybų tyrimai rodo, kad tradiciškai pastebėtas poveikis kraujotakai, uždegimui ir medžiagų apykaitai glaudžiai susijęs su jų kompleksiška chemine sudėtimi. Sausų vaisiakūnių 100 g energetinė vertė siekia apie 327,7 Kcal (32), o sudėtis pasižymi dideliu polisacharidų bei skaidulų kiekiu, reikšmingu baltymų, fenolinių junginių, nukleozidų ir mineralinių medžiagų kiekiu, o riebalų kiekis paprastai išlieka nedidelis (0,48-4,5%) (6,32). Vertinant sausąją masę, *A. auricula-judae* vaisiakūniai yra turtingas kompleksinių angliavandenių šaltinis. Didžiąją dalį sudaro įvairūs polisacharidai (β -gliukanai ir heteropolisacharidai), chitinas, ir urono rūgštys. Jie kartu sudaro struktūrines ląstelių sienelės ir tirpių skaidulų frakcijas, bendrai sudarančias apie 66% sausos masės. Baltymų kiekis sausose vaisiakūniuose paprastai siekia apie 8-16%. Juose aptinkama nemaža dalis nepakeičiamųjų amino rūgščių, taip pat reikšmingas alanino, glicino, prolino, serino ir glutamo rūgšties kiekis, prisidedantis prie būdingo umami skonio (32,33). Remiantis Kadnikova ir kt. atlikta *A. auricula-judae* sudėties analize, šio grybo vaisiakūniai sukaupia palyginti didelius kiekius mikroelementų, tokių kaip: kalcis, kalis, magnis, o ypač geležis ir cinkas. Geležies koncentracija (200mg/100g) yra panaši į didesnės mineralizacijos rūšis, tokias kaip *Lactarius volemus* ar *Cantharellus cibarius*. Cinko kiekis (60mg/100g) artimas rūšims, pasižyminčioms didesniu Zn kiekiu (*Hydnum repandum*, *Lycoperdon perlatum*, *Sarcodon imbricatus*). Todėl *A. auricula-judae* gali būti laikomas geru mitybiškai prieinamos geležies ir cinko šaltiniu (32). Gąsekos ir kt. darbe, taip pat parodyta, kad Europinės kilmės *Auricularia* vaisiakūniai išsiskiria reikšmingu mineralų kiekiu ir aukštu antioksidaciniu aktyvumu lyginant su kitomis tirtomis rūšimis (34). Tai rodo, kad tiek Azijoje, tiek Europoje auganti *Auricularia* grupė pasižymi aukšta mikroelementų ir bioaktyvių medžiagų koncentracija, nors tikslios vertės gali skirtis dėl rūšinių ar fitocheminių skirtumų.

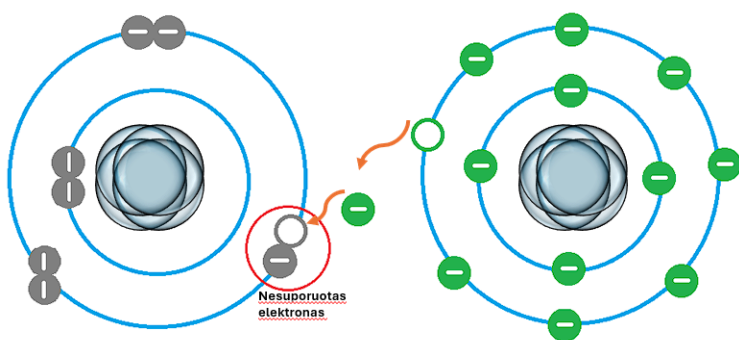
Be minėtų makromolekulių ir mineralinių medžiagų *Auricularia* genties grybai pasižymi ir turtingu mažamolekulinių junginių profiliu. Ausiagrybio vaisiakūnių ekstraktuose nustatytas reikšmingas fenolinių junginių ir flavonoidų kiekis. Identifikuotos kelios fenolio rūgštys ir flavonoidai, kurie siejami su dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Be fenolių, aprašomas ir ergosterolio, vitamino D₂ pirmtako, tam tikrų nukleozidų bei organinių rūgščių (obuolių, citrinų, fumaratų) kaupimasis. Kai kuriuose darbuose minimi riebalų rūgščių esteriai bei lakieji komponentai, prisidedantys prie aromato ar galimo antimikrobinio aktyvumo. Šie junginiai kartu su polisacharidais formuoja platų *Auricularia* bioaktyvių medžiagų spektrą, kurio atskiros grupės detaliau aptariamose vėlesniuose poskyriuose (34–36).

1.5. Oksidacinis stresas ir antioksidantai

Oksidacinis stresas apibrėžiamas, kaip viduląstelių redokso reakcijų pusiausvyros sutrikimas. Tai įvyksta, kai reaktyviųjų deguonies (ROS) ir azoto junginių, įskaitant laisvuosius radikalus, susidarymas viršija antioksidantų gynybinių sistemų pajėgumą. To pasekoje didėja baltymų, lipidų bei nukleorūgščių oksidacinės pažeidimo mastas. Laisvieji radikalai, šiuo atveju, suprantami kaip dalelės, turinčios nesuporuotą elektroną ir dėl to pasižyminčios dideliu reaktyvumu. Kuris gali inicijuoti grandininės oksidacinės reakcijos biologinėse sistemose. Tokia būseną siejama su ląstelių funkcijos disbalansu ar signalinių kelių modifikacijomis. Ilgainiui, tai gali prisidėti prie kardiovaskulinių, neurodegeneracinių, metabolinių ar onkologinių ligų vystymosi (37–39). Šiuos

Laisvasis radikalas

Antioksidantas



padarinius amortizuoja antioksidantinė organizmo sistema. Ji apima, fermentinius (pvz; superoksido dismutazę, katalazę, glutationo peroksidazę) ir nefermentinius mažamolekulinius antioksidantus, tokius kaip glutationas, šlapimo rūgštis, askorbo rūgštis ar tokoferoliai (žr. pav. 2).

pav. 2 Laisvųjų radikalų neutralizavimo antioksidantais mechanizmas

Šių endogeninių sistemų veiksmingumas glaudžiai susijęs su mityba, nes dietiniai antioksidantai gali papildyti ar moduluoti ląstelinę redokso pusiausvyrą, mažindami oksidacinę žalą. (40). Maistinės kilmės antioksidantai, ypač fenoliniai junginiai, laikomi vienu iš svarbiausių maistinių medžiagų grupių, mažinančių oksidacinį stresą ir su juo siejamą lėtinių ligų riziką. Tokie junginiai, pasižymi gebėjimu neutralizuoti ROS bei chelatuoti metalus (katalizuojančius oksidaciją). Fenoliai ir polifenoliai plačiai paplitę įvairiuose maisto produktuose. Jų įvairūs poveikiai organizmui skatina didėjančią susidomėjimą funkciniais maisto šaltiniais (41,42). Atsižvelgiant į tai, toliau nagrinėjami *Auricularia* vaisiakūnių fenoliniai junginiai ir jų indėlis į antioksidacinį aktyvumą.

1.6. Fenoliniai junginiai *Auricularia* vaisiakūniuose ir jų antioksidacinis aktyvumas

Fenoliniai junginiai yra viena pagrindinių *Auricularia* antioksidacinį aktyvumą nulemiančių frakcijų. Įvairiuose darbuose pabrėžiama, kad bendras fenolių ir flavonoidų kiekis grybuose dažnai siejasi su gebėjimu surišti radikalus. Todėl, tokie rodikliai kaip BFJK neretai koreliuoja su DPPH ir ABTS testų rezultatais. Gąsecka ir kt. atliko tyrimą, kuriame lygino dirvožemyje ir medienoje augančius valgomuosius grybus. Rezultatai parodė, kad antioksidaciniai parametrai gali būti statistiškai susiję su fenolinių ir flavonoidinių junginių gausa, kas leidžia šiuos junginius traktuoti, kaip svarbią antioksidacinio profilio sudedamąją dalį. Tame pačiame tyrime buvo nustatytas BFJK 4.24 ± 0.16

mg/g ekstrakto (atitinkamai 0.52 ± 0.03 mg/g sausos masės), o DPPH aktyvumas, išreikštas EC_{50} , siekė 4.60 ± 0.17 mg/mL(34). Ausiagrybio atveju, fenolinių junginių reikšmė ypač aktuali todėl, kad šie junginiai gali veikti keliais lygiagrečiais mechanizmais. Tiek tiesiogiai „gesinti“ laisvuosius radikalus, tiek prisidėti prie oksidacinių grandinių reakcijų slopinimo. Tai gerai atsispindi DPPH ir ABTS testuose *in vitro*. Kalbant apie kokybinę sudėtį, tyrimai rodo, kad ausiagrybio vaisiakūnių ekstraktuose dažniausiai identifikuojamos galo, protokatecho, p-hidroksibenzoinė ir kavos rūgštys (43). Europinės kilmės *A. auricula-judae* Gąsecka ir kt. papildomai identifikavo *trans*-cinamono, siringo, galo, homogentizinę ir gentizinę rūgštis, taip pat pirogalolį ir miricetiną. Be fenolinių rūgščių, ekstraktuose taip pat aptinkama ir flavonoidų, tokių kaip, kvercetas, rutinas, katechinai ir apigeninas. Nors pastarųjų koncentracija grybuose paprastai būna mažesnė nei augaluose, šie junginiai taip pat siejami su dideliu antioksidaciniu aktyvumu DPPH teste (34,43,44). Pastebėtina, kad toks junginių profilis priklauso nuo tiriamos *Auricularia* rūšies ir kilmės. Anksčiau minėtame darbe išskirtos specifinės rūgštys (pvz., siringo, homogentizinė), rečiau minimos bendros Azijos regiono (*A. heimuer*) apžvalgose. Toks variabilumas patvirtina poreikį atskirai tirti europinės *Auricularia* populiacijas. Siekiant apibendrinti literatūroje dažniausiai minimus fenolinius junginius, *1 lentelėje* pateikiami pagrindiniai fenolinių rūgščių ir flavonoidų pavyzdžiai.

Lentelė 1 Literatūroje identifikuoti *Auricularia* spp. vaisiakūnių bioaktyvūs fenoliniai junginiai.

Junginių klasė	Identifikuoti junginiai
Fenolinės rūgštys	Galo rūgštis (34,35); Protokatecho rūgštis (35); <i>p</i> -Hidroksibenzono rūgštis (35); Kavos rūgštis (34,35); Chlorogeninė rūgštis (35); Siringo rūgštis (34); <i>trans</i> -Cinamono rūgštis (34); Gentizinė rūgštis (34); Homogentizinė rūgštis (34).
Flavonoidai	Kvercetas (34,35); Rutinas (34,35); Katechinas / Epikatechinas(34,35).

Be to, be mažamolekulinių fenolinių junginių, *Auricularia* vaisiakūniuose aptinkamas ir melaninas - polifenolinės kilmės pigmentas. Nors dauguma duomenų apie jo kiekį ir savybes gauti tiriant tamsesnės pigmentacijos *A. heimuer* rūšį, literatūroje nurodoma, kad melaninas pasižymi reikšmingu antioksidaciniu ir radioprotekcinio aktyvumu (45). Vertinant bendrą ekstraktų aktyvumą, negalima atmesti šio pigmento indėlio, net jeigu *A. auricula-judae* rūšyje jis mažiau ištirtas. Apibendrinant,

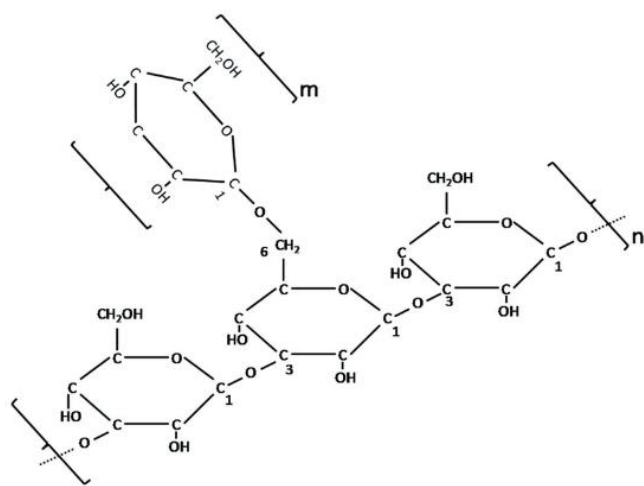
fenoliniai junginiai ir pigmentai sudaro svarbią antioksidacinio aktyvumo dalį, kas gali paaiškinti BFJK bei radikalų surišimo testų rezultatus.

1.7. Polisacharidai

Polisacharidai, tai natūralių polimerų tipas, sudarytas iš ilgų monosacharidų grandinių sujungtų glikozidinėmis jungtimis. Šie junginiai atlieka svarbų vaidmenį gyvų organizmų struktūros palaikyme bei energijos kaupime. Grybų vaisiakūniuose jie aptinkami, kaip struktūriniai ląstelės sienelės elementai (pvz.; chitinas, įvairūs gliukanai), ir kaip tirpios skaidulų frakcijos heteropolisacharidai. Todėl cheminiu požiūriu ši junginių grupė aprašoma pagal monosacharidų sudėtį, urono rūgščių kiekį, glikozidinių jungčių tipą, šakotumą ar molekulinę masę (46).

Polisacharidai yra viena svarbiausių *Auricularia* genties grybų bioaktyviųjų frakcijų. Jie sudaro nemažą sausosios vaisiakūnių masės dalį ir gali nulemti tiek maistinę vertę, tiek farmakologines savybes. Remiantis literatūros duomenimis, ausiagrybių vaisiakūniuose polisacharidai ir skaidulos gali sudaryti iki 60-70% sausosios masės, todėl ši frakcija laikoma vienu iš pagrindinių bioaktyvumo šaltinių (3).

Struktūriniu požiūriu, *Auricularia* vasisiakūnių polisacharidai yra heterogeniška grupė, apimanti tiek neutralius, tiek rūgštinius polisacharidus. Daugelyje darbų kaip pagrindinė frakcija aprašomi β -



pav. 3 Grybų β -gliukano cheminės struktūros pavyzdys (β -(1 $\rightarrow$ 3)-pagrindinė grandinė su β -(1 $\rightarrow$ 6)-atšaka)

gliukanai, pavaizduoti pav.3. (7,47). Be gliukanų, vaisiakūnių ekstraktuose aptinkami ir įvairūs heteropolisacharidai, sudaryti kelių monosacharidų tipų. Dažniausiai gliukozės, galaktozės, manozės bei urono rūgščių (3). Tokie junginiai gali sudaryti tirpią skaidulų frakciją, veikiančią kaip prebiotikas, kuris fermentuojamas žarnyno bakterijų skatina, jų augimą bei bioaktyvių metabolitų susidarymą (35). Pagal krūvį ir sudėtį ausiagrybio polisacharidai dažnai skirstomi į

neutraliuosius ir rūgštinius. Neutraliuose polisachariduose vyrauja heksozės, o rūgštiniuose urono rūgštys. Tai lemia geresnę saveiką su baltymais, metalų jonais ar receptoriais. Kai kuriuose darbuose taip pat aprašyti cheminiu būdu modifikuoti ausiagrybio polisacharidų dariniai, pavyzdžiui karboksimetilinti ar sulfatuoti. Padidėjęs neigiamas krūvis ar pakitęs tokių darinių tirpumas gali sustiprinti biologinį poveikį (48,49). Taip pat, nemažai dėmesio skiriama ir *Auricularia* polisacharidų makromolekulinei struktūrai: grandinės konformacijai, šakotumo laipsniui ar molekulinės masės pasiskirstymui. Tyrimai rodo, kad dalis ausiagrybio gliukanų vandeniniuose tirpaluose gali sudaryti

trimates „sisisukusios spiralės“ matricas, kurios lemia didelį klampumą ir gebėjimą surišti vandenį (9). Tokios savybės gali apsunkinti kai kurių tyrimų sąlygas, dėl didelio ekranavimo efekto ar sudėtingo mėginio apdorojimo instrumentinei analizei. Tačiau, kita vertus, polisacharidai siejami įvairiais biologinio aktyvumo aspektais. Literatūroje aprašytas antioksidacinis, hipolipideminis, antidiabetinis ar net antinavikinis poveikis (3).

Lakieji junginiai (DCh/MS)

Lakieji organiniai junginiai yra svarbi grybų cheminės sudėties dalis. Jie nulemia organoleptines savybes bei gali pasižymėti biologiniu aktyvumu. Nors *Auricularia* genties grybai apibūdinami, kaip švelnaus, nedominuojančio kvapo, jų lakioji frakcija yra gana sudėtinga. Ji apima įvairių klasių junginius, tokius kaip: alkoholiai, aldehydai, ketonai, riebalų rūgštys (RR) bei jų esteriai, o taip pat terpenai ir angliavandeniliai. Viena svarbiausių lakiųjų junginių grupių, būdingų daugeliui papėdgrybių, yra 8 anglies atomų (C8) dariniai, susidarantys linolo rūgšties oksidacijos metu. Pagrindinis šio grupės atstovas - 1-okten-3-olis, suteikia specifinį žemės, pelėsių ar grybų aromatą (50,51). Kartu su juo ausiagrybio vaisiakūniuose randami ir kiti kvapnūs dariniai, tokie kaip heksanalis, nonalis, benzaldehidas bei įvairūs ketonai. Šių junginių santykis gali reikšmingai skirtis priklausomai nuo grybo rūšies, kilmės bei apdorojimo būdo, todėl lakiųjų junginių analizė dažnai naudojama, kaip „piršto antspaudas“ žaliavos autentifikavimui (52). DCh/MS analize dažnai identifikuojamos ir įvairios riebalų rūgštys bei jų esteriai, kurie, kad ir mažiau lakūs, tačiau patenka į chromatografuojamą profilį. Literatūros duomenimis, ausiagrybio vaisiakūniuose dominuoja polinesočiosios riebalų rūgštys, ypač, linolo rūgštis (C18:2), oleino rūgštis (C18:1), taip pat sočiosios palmitino (C16:0) bei stearino (C18:0) rūgštys (9,53). Be to, kai kurie RR esteriai (etil linoleatas) ar lakieji terpenoidai pasižymi antimikrobiniu bei antioksidaciniu poveikiu, todėl jų nustatymas svarbus vertinant bendrą ekstrakto funkcinį potencialą.

1.8. Nelakieji junginiai (ESCh/DMD/TOF)

Nelakieji junginiai grybuose apima plačią bioaktyvių metabolitų įvairovę. Tokie junginiai kaip flavonoidai, nukleozidai ar organinės rūgštys yra poliškos molekulės, todėl įprastai tiriamos efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodu.

Viena svarbiausių nelakiųjų junginių grupių *Auricularia* vaisiakūniuose yra fenolinės rūgštys ir flavonoidai, kurie kaip minėta 1.6 poskyryje, sudaro nemažą dalį biologinio aktyvumo.

Kita reikšminga nelakiųjų junginių grupė, aptinkama ausiagrybio ekstraktuose, yra nukleozidai ir nukleobazės. Šie junginiai yra svarbūs ląstelių energijos ir metabolizmo procesams, o tyrimuose su maisto papildais stebimas teigiamas poveikis smegenų veiklai ir nuovargio mažinimui (54).

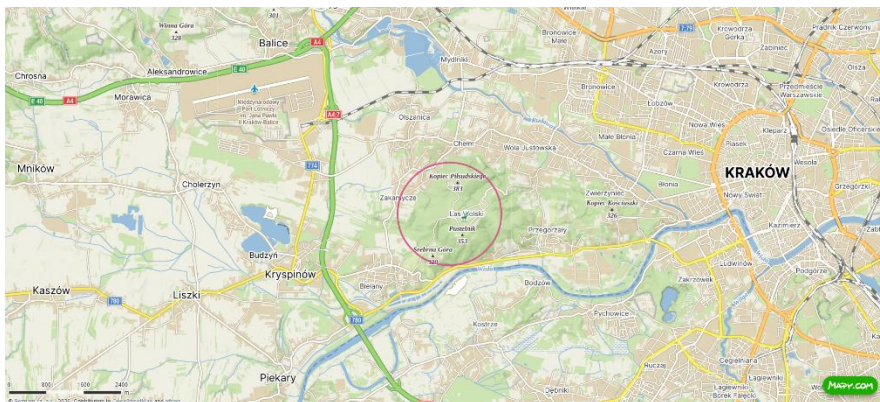
1.10. Ekstraktų toksiškumo vertinimas (*Artemia sera*)

Ekstraktų bendrajam toksiškumui įvertinti šiame darbe bus taikomas *Artemia sera* lervų mirtingumo testas (*angl. brine shrimp assay*, BSLA). Šis metodas plačiai naudojamas, kaip paprasta ir pigi cheminių medžiagų toksiškumo patikra. Dėl nedidelių kaštų, nesudėtingo atlikimo bei galimybės vienu metu tirti daug mėginių, šis testas dažnai pasirenkamas ankstyvame bioaktyvių medžiagų atrankos etape (55). Rezultatai apibūdinami LC_{50} reikšme, kuri palyginama su kitais mėginiais. L. E. Ruiz-González ir kt. atliktas tyrimas parodė, kad įvairių *Basidiomycota* grybų vandeniniai ekstraktai sukelia reikšmingą *Artemia spp.* lervų mirtingumą (56). Tyrime aprašytas *Auricularia politrycha* etanolinio ekstrakto toksiškumas bei nustatyta $LC_{50} \sim 116 \mu\text{g/mL}$ reikšmė (57). Literatūroje nepavyko rasti aiškiai aprašyto BSLA su *A. auricula-judae* vandeniniu ekstraktu. Todėl tikėtina, kad šiame darbe šis metodas bus naudojamas pirmą kartą.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Auricularia auricula-judae vaisiakūniai augę natūralioje aplinkoje, Mažosios Lenkijos vaivadijoje (Krokuva, Lenkija). Surinkti bei identifikuoti grybų žinovo 2025 m. lapričio mėnesį.



pav. 4 Apytikslė grybo surinkimo vieta

pav. 5 *Paprastasis ausiagrybis natūralioje aplinkoje (fotografuota prieš surenkant)*

2.2. Naudoti prietaisai bei reagentai

Prietaisai

1. Analizinės svarstyklės GR -200 – EC A&D instruments LTD (Japonija);
2. Ultragarsinė vonelė BANDELIN electronic Sonorex RK 100 H (Vokietija);
3. Mechaninė kintamo tūrio pipetė 10 – 100 µL Eppendorf Research (Vokietija);
4. Mechaninė kintamo tūrio pipetė 50 – 200 µL Biohit (Vokietija);
5. Mechaninė kintamo tūrio pipetė 100 – 1000 µL Eppendorf Research PLUS (Vokietija);
6. Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometras Lambda 25 (JAV);
7. Dujų chromatografas GC-2010 PLUS/ GC-MS-QP2010 ULTRA (Shimadzu Japonija).

Detektorius - masių spektrofotometrinis. Chromatografinė kolonėlė LN-5MS, ilgis 30m, vidinis skersmuo 0,25mm. Nejudri fazė – metilpolisiloksanas, turintis 5% fenilo grupių, nejudrios fazės sluoksnio storis – 0,25 µm. Nešančios dujos helis;

9. Efektyvusis skysčių chromatografas Agilent 1260 Infinity su fotodiodų matricos detektoriumi Agilent UV/Vis 1260 ir masių spektrofotometriniu detektoriumi Agilent 6224 TOF, naudota Agilent ZORBAX Eclipse XDB atvirkštinių fazių C18 kolonėlė, ilgis- 150mm, vidinis skersmuo- 4,6mm, nejudrios fazės (modifikuoto silikagelio su C18) dalelių dydis- 5 µm (Kanada).

Reagentai

1. Dejonizuotas vanduo gautas Direct – Q 3UV Water purification system (Type 1) aparatu;
2. Metanolis ($\geq 99,8\%$, Sigma–Aldrich);
3. Etilacetatas (Merck KGaA, Vokietija);
4. n – Heksanas ($\geq 97\%$, Honeywell JAV);
5. Galio rūgštis ($\geq 98\%$ Roth);
6. Skruzdžių rūgštis ($\geq 98\%$ Sigma-Aldrich);
7. Bevdanenis natrio karbonatas ($\geq 99,9\%$ Sigma-Aldrich);;
8. Acetonitrilas ($\geq 99,9\%$ Sigma Aldrich);
9. Folin-Ciocalteu reagentas (2M Sigma Aldrich);
10. 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninės rūgšties) diamonio druska (ABTS) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich);
11. 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchromano-2-karboksilinė rūgštis (Trolox) (97%, Sigma-Aldrich);
12. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas, radikalas (DPPH) ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich);
13. Dietilo eteris ($\geq 99,7\%$, Penta Chemicals);
14. Kalio persulfatas ($\geq 99\%$ Fluka Analytical);
15. Krevečių (*Artemia sera*) lervų kiaušinėliai (Ocean Nutrition, Tailandas).

2.3. Metodai

2.3.1. Žaliavos paruošimas tyrimams

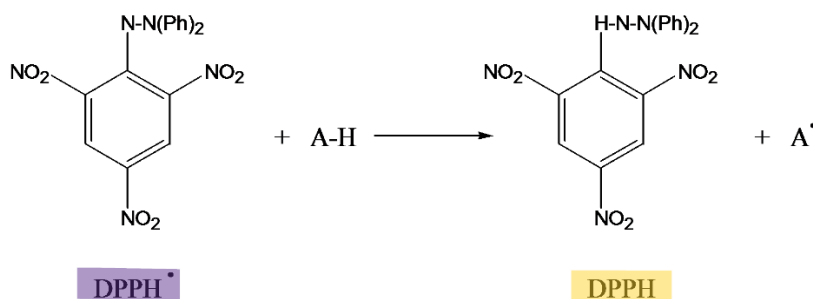
Švieži grybai buvo 3h mirkyti šaltame vandenyje, substratas nuvalytas. Tada 8h džiovinti 45 °C ir 1h 75 °C, saugiai supakuoti ir išsiųsti į Lietuvą naudojant kurjerių tarnybą. Tuomet perdėti į popierinį maišą be poligrafinių dažų, siekiant sumažinti galimą užterštumą ftalatais bei apsaugoti nuo tiesioginių saulės spindulių. Prieš tyrimą reikiama porcija grybų sumalta iki smulkių miltelių naudojant elektrinį smulkintuvą bei papildomai pasmulkinti grūstuvėje.



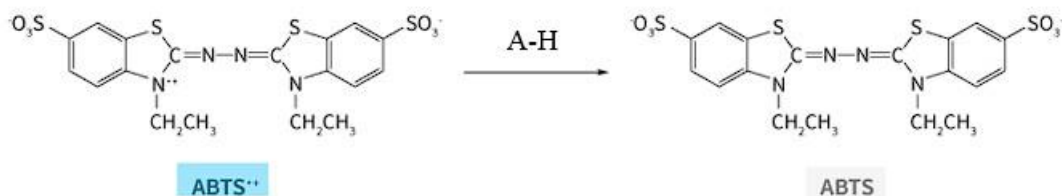
pav. 6 Džiovinta ir sumalta žaliava

2.3.2. Antioksidacinio aktyvumo tyrimai:

Antioksidacinio aktyvumo tyrimai buvo atlikti *Auricularia auricula-judae* vaisiakūnių vandeniniams ir metanoliniams ekstraktams, naudojant DPPH ir ABTS radikalų surišimo reakcijas. Tyrimai pagrįsti reakcijomis kurios pavaizduotos 8 ir 9 paveiksluose. 8 pav. reakcijos metu violetinės spalvos 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalas yra surišamas: antioksidantas AH perduoda vandenilio atomą nesuporuotam azoto atomui. Stebimas tirpalo spalvos pasikeitimas iš violetinės į šviesiai gelsvą. 9 pav. reakcijos atveju surišamas žaliai-mėlynos spalvos 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninės rūgšties (ABTS) radikalas. Stebimas tirpalo blukimas (58) .



pav. 7 Supaprastinta DPPH+ reakcijos schema



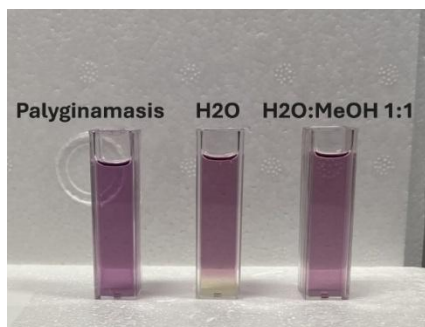
pav. 8 Supaprastinta ABTS⁺ reakcijos schema

Ekstraktų paruošimas antioksidaciniais tyrimams

Ant 2g smulkiai maltų grybų, užpilta 20 mL distiliuoto vandens ir 20 mL metanolio (MeOH). Indeliai su žaliava laikyti ultragarsinėje vonelėje 1h, kambario temperatūroje. Tirpalas filtruotas gravitaciniu metodu per filtrinį popierių. Vandeninis ekstraktas buvo paruoštas ant 2g smulkiai maltos žaliavos užpylus 40 ml dejonizuoto vandens. Ultragarsinėje vonelėje laikyta taip pat 1h, kambario temperatūroje. Dėl didelio polisacharidų kiekio grybai stipriai išbrinko, sudarydami tankią masę,

todėl toks tirpalas efektyviai filtravosi tik prijungus vakuuminį siurbį.

Kadangi vandeninio ekstrakto mėginiuose su DPPH buvo stebimos nuosėdų sankaupos (žr. pav. 7), buvo nuspręsta mėginį atskiesti papildomai įpylus 1 tūrį 80:20 H₂O:MeOH ir gautą tirpalą prafiltruoti per švirkštinį filtrą. Siekiant įvertinti metanolio ir kitų medžiagų įtaką rezultatams, buvo paruoštas ir 80% (H₂O:MeOH) ekstraktas. Gautas tirpalas padalintas į dvi dalis, viena iš jų centrifuguota 15min 15000 aps./min.



pav. 9 DPPH mėginių palyginimas

Antioksidacinio aktyvumo tyrimas DPPH + metodu

DPPH⁺ reagentui paruošti į 50 mL matavimo kolbą įdėta 0.0118 g DPPH ir užpilta iki žymos grynu metanolium (MeOH). Matavimo kolbutė apsaugota nuo šviesos apvyniojus aplink folija bei panardinta į ultragarsinę vonelę 30 min. Gaunamas tamsiai violetinis tirpalas.

Trolox standartinio antioksidanto paruošimas:

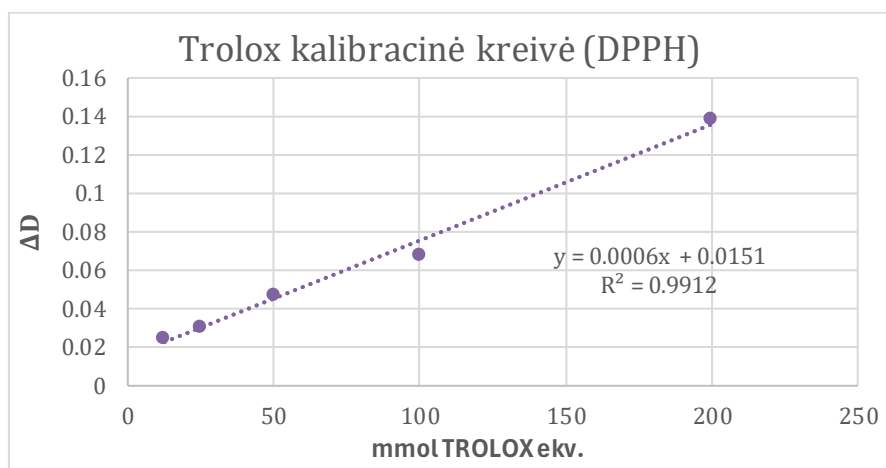
Į 100 mL matavimo kolbutę įdėta 0.005 g trolox, įpilta 5ml etanolio ir atskiesta iki žymos metanolio ir vandens (MeOH:H₂O) (70:30) mišiniu.

Kalibracinei kreivei sudaryti paruošta trolox skiedimų serija:

8ml trolox tirpalo pernešti į mėgintuvėlį (**100%**), tada iš jo 4 mL pernešti į sekantį mėgintuvėlį ir sumaišomi su 4mL MeOH:H₂O (70:30) tirpalu (**50%**), tada 4 mL gauto mišinio pernešti į trečią

mėgintuvėlį ir vėl sumaišomi su 4 mL MeOH:H₂O (70:30) tirpalo. Procedūra pakartota dar tris kartus (25, 12,5, 6,25%).

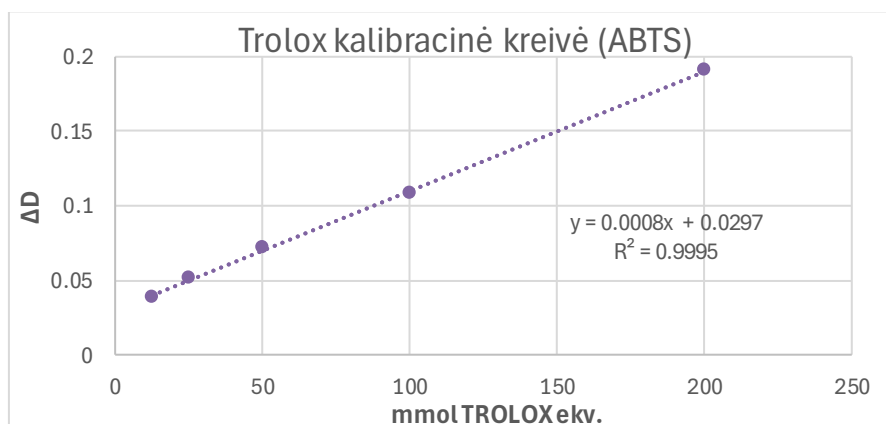
Į vienkartinę spektrofotometrinių kiuvetę įpilta 0,1 mL atitinkamos koncentracijos trolox arba mėginio ir 3,9 mL DPPH⁺ tirpalo (kurio absorbcijos vertė 0.730). 4 mL darbinių DPPH⁺ tirpalo taip pat pernešti į kiuvetę. Užpildžius kiuvetes, mėginiai inkubuoti tamsoje 30 min ir absorbcijos vertės matuotos esant 515 nm bangos ilgiui. Visos bandymų serijos pakartotos 3 kartus.



pav. 10 Kalibracinė kreivė, parodanti koreliaciją tarp trolox ekvivalento kiekio ir tirpalo optinio tankio

Antioksidacinio aktyvumo tyrimas ABTS^{•+} metodu

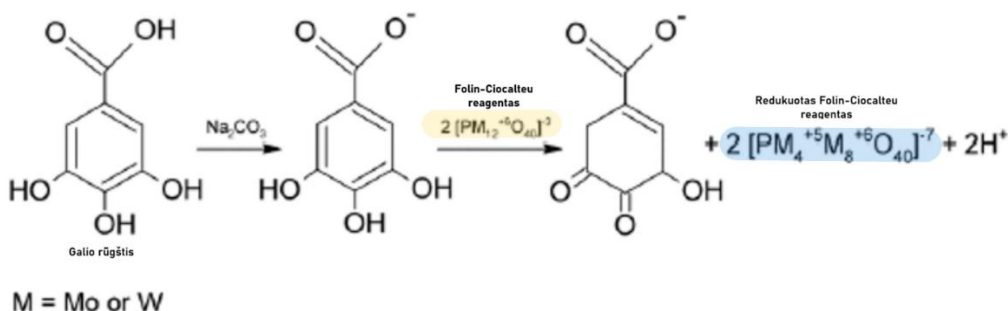
ABTS⁺ reagentas paruoštas 0.03375 g kalio persulfato ir 0.180117 g ABTS⁺ praskiedus iki 50 mL žymos MeOH:H₂O (80:20) tirpalu matavimo kolboje. Kolba apvyniota folija ir panardinta į ultragarsinę vonelę, kurioje laikyta 30 min. Tirpalas atvėsintas iki kambario temperatūros ir paliktas 18h tamsioje ir vėsioje vietoje. Gaunamas tamsiai mėlynai-žalias tirpalas. Kalibracinė kreivė sudaryta iš aukščiau aprašyto trolox skiedinių serijos tirpalų. Į vienkartinę spektrofotometrinių kiuvetę įpilta 0,1mL atitinkamos koncentracijos troloxo arba mėginio ir 3,9 mL ABTS⁺ tirpalo (kurio absorbcijos vertė 0.730). Užpildžius kiuvetes po 15 min ir matuotas optinis tankis esant $\lambda=734$. Visos bandymų serijos pakartotos 3 kartus.



pav. 11 Kalibracinė kreivė, parodanti koreliaciją tarp trolox ekvivalento kiekio ir tirpalo optinio tankio

Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas

Paprastojo ausiagybio ekstraktuose esantis bendras fenolinių junginių kiekis buvo tiriamas spektrofotometru, naudojant Folin-Ciocalteu reagentą. Tyrimas pagrįstas reakcija, pavaizduota 12 paveiksle. Jos metu geltonos spalvos Folin-Ciocalteu reagentas, fenolinių junginių aplinkoje redukuojasi iki mėlynos spalvos junginio.



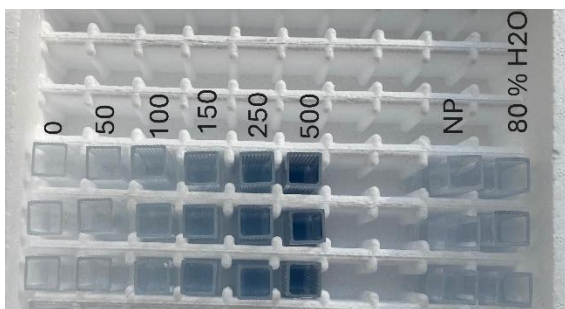
pav. 12 Supaprastinta Folin-Ciocalteu reakcijos schema

Galo rūgšties standartiniam tirpalui paruošti 0,5g galo rūgšties ištirpinta 10 mL etanolio ir praskiesta vandeniui 100 mL matavimo kolboje iki žymos. Laikoma šaldytuve.

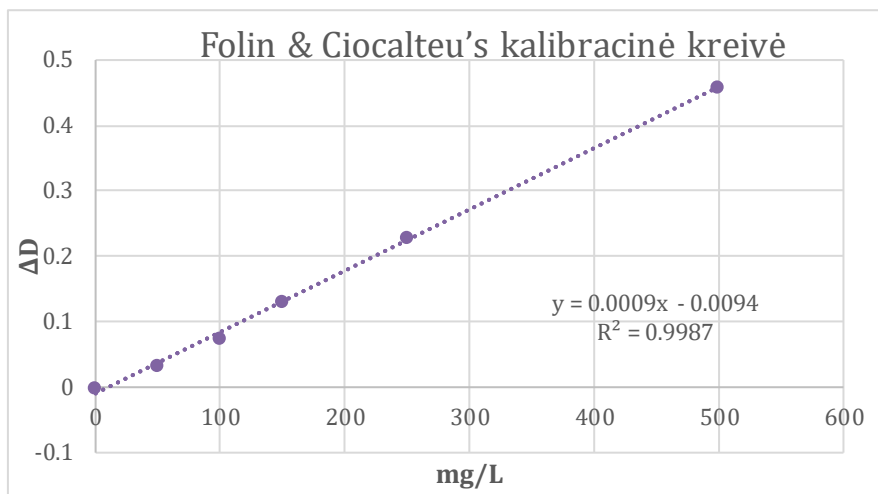
Galo rūgšties kalibracinei kreivei sudaryti : 0,05; 0,1; 0,15; 0,25; 0,5 mL standartinių tirpalų buvo perkelta į 5 mL matavimo kolbas ir atskiesta vandeniui iki žymos. Šių tirpalų koncentracijos buvo atitinkamai 50; 100; 150; 250, 500 mg/L galo rūgšties.

20% natrio karbonato tirpalas paruošiamas: 20g natrio karbonato užpylus 80ml distiliuoto vandens. Tirpalas pakaitinamas iki virimo, ir atvėsus įdedama dar keletas natrio karbonato kristalų. Po 24h prafiltruojama ir pilama vandens iki 100mL.

Iš kiekvieno kalibracinio tirpalo bei mėginių į skirtingas vienkartinės spektrofotometrines kiuvetes įlašinta po 20 μ L , tada į kiekvieną įpilta 1,58 mL vandens, bei 100 μ L Folin-Ciocalteu reagento. Praėjus 8 min į kiekvieną įpilta 300 μ L 20% natrio karbonato tirpalo. Atsargiai sumaišyta ir palikta tamsioje vietoje 2h. Po inkubacijos aiškiai matomas tirpalų spalvinis pokytis (pav.13). Lyginamasis tirpalas buvo paruoštas identišškai, tačiau nepiltas mėginys/galo r. Absorbcijos vertės matuotos esant 765 nm bangos ilgiui. Visos bandymų serijos pakartotos tris kartus.



pav. 13 Folin-Ciocalteu kalibraciniai tirpalai



pav. 14 Kalibracinė kreivė, parodanti koreliaciją tarp galio rūgšties kiekio tirpale ir tirpalo optinio tankio

2.3.3. Dujų chromatografija / masių spektrometrija

Šiame darbe DCh/MS metodas pasirinktas, kaip pagrindinis įrankis lakiųjų ir pusiau lakių junginių profiliavimui. Cheminė analizė atlikta naudojant dujų chromatografą „Shimadzu GC-2010 PLUS“ su masių spektrometrometru „GC-MS-QP2010 ULTRA“, pavaizduotą pav. 15. 2 lentelėje nurodytos pagrindinės DCh/Ms analizės sąlygos.



pav. 15 Dujų chromatografas

Lentelė 2 Esminės dujų chromatografijos sąlygos

Parametras	Sąlygos
Nešančios dujos	Helis
Dujų srauto greitis	1mL/min
Injekcijos režimas	Srauto dalijimas 5:1
Injekcijos tūris	1 µL
Temperatūrinis režimas	$10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ $50^{\circ}\text{C} \xrightarrow{1\text{min}} 300^{\circ}\text{C}$ 6min
Garintuvo temperatūra	240°C
Detektoriaus temperatūra	230°C
Analizės trukmė	20min
Slėgis	7,64 psi

Mėginių paruošimas tyrimui

Siekiant nustatyti tinkamą mėginio paruošimo metodiką, buvo paruošti 8 *A. auricula-judae* vaisiakūnių ekstraktai.

Nr.1: 2 g žaliavos suberta į borosilikatinę stiklinę su plastikiniu kamšteliu ir užpilta 40 mL n-hexano. Įdėta į ultragarsinę vonelę ir laikyta joje 1h. Gauta masė gravitaciniu metodu prafiltruota pro filtrinį popierių. Organinis tirpalas sukonzentruotas iki reikiamo tūrio (1.7mL), naudojant N₂ dujų srautą ir perpilta į chromatografinį buteliuką.

Nr.2: 0,5g žaliavos suberta į borosilikatinę stiklinę su plastikiniu kamšteliu ir užpilta 50 mL distiliuoto vandens. Stiklinė patalpinta į ultragarsinę vonelę ir laikyta joje 1h. Gauta drebučių pavidalo masė perkelta į Biuchnerio piltuvą sujungtą su storasiene Erlenmejerio kolba. Po 45 min surinkta 35mL filtrato. Iš jų 10 mL perkelta į mėgintuvėlį, tolimesnei ekstrakcijai, o likusioji dalis atidėta į šaldytuvą. Į mėgintuvėlį įpilta po 1mL n-heksano ir dietileterio. Gautas tirpalas 2-3 min homogenizuotas „vortex“ purtyklėje. Į kitą mėgintuvėlį Pastero pipete nugriebtas viršutinis sluoksnis su ištirpusiomis organinėmis medžiagomis. Procedūra kartojama 3 kartus. Gauti 6 mL organinio tirpalo sukonzentruoti azoto dujų sraute iki 1,5mL ir perpilti į chromatografinį buteliuką.

Nr.3: Praėjus 18h į 25 mL **Nr.2** vandeninio ekstrakto įpilta 5 mL n-pentano. Stiklinė patalpinta į ultragarsinę vonelę ir laikyta joje 1h. Pastero pipete atskirtas viršutinis organinis sluoksnis (2mL). Tirpalas perpiltas į chromatografinį buteliuką.



pav. 16 Vakuuminės filtracijos procesas

Nr.4: 0,5g žaliavos suberta į borosilikatinę stiklinę su plastikiniu kamšteliu ir užpilta 50 mL distiliuoto vandens. Palikta stovėti šaldytuve pernakt (18h). Ryte stiklinė buvo patalpinta į ultragarsinę vonelę ir laikyta joje 1h. Gauta drebučių pavidalo masė perkelta į Biuchnerio piltuvėlį su 1 laipsnio akytu disku, per alonžą sujungtą su apvaliadugne kolba ir nufiltruota vakuuminiu būdu (pav.16). Vandeninis ekstraktas (38mL) perpiltas į stiklinę su kamščiu ir įpilta po 4mL dietileterio ir n-heksano. Stiklinė patalpinta į ultragarsinę vonelę ir laikyta joje 1h. Mišiniui atvėsus, ekstraktas buvo perpiltas į dalijamąjį piltuvą ir atskirta organinė frakcija (2mL). Tirpalas perpiltas į chromatografinį buteliuką.

Nr.5: 0,5g žaliavos suberta į borosilikatinę stiklinę su plastikiniu kamšteliu ir užpilta 50 mL distiliuoto vandens. Palikta stovėti šaldytuve 96h. patalpinta į ultragarsinę vonelę ir laikyta joje 1h. Gauta drebučių pavidalo masė prafiltruota vakuuminiu būdu. Prie gautų 39 mL vandeninio ekstrakto įpilta 20 mL dichlormetano ir 5 mL metanolio. Organinė frakcija atskirta dalijamuoju piltuvu, 5 mL šio tirpalo sukonzentruoti azoto dujų sraute iki 2mL ir perpilti į chromatografinį buteliuką.

Nr.6: 2 g žaliavos suberta į borosilikatinę stiklinę su plastikiniu kamšteliu ir užpilta po 10 mL dichlormetano ir metanolio. Stiklinė patalpinta į šaldytuvą 96h. Tirpalas filtruotas gravitaciniu metodu per didelio porų dydžio filtrinį popierių. Filtratas supiltas į dalijamąjį piltuvą ir atskirta dichlormetano frakcija. 4 mL atskirtos frakcijos azoto dujų sraute sukonzentruota iki 1,5 mL ir perpilta į chromatografinį buteliuką.

Nr.7: 2 g žaliavos suberta į borosilikatinę stiklinę su plastikiniu kamšteliu ir užpilta 10 mL n-pentano. Stiklinė atidėta į šaldytuvą 96h. Prafiltruota pro švirkšto filtrą. Filtratas sukonzentruotas iki 1,7 mL azoto dujų sraute ir perpiltas į chromatografinį buteliuką.

Nr.8: 0,5g žaliavos suberta į borosilikatinę stiklinę su plastikiniu kamšteliu ir užpilta 50 mL distiliuoto vandens ir palikta stovėti šaldytuve pernakt. Ryte patalpinta į ultragarsinę vonelę ir laikyta joje 1h. Vandeningas ekstraktas filtruotas vakuuminiu siurbliu ir patalpintas į šaldytuvą 72h. Įpilta 5 mL metanolio ir palikta dar 24h šaldytuve. Į ekstraktą įpilta 20 mL dichlormetano ir stiklinė patalpinta į ultragarsinę vonelę 1h. Apatinė organinė dichlormetano frakcija atskirta dalijamuoju piltuvu. Šis

tirpalas turėjo emulsinį vandens sluoksnį, todėl buvo įberta 3g bevandenio natrio sulfato, siekiant dehidratuoti ekstraktą. Gautas ekstraktas papildomai filtruotas per vidutinio porų dydžio filtrinį popierių. 10 mL gauto organinio tirpalo sukonzentruoti iki reikiamo tūrio panaudojus azoto dujų srautą ir perpilti į chromatografinį buteliuką.

Siekiant identifikuoti kvapą lemiančius lakiuosius junginius, buvo atlikta **kietafazė mikroekstrakcija (angl. solid phase microextraction SPME):**

3 g žaliavos buvo patalpinta į „headspace“ buteliuką, kuris uždarytas užspaudžiamu kamšteliu, įterpiant SPME adatą su sorbentu. Mėginys inkubuotas 60 °C vandens vonelėje 40 min (pav. 17). Po ekstrakcijos, adata rankiniu būdu įstatyta į DCh įvadą ir laikyta jame 5 min. prie 240 °C, kad sorbuotos analitės būtų termiškai desorbuotos. Analizė vykdyta 25 min. trukmės "splitless" režimu.



pav. 17 Kietafazės mikroekstrakcijos procesas

Kokybinis lakiųjų junginių nustatymas

Kokybinė ekstrakto lakiųjų junginių analizė atlikta analizuojant MS spektrus. Remiantis kompiuterine programa, kuri pagal esančias masių spektrų bibliotekas („Willey“; „Flavour and fragrance natural and synthetic compounds“ bei „National institute of standards and technology“(NIST)) pateikia geriausią junginio atitikmenį. Peržvelgus ir įvertinus šią visą informaciją yra nusprendžiama koks junginys yra gautas kiekviename masių spektre.

2.3.4. Efektyvioji skysčių chromatografija/ masių spektrometrija

Siekiant nustatyti nelakius ausiagrybio komponentus, buvo atlikta efektyvioji skysčių chromatografija. Analizė atlikta naudojant „Agilent 1260 Infinity“ efektyvųjį skysčių chromatografą „UV/Vis 1260“ su fotodiodų matricos detektoriumi ir „6224 TOF“ masių spektrofotometriniu detektoriumi. Pasirinkta C18 (15mm x 4.6mm, dalelių dydis- 5 µm) atvirkštinių fazių kolonėlė. Jos temperatūra 25±0,8 °C, injekuoto mėginio tūris- 5µL. Naudota judrioji fazė, kurios komponentai išvardinti *Lentelėje 3*. Jos tėkmės greitis 500 µL/min. Eliucijos parametrai išvardinti *Lentelėje 4*. Mėginio chromatografinės analizės laikas- 25,10 min. Ausiagrybio junginių detekcijai naudoto TOF masių detektoriaus parametrai: masių diapazonas- 110-1000 m/z, skenavimo greitis- 5 spektrai/s.

Lentelė 3 Judriosios fazės komponentai

Kanalas	Tirpiklis
A	Vanduo: Acto rūgštis: Acetonitrilas (88:2:10 %, v:v:v)
B	Metanolis

Lentelė 4 Eliucijos parametrai

Laikas	A	B
20,00 min	100%	
25,00 min		100%
25,10	5 %	95%

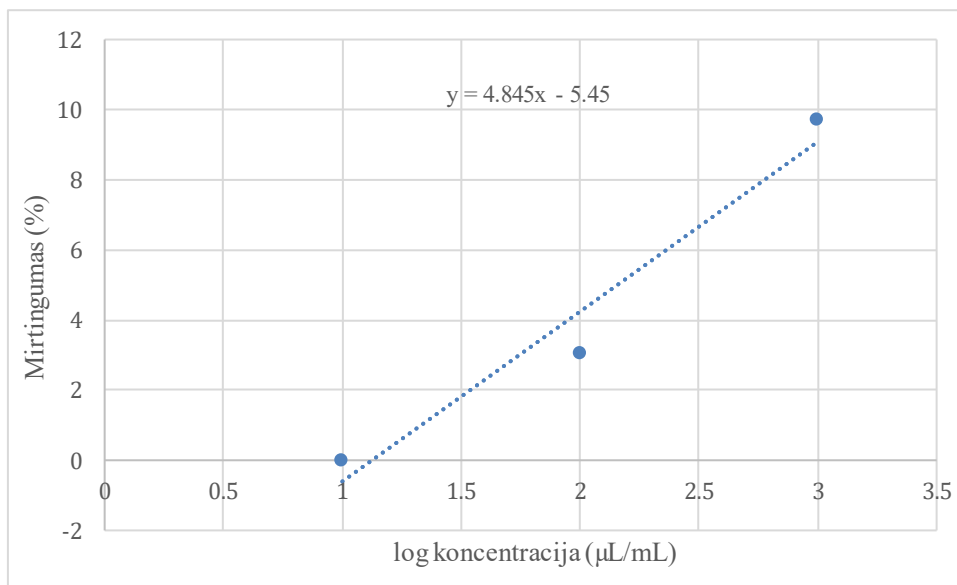
Mėginio paruošimas tyrimui:

Į skirtingas borosilikatines stiklines įberta 2g ir 3g žaliavos ir užpilta 60mL 80:20 vandens: metanolio (H₂O:MeOH) mišinio.

Stiklinės patalpintos į ultragarsinę vonelę 15 min prie 60 °C ir laikytos joje dar 2h prie 30 °C . Atvėsinus iki kambario temperatūros tirpalai patalpinti į šaldytuvą 72h. Surenkama vakuuminio įranga: ant Biuchnerio piltuvo uždedamas didelio porų dydžio filtrinis popierius ir sudrėkinamas keletu lašų tirpiklio, per guminį kamštį piltuvas sujungiamas su Bunzeno kolba. Pilnai atsukamas vandens čiaupas ir prie kolbos prijungiama vakuuminė žarna. Įsitikinama, kad įranga funkcionuoja tinkamai. Ekstrakcijos metu gauta drebučių pavidalo masė, nedidelėmis porcijomis perkeliama į piltuvą. Filtracija baigiama, kai filtratas nustoja lašėti. Buvo surinkta 20 ir 15 mL ekstrakto. Siekiant nusodinti polisacharidus iš jų po 2mL centrifuguoti 15 min 15000 RPM. Visi ekstraktai sudėti į šaldytuvą iki tolesnės analizės.

2.3.5. Toksiškumo įvertinimas *A. auricularia* ekstraktui

1. Paruoštas vienas litras 3,8% jūros vandens tirpalo. Į atskirą indą įdėta krevečių kiaušinėlių (*Artemia sp.*) ir ant jų atsargiai užpiltas anksčiau paruoštas vanduo. Kad išsiritų lervos, kiaušinėliai paliekami 48 valandoms šiltoje patalpoje (~25 °C).
2. Paruošti skirtingos koncentracijos vandeninio ausiagrybio ekstrakto tirpalai. Buvo pagaminti 2 µg/mL, 20 µg/mL, 200µg/mL koncentracijos tirpalai.
3. Po dviejų dienų, išsiritus lervoms, paruošti atskiri bandiniai analizei. Kiekvienai serijai paruoštos keturios atskiros stiklinaitės. Jos yra užpildytos 4 mL vandens, ir į jį patalpinta apie 12 lervų. Iš kart įpilta dar 1 mL vandens ir atitinkamos koncentracijos ekstraktas.
4. Lygiagrečiai paruoštos dvi kontrolinės bandinių serijos užpildžius 3 stiklinėles 10 mL vandens tirpalo ir įleidus tikslų kiekį lervų. Viso tyrimo metu palaikyta pastovi druskos koncentracija vandenyje, kadangi tai turi įtakos krevečių augimui.
5. Visos serijos mėginių bei kontrolinė grupė paliktos 24 valandoms. Po kurių skaičiuotas krevečių išgyvenamumas.



pav. 18 Krevečių lervų mirtingumo priklausomybė nuo logaritminės ausiagrybio ekstrakto koncentracijos

2.4. Statistinė duomenų analizė

Duomenų normaliajam pasiskirstymui patikrinti naudotas Shapiro-Wilko testas. Dispersijų lygybei patikrinti naudotas Levene's testas. Vienfaktorinė dispersinė analizė atlikta naudojant ANOVA su post-hoc Tukey testu. Vidurkių, standartinių nuokrypių paskaičiavimai bei visos aukščiau paminėtos statistinės analizės atliktos naudojantis „R Commander“ ir „Microsoft Excel“ programomis. Diagramose ir tekste duomenys išreikšti vidurkiu ± standartinis nuokrypis.

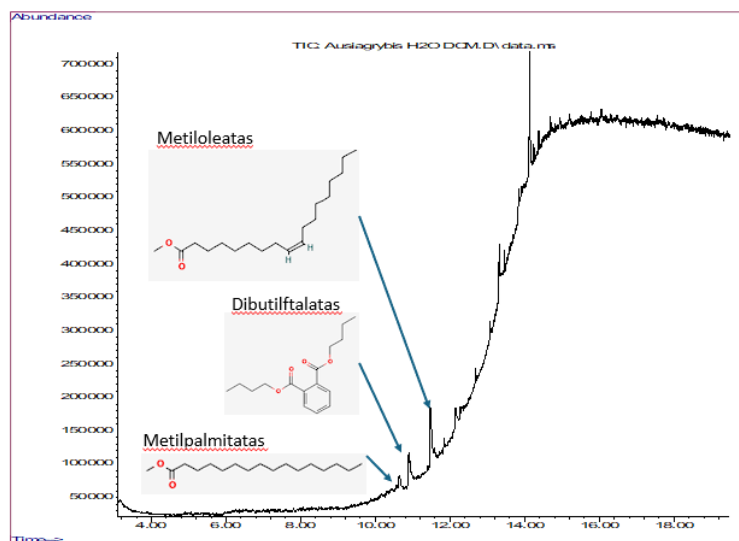
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Paprastojo ausiagybio ekstraktų lakiųjų junginių nustatymas

Analizuojant *A. auricula* ekstraktų sudėtį iš literatūros ir šio darbo duomenų galima nesunkiai pastebėti, kad cheminį profilį lemia ne tik grybo rūšis, bet ir jo kilmė bei taikytos mėginio apdorojimo sąlygos. Ankstesniuose ausiagybio tyrimuose lakiųjų junginių spektras dažniausiai vertintas, taikant SPME metodą arba ekstrahuojant vienu pasirinktu tirpikliu (51,59,60). Iš viso, analizei atlikti buvo paruošti 9 ekstraktai, iš kurių pasirinkti 3 perspektyviausi (Nr.8, 9 ir SPME). Likusiuose ekstraktuose patikimai identifikuoti junginių nepavyko. Šiame darbe, kiek žinoma šiai dienai, šie grybai pirmą kartą tiriami ekstrahuojant skirtingais tirpikliais. Toks pasirinkimas leidžia apibūdinti pagrindinius ausiagybio ekstraktams būdingus lipofilinius junginius ir jų pasiskirstymą skirtinguose tirpikliuose. Iš viso, buvo patikimai identifikuoti 7 pagrindiniai junginiai, kurie aprašomi žemiau. Palyginti nedidelis junginių skaičius ir jų pikų intensyvumas rodo, kad jie ekstraktuose aptinkami santykinai mažomis koncentracijomis. Verta pažymėti, kad grybų cheminė matrica yra pakankamai sudėtinga. Ląstelės sienelę sudaro ganėtinai sunkiai suskaidomas chitinas ir įvairios, kitos struktūrinės polisacharidų frakcijos. Tokios sąlygos apsunkina komponentų ištraukimą iš ekstraktų. Dėl šių priežasčių, gautus rezultatus būtų tikslinga vertinti, kaip preliminarų Paprastojo ausiagybio ekstraktų lakiųjų junginių profilį. Tolimesni tyrimai, taikant tinkamus derivatizacijos metodus, padėtų atskleisti platesnį metabolitų spektrą.

3.1.1. Lakiųjų junginių nustatymas vandens: dichlormetano: metanolio ekstrakto

Išanalizavus vandens: dichlormetano: metanolio ekstrakto organinę frakciją buvo rasti du pagrindiniai junginiai. Taip pat buvo fiksuoti ir foniniai plastifikatorių (ftalatų) bei siloksanų pikai. Jie traktuoti kaip aplinkos tarša, todėl į tolimesnę analizę įtraukti nebuvo. Žemiau pateikiama DCh–MS chromatograma, su pagrindinių junginių struktūrinėmis formulėmis (pav.19).



pav. 19 Vandens: dichlormetano: metanolio ekstrakto (Nr.8) chromatograma

Lentelė 5 DCh/MS identifikuoti junginiai

Junginys	Sulaikymo laikas (min)	Piko plotas (Ab*s)	Santykinė dalis (%)
Metil palmitatas	10.637	647713	18.16
Metil oleatas	11.469	2918821	81.84

Šiame ekstrakte vyraavo riebalų rūgščių esteriai. Didesnę dalį sudarė oleino rūgštis (81.84%), toliau sekė palmitino (18.16%).

Metil cis-9-oktadekanoatas (metil oleatas) yra 18 anglies atomų turinčios oleino rūgšties metilesteris. Gamtoje jis aptinkamas įvairiose grybuose bei augaluose, pavyzdžiui, kreivabūdėse ir paprikose. Šis junginys plačiai naudojamas kosmetikos bei maisto pramonėje, kaip aromato rišiklis bei paviršiaus aktyvioji medžiaga (61). Literatūroje aprašytas šio esterio stiprus antibakterinis poveikis prieš atsparias *E. coli* ir *K. Pneumoniae* padermes. Tai siejama su gebėjimu inhibuoti išplėstinio spektro beta laktamazes (angl. ESBL). In vivo tyrimuose nustatyta, kad metil oleatas yra citotoksiškas *Artemia nauplii* lervoms ($LC_{50} \sim 50 \mu\text{g/mL}$) ir sukelia hematologinius pokyčius žuvims. Kita vertus, infekcijos modeliuose gerina išgyvenamumą, nes veikia kaip anti-ESBL agentas (62). Taip pat, aprašytas, jo gebėjimas neutralizuoti ROS bei priešuždegiminis poveikis (63).

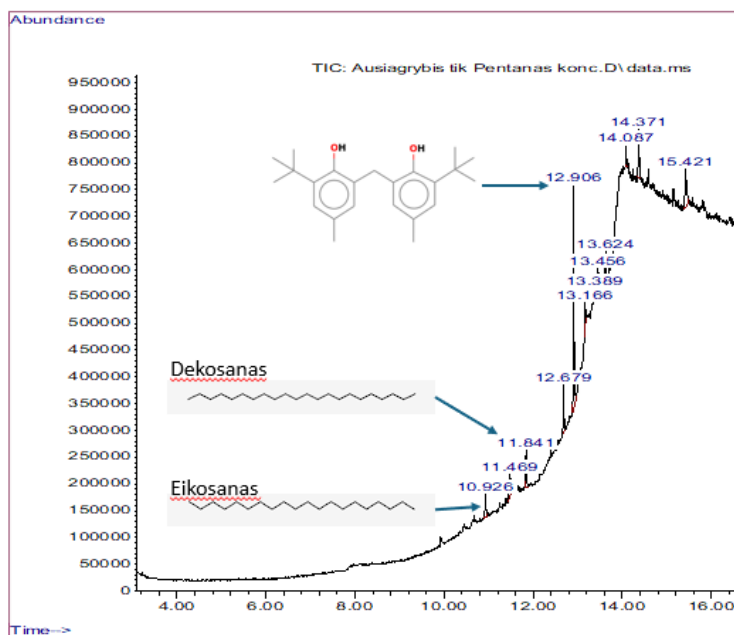
Metil heksadekanoatas, dar kitaip žinomas kaip metilpalmitatas, tai alifatinės C16 grandinės riebalų rūgšties esteris. Jis yra labai plačiai paplitęs ne tik grybuose, bet ir įvairiose augaluose, kaip pavyzdžiui arbatmedžiuose (*Camellia sinensis*) (64). In vivo modeliuose parodyta, kad metil palmitatas slopina citokinų ekspresiją ir mažina makrofagų aktyvumą. Dėl to, jis pasižymi priešuždegiminiu poveikiu. Taip pat, aprašytas ir šio esterio kardiotrotekcinis bei neuroprotektinis aktyvumas. Toks poveikis siejamas su vasodilacija bei gebėjimu neutralizuoti ROS (65–67). Tokie analizės rezultatai sutampa su Waill A. Elkhateeb tyrimo duomenimis, kuriuose *A. auricula-judae* vaisiakūnių ekstrakte buvo aptikti metiloleatas bei metilpalmitatas (59). Juos patvirtina ir Kalitukha darbas, kuriame kaip pagrindinės lipidų profilio dalys buvo išskirtos palmitino, oleino, stearino bei linolo rūgštys (9).

3.1.2. Pentano ekstrakto lakiųjų junginių nustatymas

Išanalizavus pentano ekstraktą buvo aptikti du ilgos grandinės alkanai ir vienas šakotas fenolinis junginys. Žemiau pateikiama DCh–MS chromatograma, su pagrindinių junginių struktūrinėmis formulėmis (pav. 20).

Lentelė 6 DCh/MS identifikuoti junginiai

Junginys	Sulaikymo laikas (min)	Piko plotas (Ab*s)	Santykinė dalis (%)
Eikosanai	10.927	776164	10.72
Dekosanas	11.84	974885	13.47
2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenolis	12.909	5485722	75.8



pav. 20 Pentano ekstrakto (Nr. 9) chromatograma

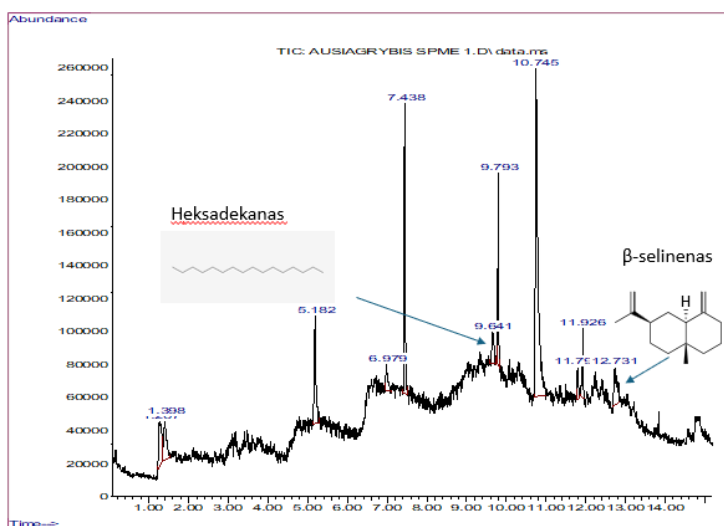
Didesnę santykinę dalį sudarė 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenolis (75.8%), toliau sekė dekosanas (13,47 %) bei eikosanas (10,72%). Literatūros duomenimis, toks fenolinis junginys buvo aptiktas kitame saprotrofiniame grybe - Gluosninėje kreivabudėje. Tai leidžia teigti, kad šis junginys būdingas grybams. Aprašomas stiprus jo antioksidacinis poveikis, bei vidutinis antibakterinis aktyvumas (68).

Dekosanas tai, alifatinis C22 grandinės alkanas. Jis aptinkamas *Ganoderma* genties grybuose (53). Pasižymi priešgrybelinėmis, antimikrobinėmis bei priešuždegiminėmis savybėmis (69)

Eikosanas yra 20 anglies atomų grandinės alkanas. Kaip ir decosanas, aptinkamas Reishi grybuose (*Ganoderma spp.*) (53). In vitro tyrimuose reikšmingai eikosanas slopino *A. niger*, *C. capsici*, *F. oxysporum* ir *S. rolfii* grybelių augimą bei pasižymėjo antioksidacinėmis savybėmis (70,71).

3.1.3. Lakiųjų junginių nustatymas kietafazės mikroekstrakcijos metodu (SPME)

Kietafazės mikroekstrakcijos metodu buvo aptikti du junginiai. Didesnę santykinę dalį sudarė Eudesma-4(14),11-dienas (60,98%), toliau sekė heksadekanas (39,02%). Žemiau pateikiama DCh–MS chromatograma, su pagrindinių junginių struktūrinėmis formulėmis (pav.21).



pav. 21 Kietafazės mikroekstrakcijos chromatograma

Lentelė 7 GCh/MS identifikuoti junginiai

Junginys	Sulaikymo laikas (min)	Piko plotas (Ab*s)	Santykinė dalis (%)
Heksadekanas	9.641	804963	39.02
Eudesma-4(14),11-dienas	12.73	1257917	60.98

Eudesma-4(14),11-dienas, tai C15 seskviterpeno darinys kitaip žinomas, kaip β-selinenas. Natūraliai jis aptinkamas salierų sėklų aliejuje, apyniuose, sukatžolėse bei baltikenių genties grybuose (*Tricholomopsis spp.*) (72–74). Didžialapės vaisuolės (*Callicarpa macrophylla*) eteriniame aliejuje, šis junginys gali sudaryti net iki 60% viso profilio. Manoma, kad β-selinenas gali turėti antioksidacinį poveikį, dėl gebėjimo surišti laisvuosius radikalus bei chelatuoti metalų jonus. Galimi junginio priešuždegiminis, analgesinis bei antipiretinis poveikiai siejami su gebėjimu slopinti ciklooksigenazę (COX), bei prostaglandinų sintezę (75).

Heksadekanas, tai alifatinės 16 anglies atomų grandinės alkanas. Jis natūraliai randamas kanapėse, bičių feromonuose bei kreivabudžių genties grybuose (*Pleurotus spp.*) (76–78). Šis alkanas, taip pat minimas Waill A. Elkhateeb atliktame tyrime *A. auricula-judae* tyrime (59). Heksadekanas sukelia hiperproliferaciją bei hiperkeratozę tiriamųjų gyvūnų odoje, todėl naudojamas lėtinių odos ligų, tokių kaip psoriazė in vivo modeliuose (79,80). Dėl savo lipofilinių savybių heksadekano dariniai tiriami, kaip galimi acetilcholiesterazės inhibitoriai Alzheimerio ligos gydymui (81).

3.2. Nelakiųjų junginių nustatymas ESCh/MS/DMD/ToF metodu

Fitocheminiams junginiams identifikuoti buvo taikoma efektyvioji skysčių chromatografija su diodų matricos detektoriumi ir skriejimo laiko masių detektoriumi. *A. auricularia-judae* ekstraktuose esantys junginiai buvo atpažinti preliminarai palyginus jų molekulinės masės, formules su literatūroje aprašytais būdingais junginiais. Iš viso aptikta 12 junginių kurie pavaizduoti Lentelėje 8.

Lentelė 8 Preliminariai identifikuoti junginiai

Preliminari identifikacija					
m/z ESI ⁺ (Da)	m/z ESI ⁻ (Da)	Junginys	Molinė masė	Formulė	Klasė
	177.043	5,7-Dihidroksichromonas	178.1	C ₉ H ₆ O ₄	Flavonoidas(82)
	174.959	Askorbo rūgštis	176.1	C ₆ H ₈ O ₆	Monosacharidų darinys (35)
	316.949	Melanas	318.3	C ₁₈ H ₁₀ N ₂ O ₄	Pigmentas (83)
169.171		Vanilinė rūgštis	168.2	C ₈ H ₈ O ₄	Fenolinė rūgštis(82)
	277.147	bis(3-mettilbut-2-en-1-yl)benzen-1,2,3,5-tetrolis	278.1	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	Prenilintas fenolio darinys(82)
	325.187	Neidentifikuota			
	377.089	Chlorogeninės rūgšties darinys	378.1	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	Fenolinė rūgštis (Hidroksicinamoninės rūgšties darinys)(35)
	387.116	Aldono rūgšties glikozidas	388.3	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₃	Cukrinis glikozidas
	439.088	Malonilintas chlorogeninės rūgšties darinys (CQA)	440.1	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₂	Fenolinė rūgštis (Hidroksicinamoninės rūgšties darinys)
158.154		Neidentifikuota			
352.339		Neidentifikuota			
243.114		Piroglutamil dipeptidas	242.2	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₄	Ciklinis dipeptidas (84)

Didžiąją dalį preliminariai identifikuotų junginių sudarė fenolinės rūgštys bei jų dariniai. Tarp jų aptikta vanilinė [m/z ESI⁺ 169,171] bei askorbo rūgštys [m/z ESI⁻ 174.959]. Šių junginių antioksidacinis poveikis plačiai aprašytas literatūroje (85). Aprašomas šiame tyrime identifikuoto flavonoido 5,7-dihidroksichromono [m/z ESI⁻ 177,043] neuroprotekcinis ir lipidų absorbciją mažinantis poveikiai (86,87). Aptikti chlorogeninės rūgšties dariniai [m/z ESI⁻ 377,089] ir malonilinti jų analogai [m/z ESI⁻ 439,088]. Tyrimuose jų hepatoprotekcinis ir antioksidacinis poveikiai prilyginami silimarinui (88). Prenilinti fenolio dariniai [m/z ESI⁻ 277,147] šiuo metu yra tiriami, dėl savo priešuždegiminių savybių. Be to identifikuotas labai hidrofilinis aldono rūgšties glikozidas [m/z ESI⁻ 378,089], kuris gali būti siejamas su antibakteriniu poveikiu (89,90). Grybuose jis aptinkamas, kaip medieną skaidančių fermentų metabolitas (89,90). Aptiktas ir vienas iš svarbiausių *A. auricula* bioaktyvių junginių - melanas [m/z ESI⁻ 316.949]. Literatūroje yra aprašytas jo antioksidacinis (91) ir antibakterinis poveikiai (92). Taipogi, keliuose tyrimuose aprašytas

hepatoprotekcinis poveikis alkoholiu paveiktoms pelėms bei žmogaus kepenų ląstelėms *in vitro* (93,94). Panašiu poveikiu pasižymi ir ekstrakte aptikti cikliniai dipeptidai [m/z ESI⁺ 243,114] (95). O likę trys junginiai neidentifikuoti.

Toks mažamolekulinių junginių profilis iš esmės atitinka aprašytus valgomųjų grybų spektrus. Čia irgi dominuoja hidroksicinamatai, flavanoidai bei melaninas (34,96).

Tolimesniuose tyrimuose būtų tikslinga taikyti išplėstinius ESCh/MS metodus ir pilnavertę kiekybinę analizę. Tai leistų tiksliai identifikuoti junginių struktūras bei nustatyti jų koncentracijas. Be to, būtų galima įvertinti atskirų junginių indėlį į bendrą biologinį aktyvumą.

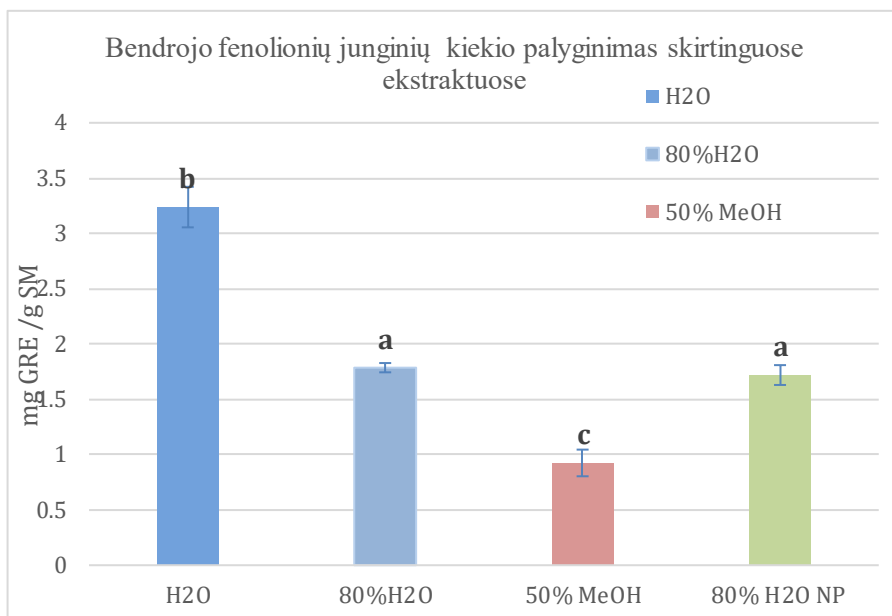
3.3. Antioksidacinis aktyvumas

Grybuose antioksidacinį aktyvumą lemia įvairūs fenoliniai junginiai, tokie kaip fenolinės rūgštys bei flavonoidai. Prisideda ir pigmentai, tokie kaip melaninas bei kiti junginiai. Maisto pramonėje naudojami ir stipriomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys sintetiniai antioksidantai, pavyzdžiui, butilhidroksitoluenas ar tert-butilhidrokvinonas. Tačiau, įtariama, kad tokie junginiai turi žalingą įtaką sveikatai, t.y. trikdo endokrininės sistemos veiklą ar gali turėti kancerogeninį poveikį. Dėl šios priežasties ieškoma natūralios kilmės antioksidantų (97). Antioksidacinio aktyvumo tyrimas įvairiems ausiagybio ekstraktams buvo atliktas pagal 2.3.2 poskyryje atliktą metodiką, kurioje pateiktos sudarytos kalibracinės kreivės.

3.3.1. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas spektrofotometrinio metodu panaudojant Folin-Ciocalteu reagentą

Didžiausias bendras fenolinių junginių kiekis (BFJK) buvo nustatytas vandeniniame ekstrakte ($3,26 \pm 0,18$ mg GRE /g SM). Mažėjant vandens daliai reikšmės, mažėjo ($1,78 \pm 0,04$ ir $0,92 \pm 0,12$ mg/g SM GRE). Polisacharidų nusodinimas centrifuguojant BFK reikšmių statistiškai reikšmingai nepakeitė ($p > 0,05$) (žr. pav. 21). Tai rodo, kad Folin-Ciocalteu reagentą redukuojantys junginiai pagrinde buvo ištirpę terpėje, o ne susijungę su polisacharidais. Literatūriniuose šaltiniuose aprašytų ausiagybio ekstraktų BFJK reikšmės varijuoja tarp 0,3 ir 5,4 mg GRE /g SM, priklausomai nuo žaliavos bei ekstrakcijos sąlygų (34,83,96,98,99). Tokius rezultatus galima paaiškinti ESCh/MS analizėje prenilintais fenoliniais junginiais, vanilinės bei chlorogeninės rūgšties dariniais bei cukrinių rūgščių

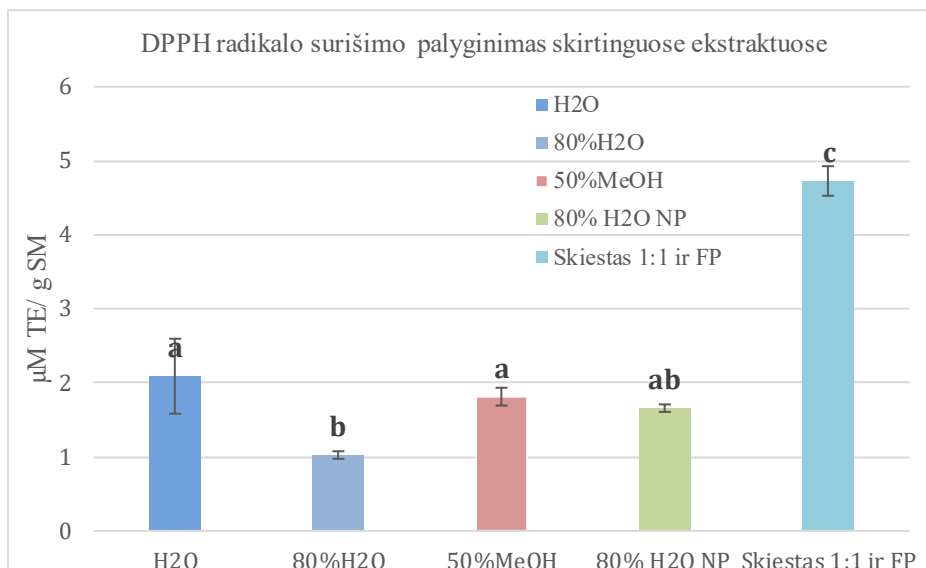
glikozidais. prenilintais fenoliniais junginiais, vanilinės bei chlorogeninės rūgšties dariniais bei cukrinių rūgščių glikozidais.



pav. 22 Bendrojo fenolinių junginių kiekio palyginimas skirtinguose ekstraktuose

3.3.2. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas spektrofotometrinio metodu, panaudojant DPPH⁺ (2,2-difenil-1-pikrihidrazilo radikalas)

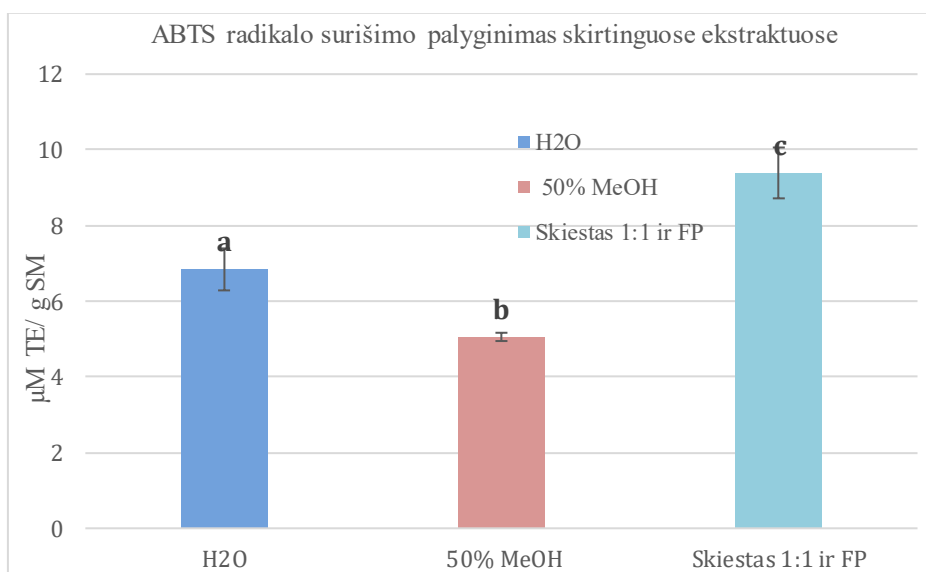
DPPH⁺ radikalo surišimo teste didžiausiu aktyvumu pasižymėjo vandeniu ekstrahuotas ir 1:1 atskiestas bei perfiltruotas ausiagrybio ekstraktas- $4,72 \pm 0,2 \mu\text{M TE/ g SM}$. Toliau sekė vandeninis- $2,09 \pm 0,5 \mu\text{M TE/ g SM}$. Pastarojo ir 50 % H₂O:MeOH ekstraktų aktyvumas tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė ($p > 0,05$). Panašios vertės tarp 1,5 ir 5 $\mu\text{M TE/ g SM}$ aprašytos ir literatūriniuose šaltiniuose (96,98). Nusodinus polisacharidus centrifuguojant stebima panaši tendencija kaip ir filtruoto ekstrakto atveju, t.y. aktyvumas didėja ~ 40% ($1,65 \pm 0,05$ ir $1,02 \pm 0,05 \mu\text{M TE/ g SM}$) (žr. pav. 22). Tai leidžia manyti, kad toks papildomas žingsnis pašalina dalį balastinių medžiagų, galėjusių trukdyti radikalo sąveikai su aktyviaisiais junginiais. Tai patvirtina ir Tadihul Islam ir kolegų atliktas sisteminis tyrimas, kuriame nustatyta neigiama koreliacija tarp angliavandenių kiekio ir antioksidacinio aktyvumo įvairiuose testuose (96). Nors minimas ir izoliuotų polisacharidų antioksidacinis aktyvumas vis tik, galima teigti, kad pagrindinį aktyvumą sudaro tirpūs fenoliniai junginiai bei glikozidai (7).



pav. 23 DPPH radikalo surišimo palyginimas skirtinguose ekstraktuose

3.3.3. Antioksidacinio aktyvumo tyrimas spektrofotometrinio metodu panaudojant $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sufon rūgšties radikalas)

$ABTS^{\bullet+}$ teste, kaip ir anksčiau minėtame DPPH⁺, didžiausiu aktyvumu pasižymėjo vandeniu ekstrahuotas ir 80% H₂O:MeOH mišiniu atskiestas bei perfiltruotas ausiagrybio ekstraktas - $9,39 \pm 0,67$ µM TE/ g SM. Toliau sekė vandeninis ($6,84 \mu\text{M} \pm 0,55$ TE/ g SM) ir 50 % H₂O:MeOH ($5,06 \pm 0,10$ µM TE/ g SM). Visi ekstraktai tarpusavyje reikšmingai skyrėsi ($p < 0.01$) (žr. pav.23). Toks aktyvumas siejamas su Ech/MS nustatytais hidrofiliskesniais junginiais, tokiais kaip, vanilinė ar askorbo rūgštis.



pav. 24 ABTS radikalo surišimo palyginimas skirtinguose ekstraktuose

3.4. Toksiškumo įvertinimas *A. auricula-judae* ekstraktams

Ekstraktų toksiškumas buvo įvertintas nustatant *Artemia sera* lervų mirtingumą. Testas atliktas pagal 2.3.5 poskyryje aprašytą metodiką. Gauti duomenys rodo, kad tirtas vandeninis ausiagrybio ekstraktas nesukėlė ūmaus toksinio poveikio. Mažas mirtingumas (10%) stebėtas tik 200 $\mu\text{L/mL}$ tirpale. Nustatyta LC_{50} vertė - 1000 $\mu\text{L/mL}$, kas yra grynas ekstraktas. Toks rezultatas gali būti siejamas su tuo, kad ausiagrybio vaisiakūniai yra valgomi, ir turi labai mažai toksiškų junginių. Todėl, vandeninis ekstraktas buvo puiki terpė krevetėms gyventi. Kas atitinka ir aprašomą *A. polytricha* saugumo įvertinimą (57). Tokie rezultatai leidžia manyti, kad nustatytas antioksidacinis ir kiti bioaktyvumai pasiekiami be ryškaus toksiškumo, šiame paprastame *in vitro* modelyje.

4. IŠVADOS

1. Nustatyta, kad *A. auricularia-judae* vaisiakūnių ekstraktams perspektyviausi - vandens pagrindo tirpikliai. Fenolinių junginių kiekis tokiaje ekstrakto didžiausias ($3,23 \pm 0,18$ mg GRE /g SM). Mažėjant vandens daliai reikšmės, mažėjo ($1,78 \pm 0,04$ ir $0,92 \pm 0,12$ mg GRE /g SM). Didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vandeniu ekstrahuotas ir 1:1 80% H₂O:MeOH mišiniu atskiestas bei perfiltruotas ausiagybio ekstraktas - $4,72 \pm 0,2$ ir $9,39 \pm 0,67$ μM TE/ g SM. Toliau sekė, vandeninis $2,09 \pm 0,5$ μM ir $6,84 \pm 0,55$ μM TE/ g SM, atitinkamai DPPH ir ABTS radikalų surišimo testuose. Panaši tendencija buvo stebima ir nusodinus ekstraktus centrifuguojant. Nusodinto mėginio aktyvumas buvo ~ 40% didesnis.
2. Antioksidacinį aktyvumą tikėtina lemia efektyviosios skysčių chromatografijos metodu aptiktos vanilinė, askorbo rūgštys, chlorogeninės rūgšties dariniai, flavonoidas 5,7-dihidroksichromonas bei melaninas. Prenilinti polifenoliai gali lemti antimikrobinį ir priešuždegiminį poveikį, o aldono rūgšties dariniai- prebiotinį veikimą.
3. Dujų chromatografijos metodu aptikti riebalų rūgščių metilo esteriai, šakotas fenolinis junginys, seskviterpenas β-selinenas bei ilgos grandinės alkanai gali prisidėti prie antibakterinio, priešuždegiminio poveikių ar žarnyno veiklos reguliavimo.
4. Visi aukščiau išvardinti bioaktyvūs poveikiai pasiekiami be ūmaus toksiškumo *Artemia sera* lervoms.

Literatūros sąrašas

1. Hyde KD, Xu - J. A review of the polysaccharide, protein and selected nutrient content of *Auricularia*, and their potential pharmacological value. *Mycosphere*. 2019 10(1):579-607. doi:10.5943/mycosphere/10/1/10.
2. Iršėnaitė R, et al. Lietuvos makroskopinių grybų ir kerpių sąvadas taksonai ir mikonimai. Vilnius: Gamtos tyrimų centras. 2024. p. 87–88.
3. Miao J, Regenstein JM, Qiu J, Zhang J, Zhang X, Li H, et al. Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides and its derivatives from *Auricularia*-a review. *Int J Biol Macromol*. 2020 May 1;150:102–13. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.054.
4. Oli AN, Edeh PA, Al-Mosawi RM, Mbachu NA, Al-Dahmoshi HOM, Al-Khafaji NSK, et al. Evaluation of the phytoconstituents of *Auricularia auricula-judae* mushroom and antimicrobial activity of its protein extract. *Eur J Integr Med*. 2020 Sep 1;38:101176. doi:10.1016/J.EUJIM.2020.101176.
5. Ma Y, Wang C, Zhang Q, Peng X, Feng Y, Meng X. The effects of polysaccharides from *Auricularia auricula* (Huaier) in adjuvant anti-gastrointestinal cancer therapy: a systematic review and network meta-analysis. *Pharmacol Res*. 2018 Jun 1;132:80–9. doi:10.1016/j.phrs.2018.04.010.
6. Liu E, Ji Y, Zhang F, Liu B, Meng X. Review on *Auricularia auricula-judae* as a functional food: growth, chemical composition, and biological activities. *J Agric Food Chem*. 2021 Feb 17;69(6):1739–50. doi:10.1021/ACS.JAFC.0C05934.
7. Su Y, Li L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four *auriculariales*. *Carbohydr Polym*. 2020 Feb 1;229:115407. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115407.
8. Zong X, Zhang H, Zhu L, Deehan EC, Fu J, Wang Y, et al. *Auricularia auricula* polysaccharides attenuate obesity in mice through gut commensal *Papillibacter cinnamivorans*. *J Adv Res*. 2023 Oct 1;52:203–18. doi:10.1016/J.JARE.2023.08.003.
9. Kalitukha L, Bleha R, Synytsya A, Kraska J, Sari M. Hydrocolloids from the Mushroom *Auricularia heimuer*: Composition and Properties. *J Fungi* 2023 Jun 16;9(6):681. doi:10.3390/JOF9060681
10. Chen R, Xu J, Wu W, Wen Y, Lu S, El-Seedi HR, et al. Structure–immunomodulatory activity relationships of dietary polysaccharides. *Curr Res Food Sci*. 2022 Jan 1;5:1330–41. doi:10.1016/J.CRFS.2022.08.016
11. Ramos A, Mendoza G, Serrano-Márquez L. Antibacterial and Antifungal Activity and Acute Toxicity of Crude Extracts From the Wild Edible Mushrooms *Cantharellus veraecrucis*, *Cantharellus violaceovinosus*, and *Turbinellus floccosus*. *Int J Food Sci*. 2025 (1):5004650. doi:10.1155/IJFO/5004650.
12. Kutorga E, Prigodina-Lukošienė I. Mikologijos laboratoriniai darbai. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2014. p. 91–92.
13. GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy: *Auricularia* Bull., 1780 in. 2023.
14. Bielli E, Maggiora L. Grybai : išsamus grybų ir jų rinkimo žinynas. Vilnius: Mūsų knyga. 2004. p. 224.
15. Sterry P. Collins complete British mushrooms and toadstools : the essential photograph guide to Britain's fungi. London: Collins. 2009.
16. Б Поленов АБ. Большая энциклопедия грибника : съедобные и несъедобные : собираем и готовим. Москва: АСТ. 2021.
17. GBIF.org. GBIF Occurrence Download. 2025. doi:https://doi.org/10.15468/dl.cvezks
18. Wu F, Tohtirjap A, Fan LF, Zhou LW, Alvarenga RLM, Gibertoni TB, et al. Global diversity and updated phylogeny of *Auricularia* (*Auriculariales*, *Basidiomycota*). *J Fungi*. 2021 Nov 3;7(11):933. doi:10.3390/JOF7110933.

19. Wu F, Yuan Y, Malysheva VF, Du P, Dai YC, Wu F, et al. Species clarification of the most important and cultivated *Auricularia* mushroom “Heimuer”: evidence from morphological and molecular data. *Phytx*. 2014;186(5):241. doi:10.11646/PHYTOTAXA.186.5.1.
20. Regis MAJ, Geösel A. Cultivation of *Auricularia* species: a review of the history, health benefits, principles, practices, environmental conditions, research methods, and recent trends. *Sydowia*. 2024 Dec 1;76:21–33. doi:10.12905/0380.SYDOWIA76-2024-0021
21. Royse DJ, Baars J, Tan Q. Current overview of mushroom production in the world. *Edible and medicinal mushrooms: Technol Appl*. 2017 Aug 14;2. doi:10.1002/9781119149446.CH2.
22. Ling, ZL, et al. Overview of the Chinese edible fungi industry of and developing trends analysis. *Mycosphere* 2025 16.1. doi:10.5943/mycosphere/16/1/17.
23. Chen N, Zhang H, Zong X, Li S, Wang J, Wang Y, et al. Polysaccharides from *Auricularia auricula*: Preparation, structural features and biological activities. *Carbohydr Polym*. 2020 Nov 1;247:116750. doi:10.1016/J.CARBPOL.2020.116750.
24. Yoon SJ, Yu MA, Pyun YR, Hwang JK, Chu DC, Juneja LR, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thromb Res*. 2003 Jan 1;112(3):151–8. doi:10.1016/J.THROMRES.2003.10.022.
25. Berch SM, Ka KH, Park H, Winder R, Berch SM, Ka KH, et al. Development and potential of the cultivated and wild-harvested mushroom industries in the Republic of Korea and British Columbia. *J Ecosyst and Manag*. 2007 Dec 17;8(3):53. doi:10.22230/JEM.2007V8N3A372
26. Barrett MF. Three Common Species of *Auricularia*. *Mycologia*. 1910 Jan;2(1):12–8. doi:10.1080/00275514.1910.12020751.
27. Böhme J. *Signatura rerum, or the signature of all things : shewing the sign, and signification of the severall forms and shapes in the creation*. Ellistone. 1652
28. Sekara A. KA, GA& SM. *Auricularia* spp. – mushrooms as novel food and therapeutic agents - a review. *Sydowia*. 2015;67:1–10.
29. Charles : de L'Ecluse. *Rariorum plantarum historia*. 1601 p. 4–276.
30. Parkinson J. *Theatrum botanicum or, An herball of a large extent*. 1640. p.1320.
31. Harding P. *Mushroom miscellany*. London: Collins; 2008. p. 118–121.
32. Kadnikova IA, Costa R, Kalenik TK, Guruleva ON, Yanguo S. Chemical composition and nutritional value of the mushroom *Auricularia auricula-judae*. *J Food Nutr Res*. 2015;3(8):478–82. doi:10.12691/JFNR-3-8-1,
33. Yamaguchi S, yoshikawa T, ikeda S, ninomiya T. Measurement of the relative taste intensity of some l- α -amino acids and 5'-nucleotides. *J Food Sci*. 1971;36(6):846–9. doi:10.1111/J.1365-2621.1971.TB15541.X.
34. Gąsecka M, Siwulski M, Mleczek M. Evaluation of bioactive compounds content and antioxidant properties of soil-growing and wood-growing edible mushrooms. *J Food Process Preserv*. 2018 Jan 1;42(1):e13386. doi:10.1111/JFPP.13386.
35. Islam T, Ganesan K, Xu B. Insights into health-promoting effects of Jew's ear (*Auricularia auricula-judae*). *Trends Food Sci Technol*. 2021 Aug 1;114:552–69. doi:10.1016/J.TIFS.2021.06.017.
36. Gebreyohannes G, Sbhatu DB. Wild Mushrooms: a hidden treasure of novel bioactive compounds. 2023. doi:10.1155/2023/6694961.
37. Harwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(5):1147–50. doi:10.1042/BST0351147.
38. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc*. 1998;75(2): p. 199–212. doi:10.1007/S11746-998-0032-9.

39. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017 Jan 1;2017(1):8416763. doi:10.1155/2017/8416763.
40. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis C De, Marinari UM, et al. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;:6235641. doi:10.1155/2016/6235641.
41. Rana A, Samtiya M, Dhewa T, Mishra V, Aluko RE. Health benefits of polyphenols: a concise review. *J Food Biochem*. 2022 Oct 1;46(10):e14264. doi:10.1111/JFBC.14264.
42. Mihaylova D, Dimitrova-Dimova M, Popova A. Dietary phenolic compounds—wellbeing and perspective applications. *Int J Mol Sci*. 2024 May 1;25(9):4769. doi:10.3390/IJMS25094769.
43. Parcheta M, Świsłocka R, Orzechowska S, Akimowicz M, Choińska R, Lewandowski W. Recent developments in effective antioxidants: the structure and antioxidant properties. *Materials*. 2021 Apr 15;14(8):1984. doi:10.3390/MA14081984.
44. Ulusu F, Emsen B, Karapinar HS, Uzun Y, Kaya A. HPLC based identification of phenolics and biological activities in *Elaphomyces* mushroom extracts. *Scientific Reports*. 2025 Jul 26;15(1):27182-. doi:10.1038/s41598-025-07036-z.
45. Wang J, Ma Z, Wang C, Chen W. Melanin in *Auricularia auricula*: biosynthesis, production, physicochemical characterization, biological functions, and applications. *Food Sci Biotechnol*. 2024 Mar 8;33(8):1751–8. doi:10.1007/S10068-024-01542-Y.
46. Vetter J. The mushroom glucans: molecules of high biological and medicinal importance. *Foods*. 2023 Mar 1;12(5):1009. doi:10.3390/FOODS12051009.
47. Basso AMM, De Castro RJA, De Castro TB, Guimarães HI, Polez VLP, Carbonero ER, et al. Immunomodulatory activity of β -glucan-containing exopolysaccharides from *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*. 2020 Feb 1;58(2):227–39. doi:10.1093/MMY/MYZ042.
48. Nguyen TL, Wang D, Hu Y, Fan Y, Wang J, Abula S, et al. Immuno-enhancing activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydr Polym*. 2012 Aug 1;89(4) :1117–22. doi:10.1016/J.CARBPOL.2012.03.082.
49. Yang L, Zhao T, Wei H, Zhang M, Zou Y, Mao G, et al. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities in vitro. *Int J Biol Macromol*. 2011 Dec 1;49(5):1124–30. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2011.09.
50. Baktemur G, Çelik ZD, Kara E, Taşkın H. The effect of different agricultural wastes on aroma composition of shiitake (*lentinula edodes* (berk.) pegler) mushroom. *TURJAF*. 2020 Aug 1;8(7):1540–47. doi:10.24925/TURJAF.V8I7.1540-1547.3415.
51. Feng K, Zuo R, Chu T, Zhao Q, Li J, Liu L, et al. Comprehensive investigation on non-volatile and volatile compounds in *Auricularia auricula* from different regions by UPLC-MS/MS-based metabolomics and GC-IMS. *LWT*. 2024 May 1;199:116110. doi:10.1016/J.LWT.2024.116110
52. El Sheikha AF, Hu DM. How to trace the geographic origin of mushrooms? *Trends Food Sci Technol*. 2018 Aug 1;78:292–303. doi:10.1016/J.TIFS.2018.06.008.
53. Elkhateeb W, Daba G, Sheir D, El-Dein A, Fayad W, Elmahdy El, et al. GC-MS analysis and in-vitro hypocholesterolemic, anti-rotavirus, anti-human colon carcinoma activities of the crude extract of a Japanese *Ganoderma* spp. *Egypt Pharm J*. 2019 Apr 1;18(2):102–10. doi:10.4103/epj.epj_50_18.
54. Gene-Morales J, Juelas A, Saez-Berlanga A, Martin EG, Garrigues-Pelufo L, Sandoval-Camargo BS, et al. Dietary nucleotides enhance neurogenesis, cognitive capacity, muscle function, and body composition in older adults: a randomized, triple-blind, controlled clinical trial. *Nutrients*. 2025 Apr 24;17(9):1431. doi:10.3390/NU17091431.

55. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982;45(1):31–4. doi:10.1055/S-2007-971236/BIB.
56. N EN, Domínguez-Martín EM, Roberto A, Tavares J, Isca VMS, Pereira P, et al. *Artemia* species: an Important Tool to Screen General Toxicity Samples. *Curr Pharm Des.* 2020 Apr 6;26(24):2892–908. doi:10.2174/1381612826666200406083035.
57. Wong FC, Chai TT, Tan SL, Yong AL. Evaluation of bioactivities and phenolic content of selected edible mushrooms in malaysia. *Trop J Pharm Res.* 2013 Dec;12(6):1011–6. doi:10.4314/TJPR.V12I6.21
58. Liang N, Kitts DD. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules.* 2014 Nov 19;19(11):19180–208. doi:10.3390/MOLECULES191119180.
59. Elkhateeb WA, El-Hagrassi AM, Fayad W, El-Manawaty MA, Zaghlol GM, Daba GM, et al. Cytotoxicity and hypoglycemic effect of the japanese jelly mushroom *Auricularia auricula-judae*. *Chem Res J.* 2018;3(4):123–33.
60. Fu L, Yang G, Liu L, Ma Y, Zhang X, Zhang X, et al. Analysis of volatile components of *Auricularia auricula* from different origins by GC-MS combined with electronic nose. *J Food Qual.* 2020 Jan 1;2020(1):8858093. doi:10.1155/2020/8858093.
61. Methyl Oleate | C19H36O2 | CID 5364509 – PubChem.
62. Padmini N, Rashiya N, Sivakumar N, Kannan ND, Manjuladevi R, Rajasekar P, et al. In vitro and in vivo efficacy of methyl oleate and palmitic acid against ESBL producing MDR *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog.* 2020 Nov 1;148:104446. doi:10.1016/J.MICPATH.2020.104446.
63. Tan RY, Ilham Z, Wan-Mohtar WAAQI, Abdul Halim-Lim S, Ahmad Usulidin SR, Ahmad R, et al. Mushroom oils: a review of their production, composition, and potential applications. *Heliyon.* 2024 Jun 15;10(11):e31594. doi:10.1016/J.HELİYON.2024.E31594.
64. Methyl Palmitate | C17H34O2 | CID 8181 - Pubchem
65. Saeed NM, El-Demerdash E, Abdel-Rahman HM, Algandaby MM, Al-Abbasi FA, Abdel-Naim AB. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012 Oct 1;264(1):84–93. doi:10.1016/j.taap.2012.07.020.
66. Hamed A, Mantawy E, El-Bakly W, Abdel-Mottaleb Y, Azab S. Methyl Palmitate: the naturally occurring cardioprotective agent. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University.* 2020 Jul 10;0(0):47–62. doi:10.21608/aps.2020.2003.1026
67. Lee RHC, Couto e Silva A, Possoit HLE, Lerner FM, Chen PY, Azizbayeva R, et al. Palmitic acid methyl ester is a novel neuroprotective agent against cardiac arrest. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2019 Aug 1;147:6–14. doi:10.1016/j.plefa.2018.11.
68. Mkhize SS, Cedric Simelane MB, Mongalo IN, Poee OJ. The effect of supplementing mushroom growing substrates on the bioactive compounds, antimicrobial activity, and antioxidant activity of *pleurotus ostreatus*. *Biochem Res Int.* 2022 Jan 1;(1):9436614. doi:10.1155/2022/9436614
69. Saïdana D, Mahjoub MA, Boussaada O, Chriaa J, Chéraif I, Daami M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). *Microbiol Res.* 2008 Jul 15;163(4):445–55. doi:10.1016/j.micres.2006.07.009.
70. Bhat MP, Kumar RS, Chakraborty B, Nagarajaa SK, Nayaka S. Eicosane: An antifungal compound derived from *streptomyces* sp. kf15 exhibits inhibitory potential against major phytopathogenic fungi of crops. *Environ Res.* 2024 Jun 15;251:118666. doi:10.2139/SSRN.4698423.

71. Wu ZK, Li HY, Zhu YL, Xiong MQ, Zhong JX. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of eicosane on glutamate and NMDA-induced retinal ganglion cell injury. *Int J Ophthalmol.* 2024 Apr 18;17(4):638. doi:10.18240/IJO.2024.04.05.
72. Xu C cong, Li Q lu, Wang N, Liu D kun, Guo C xiao. Identifying and discriminating aroma attribute and bioactive components of five commercial essential oils of celery (*Apium graveolens* L.) seeds using E-nose, HS-GC-IMS, and GC-MS. *LWT.* 2023 Jul 15;184:115094. doi:10.1016/J.LWT.2023.115094.
73. Kondić D, Čerenak A, Košir IJ, Ocvirk M, Krmpot T, Đurić G. Morphological and biochemical characterization of Wild hop (*Humulus lupulus* L.) populations from Banja Luka area (Bosnia and Herzegovina). *Agronomy* 2021, 2021 Jan 28;11(2):239. doi:10.3390/AGRONOMY11020239
74. Costa R, De Grazia S, Grasso E, Trozzi A. Headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography as analytical methodology for the determination of volatiles in wild mushrooms and evaluation of modifications occurring during storage. *J Anal Methods Chem.* 2015 Jan 1;2015(1):951748. doi:10.1155/2015/951748
75. Chandra M, Prakash O, Kumar R, Bachheti RK, Bhushan B, Kumar M, et al. β -Selinene-Rich essential oils from the parts of *Callicarpa macrophylla* and their antioxidant and pharmacological activities. *Medicines.* 2017 Jul 10;4(3):52. doi:10.3390/MEDICINES4030052.
76. Noël A, Dumas C, Rottier E, Beslay D, Costagliola G, Ginies C, et al. Identification of five volatile organic compounds that trigger hygienic and recapping behaviours in the honey bee (*Apis mellifera*). *Int J Parasitol.* 2025 Jun 1;55(7):351–63. doi:10.1016/J.IJPARA.2025.01.009.
77. Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG. Constituents of cannabis sativa L. xvii. a review of the natural constituents. *J Nat Prod.* 1980;43(2):169–234. doi:10.1021/NP50008A001.
78. Hamad D, El-Sayed H, Ahmed W, Sonbol H, Ramadan MAH. GC-MS Analysis of potentially volatile compounds of *Pleurotus ostreatus* polar extract: in vitro antimicrobial, cytotoxic, immunomodulatory, and antioxidant activities. *Front Microbiol.* 2022 Feb 18;13:834525. doi:10.3389/fmicb.2022.834525
79. Koizumi H, Yamanaka K, Ohkawara A. Effect of hexadecane on protein kinase C of pig epidermis. *Arch Dermatol Res.* 1987 Aug;279(6):402–5. doi:10.1007/BF00412627.
80. Owusu S, Cunliffe WJ, Wood EJ. Effect of hexadecane on piglet epidermal ornithine decarboxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Jun 30;161(3):1291–8. doi:10.1016/0006-291X(89)91383-1.
81. Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem.* 2013 Dec 1;70:165–88. doi:10.1016/J.EJMECH.2013.09.050.
82. Shan X, Yao F, Lu L, Ma X, Fang M, Liu W, et al. Comparative metabolomics reveals the adaptive strategy of white *Auricularia cornea* to bamboo substrate variation. *Journal of Fungi.* 2026 Feb 1;12(2):140. doi:10.3390/JOF12020140/S1
83. Islam T, Yu X, Xu B. Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *Food Sci and Technol.* 2016 Oct 1;72:423–31. doi:10.1016/J.LWT.2016.05.005
84. Altamura MR, Andreotti RE, Bazinet ML, Long L. Pyroglutamyl dipeptides in mushroom, *agaricus campestris*. *J Food Sci.* 1970 Mar 1;35(2):134–9. doi:10.1111/J.1365-2621.1970.TB12122.X
85. Swislocka R, Kowalczyk N, Dabrowska A, Choinska R, Lewandowski W, Swiderski G. Spectroscopic, antioxidant and cytotoxicity studies of vanillic acids. *Scientific Reports.* 2025 Aug 26;15(1):31396-. doi:10.1038/s41598-025-13965-6

86. Kwon J, Hiep NT, Kim DW, Hong S, Guo Y, Hwang BY, et al. Chemical constituents isolated from the root bark of *Cudrania tricuspidata* and their potential neuroprotective effects. *J Nat Prod*. 2016 Aug 26;79(8):1938–51. doi:10.1021/ACS.JNATPROD.6B00204.
87. Jo YH, Kim SB, Liu Q, Lee JW, Hwang BY, Lee MK. Benzylated and prenylated flavonoids from the root barks of *Cudrania tricuspidata* with pancreatic lipase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015 Sep 1;25(17):3455–7. doi:10.1016/J.BMCL.2015.07.017.
88. Wangkheirakpam SD, Joshi DD, Leishangthem GD, Biswas D, Deb L. Hepatoprotective effect of *auricularia delicata* (Agaricomycetes) from India in rats: biochemical and histopathological studies and antimicrobial activity. *Int J Med Mushrooms*. 2018;20(3):213–25. doi:10.1615/INTJMEDMUSHROOMS.2018025886.
89. de Oliveira Costa G, Mansur Pontes CL, Parize AL, Sandjo LP. Unveiling chemical responses in the kombucha-based fermentation of black tea, banana flower, and grape juice: LC-ESIMS, GNPS, MS-DIAL, and MS-FINDER-assisted chemical characterization. *Food Funct*. 2024 Mar 4;15(5):2497–523. doi:10.1039/D3FO04977A.
90. Bieringer E, García Vázquez U, Klein L, Moretó Bravo N, Tobler M, Weuster-Botz D. Bioproduction and applications of aldobionic acids with a focus on maltobionic and cellobionic acid. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2023 Jul 1;46(7):921. doi:10.1007/S00449-023-02872-7.
91. Cuevas-Juárez E, Yurjar-Arredondo KY, Pío-León JF, Montes-Avila J, López-Angulo G, Páz Díaz-Camacho S, et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *J Funct Foods*. 2014 Jul 1;9(1):78–88. doi:10.1016/J.JFF.2014.04.016
92. Menichetti A, Mordini D, Montalti M. Melanin as a Photothermal Agent in Antimicrobial Systems. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol 25, Page 8975. 2024 Aug 18;25(16):8975. doi:10.3390/IJMS25168975.
93. Hou R, Liu X, Yan J, Xiang K, Wu X, Lin W, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice. *Food Funct*. 2019 Feb 20;10(2):1017–27. doi:10.1039/C8FO01624K.
94. Hou R, Liu X, Wu X, Zheng M, Fu J. Therapeutic effect of natural melanin from edible fungus *Auricularia auricula* on alcohol-induced liver damage in vitro and in vivo. *Food Science and Human Wellness*. 2021 Jul 1;10(4):514–22. doi:10.1016/J.FSHW.2021.04.014
95. Sato K, Egashira Y, Ono S, Mochizuki S, Shimmura Y, Suzuki Y, et al. Identification of a Hepatoprotective Peptide in Wheat Gluten Hydrolysate against d-Galactosamine-Induced Acute Hepatitis in Rats. *J Agric Food Chem*. 2013 Jul 3;61(26):6304–10. doi:10.1021/JF400914E.
96. Islam T, Yao F, Kang W, Lu L, Xu B. A systematic study on mycochemical profiles, antioxidant, and anti-inflammatory activities of 30 varieties of Jew's ear (*Auricularia auricula-judae*). *Food Sci and Hum Wellness*. 2022 Jul 1;11(4):781–94. doi:10.1016/J.FSHW.2022.03.005
97. Xu X, Liu A, Hu S, Ares I, Martínez-Larrañaga MR, Wang X, et al. Synthetic phenolic antioxidants: metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chem*. 2021 Aug 15;353:129488. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.129488.
98. Xu B. Distribution of antioxidant activities and total phenolic content from 20 mushrooms. *Austin J Nutr and Food Sci*.
99. Chiu WC, Yang HH, Chiang SC, Chou YX, Yang HT. *Auricularia polytricha* aqueous extract supplementation decreases hepatic lipid accumulation and improves antioxidative status in animal model of nonalcoholic fatty liver. *Biomedicine (Taipei)*. 2014 Jun 1;4(2):12. doi:10.7603/S40681-014-0012-3.

Priedai

Priedas Nr, 1: Grybo rūši patvirtinantis sertifikatas

Marzampol data *21-01-2026*

JAMARA KURKIEWICZ
UL. MIEKOWSKIEGO 21143A
32-345 KRAKÓW
(imė i naševski nazovs, firmos i adreso
podmioto (pavedzajusio drosolėstės)
w zaklėsse prėzėbstėstėse lub skėpėse (grybėse))

ATEST NA GRZYBY SUSZONE Nr *115M/2026*

Na podstawie § 5 ust. 2 rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 maja 2011 r. w sprawie grzybów dopuszczonych do obrotu lub produkcji przetworów grzybowych, środków spożywczych zawierających grzyby oraz uprawnień klasyfikatora grzybów i grzyboznawcy (Dz. U. z 2023 r. poz. 2237) w wyniku oceny przeprowadzonej w dniu *21-01-2026*

stwierdzam, że dostarczone do oceny grzyby suszone w ilości *2* *dm³/kg*)
(słownie: *dwa kilogramy* *zbiór (VALVARIA FEBRIFERUSCULA)*)
z gatunku *ASZAK BŻOWY (AURICULARIA - 14DAE)*
w postaci całych owocników, kapeluszy, krojanki* (*AURICULARIA*)
w opakowaniu *zbiórczym/jednostkowym**,
bez domieszki innych gatunków grzybów,
bez zapleśnienia, zacierwienia wtórnego i rozkruska,
zawartość wody *0 Normie*.

pod względem przynależności gatunkowej, cech organoleptycznych i oceny sanitarnej nie budzą zastrzeżeń i nadają się do obrotu.

Grzyby przeznaczone do sprzedaży konsumentowi finalnemu muszą być umieszczone w opakowaniach jednostkowych i oznakowane następującymi informacjami: gatunek grzybów, nr atestu, rok zbioru.

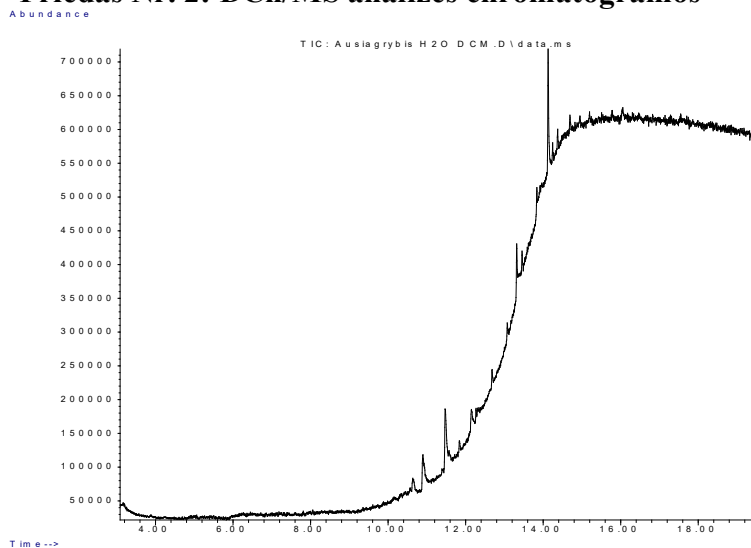
Atest obejmuje partię badaną.

Sylwester Murawski
(pieczęćka i podpis grzyboznawcy)

Sylwester Murawski
Grzyboznawca nr 2458
Mariampol 16, 26-903 Głowaczów
tel.: 602 304 333

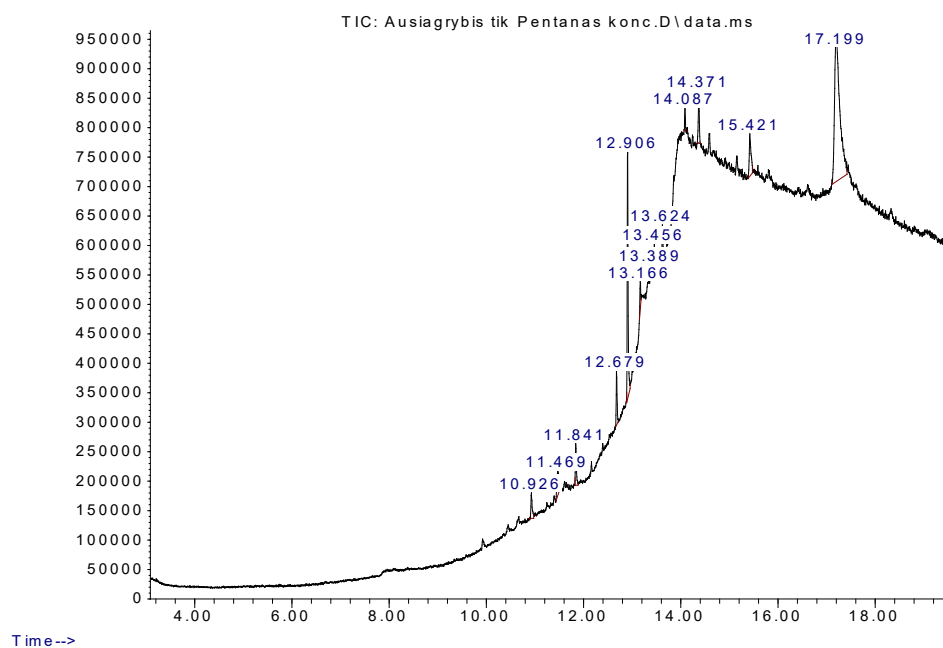
* Wybrać z listy

Priedas Nr. 2: DCh/MS analizės chromatogramos



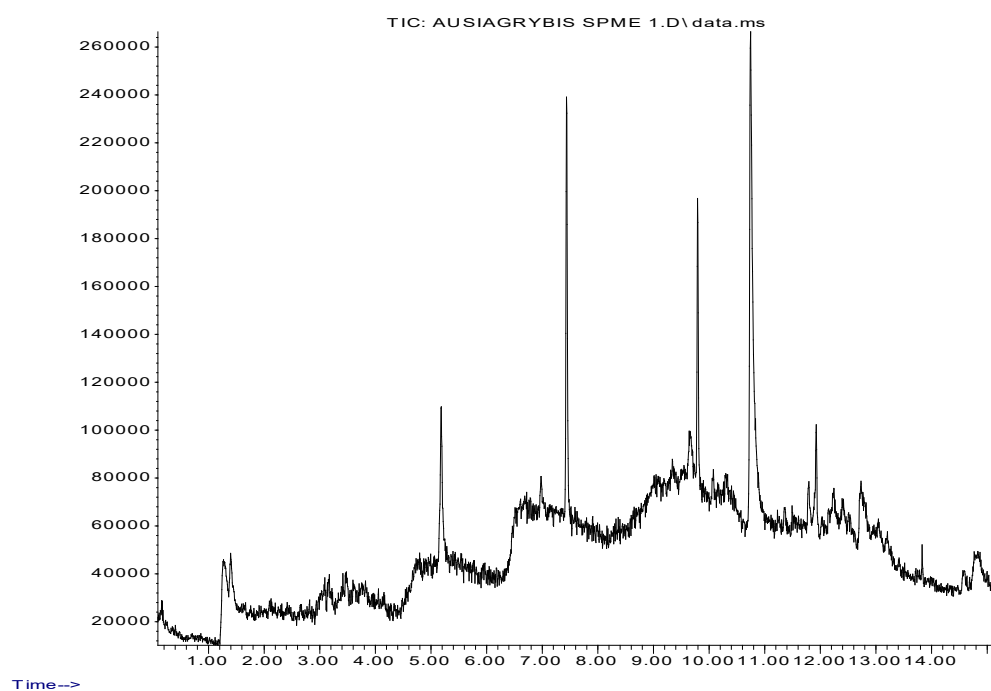
pav. 25 Vandens: dichlormetano: metanolio (Nr. 7) ekstrakto chromatograma

Abundance



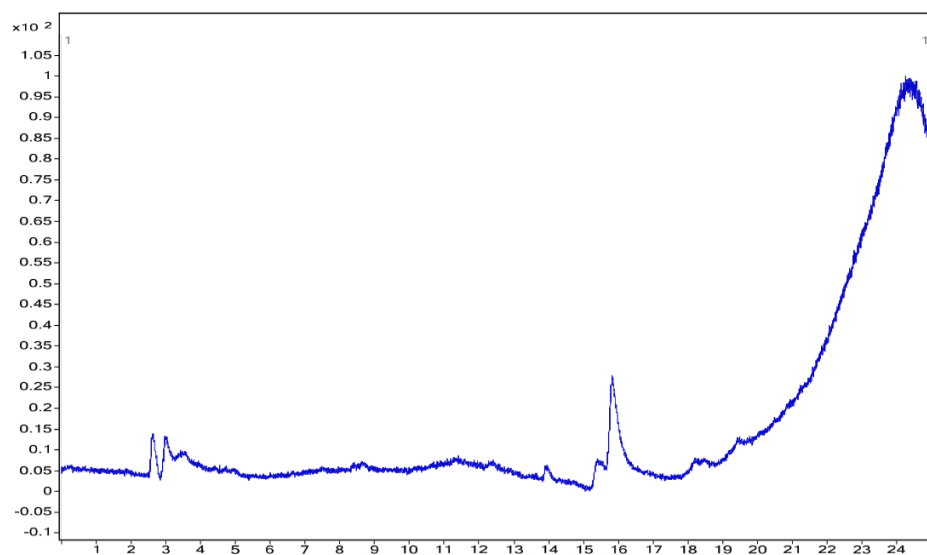
pav. 26 Heksano ekstrakto (Nr.8) chromatograma

Abundance

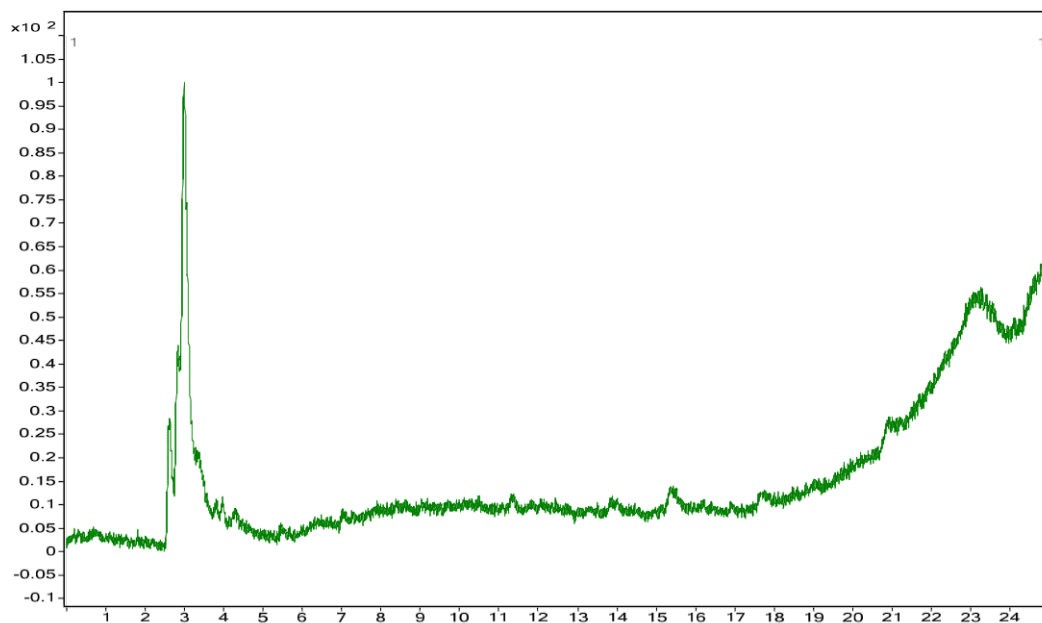


pav. 27 Kietafazės mikroekstrakcijos ("Splitless" režimu) chromatograma

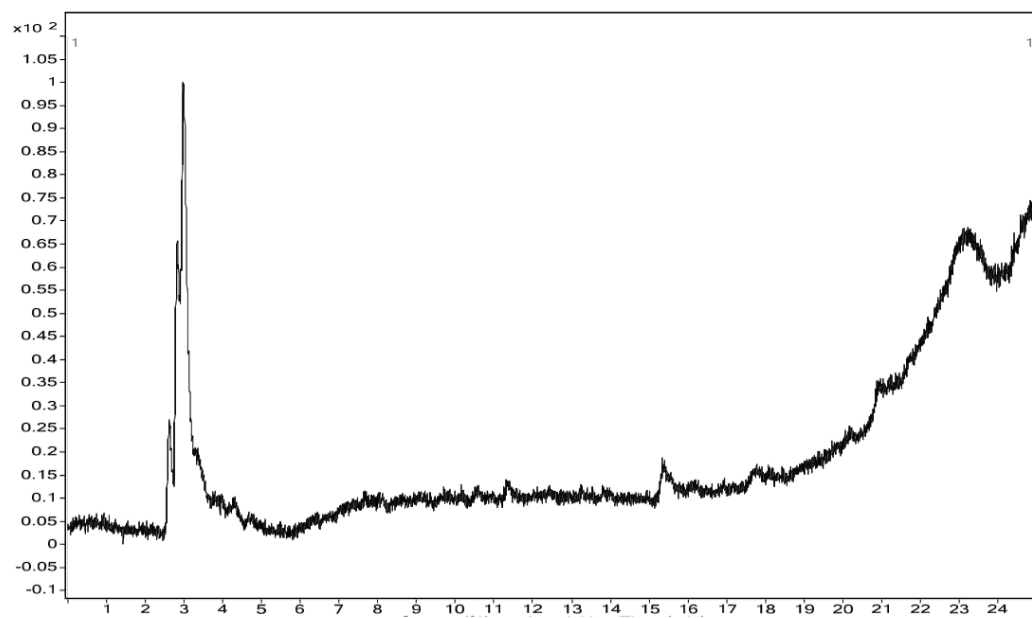
Priedas Nr. 2: ESCh/DMD/ToF analizės chromatogramos



pav. 28 3g grybo ekstrakto ESI⁺ chromatograma



pav. 29 3g grybo ekstrakto ESI⁻ chromatograma



pav. 30 2 g grybo ekstrakto ESI⁺ chromatograma