View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Electronic Archive of Kyiv Polytechnic Institute

УДК 582.998:57.086.83 + 663.18:579

А.С. Крвавич, Р.О. Петріна, В.П. Новіков
Національний університет "Львівська політехніка", Львів, Україна

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ІЗ КАЛУСНОЇ КУЛЬТУРИ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

Background. The widespread use of medicinal plants (MP) for production of biologically active substances is leading to their sharp reduction in their nature. Some of them are rare and endangered species, many plants reduced their long area of growth. One of the actual directions of biotechnology is to obtain the secondary metabolites from plant cells cultured *in vitro*. The development of biotechnology is based on the study of regularities of callusogenesis and accumulation of secondary metabolites in cell cultures. In this regard, the cultivation of tissues and cells of higher plants *in vitro* for their industrial use for producing bioactive compounds (BAC) and preserve the gene pool determines the relevance of this study.
Objective. The aim of the work is to study of cultivation conditions and development of technology for production of BAC from the callus mass of MP.
Methods. The biotechnological, physical and chemical methods have been used.
Results. The scheme of sterilization of seeds with the highest emergence of the aseptic explants (93 %) and the optimum conditions of process (the medium Murasihe and Skoog, growth regulators, light and temperature regimes have selected for cultivation) has been chosen.
Conclusions. We proposed optimized cultivation conditions and technological scheme for obtaining the BAC from callus mass of *Gladiolus imbricatus,* which allows to obtain the complex of BAC as an extract of plant cell culture.
Keywords: secondary metabolites; callus mass; *Gladiolus imbricatus*; cultivation; production.

Вступ

Дослідження лікарської рослинної сировини (ЛРС), її хімічного складу та способу одержання сполук вторинного метаболізму на основі культивування *in vitro* клітин рослин залишається актуальним питанням сучасної фітохімії. Важливим при одержанні клітинних культур, суперпродуцентів вторинних метаболітів, є оптимізація умов культивування [1]. У сучасних економічних умовах, які є малопрогнозованими і, як наслідок, несприятливими для діяльності інноваційних підприємств, необхідно звернути особливу увагу на прогресивні біотехнології, які б забезпечили ефективне і, відповідно, прибуткове функціонування підприємства за мінімальних витрат [2].

Особливу увагу привертають лікарські рослини (ЛР), які занесені до Червоної книги України, оскільки їх унікальний хімічний склад є цінним джерелом біологічно активних сполук (БАР). До таких ЛР належать: косарики черепитчасті (*Gladiolus imbricatus*), тирлич жовтий (*Gentiana lutea*), відкасник безстебловий (*Carlina acaulis*) та ін. Ці рослини мають широкий спектр фармакологічної активності. Застосовуючи метод культури клітин і тканин, можна забезпечити збереження виду й отримати велику кількість калусної маси [3, 4].

На сьогодні біотехнологічні методи культивування рослин в умовах *in vitro* використовуються досить часто; вони дають високі результати завдяки своїй економічності, швидкості утворення потрібного матеріалу та можливості контролювати кожен з етапів. Клітини рослин, на відміну від вирощування рослин у відкритому ґрунті, де вони часто зазнають неконтрольованого впливу біотичних і абіотичних факторів навколишнього середовища, можна культивувати в контрольованих умовах на поживному середовищі певного складу. Культивування клітин рослин у ферментерах забезпечує постійне одержання свіжого матеріалу впродовж року незалежно від кліматичних і сезонних змін [5–8].

Для підвищення продуктивності культивованих клітин широко і в багатьох випадках успішно застосовують:

- клітинну селекцію;
- оптимізацію умов вирощування складу поживних і продукційних середовищ;
- інтенсифікацію процесів біосинтезу за рахунок удосконалення конструкцій біореакторів;
- культивування диференційованих культур, клітин чи індукцію диференціювання;
- еліситори.

Культивування клітинних культур має низку специфічних вимог до зовнішнього оточення, і це вимагає розробки апаратів, що забезпечують високий рівень асептичності, відсутність бульбашкової газової фази, формування розвиненої поверхні носіїв іммобілізованої клітинної маси та створення регульованих гідродинамічних умов культуральної рідини [9].

Постановка задачі

Попередньо нами було визначено якісний і кількісний склад екстрактів досліджуваних рослин та екстрактів одержаної біомаси [10–12]. Було встановлено, що одержана калусна маса є цінним альтернативним джерелом вторинних метаболітів. Метою цієї роботи є визначення основних параметрів умов культивування та розробка принципової технологічної схеми процесу культивування в умовах *in vitro* ЛР Українських Карпат, які занесені до Червоної книги України, а саме косариків черепитчастих *(Gladiolus imbricatus)* за різних параметрів процесу.

Матеріали і методи

Вивчення процесу починали з дослідження певних технологічних параметрів культивування (температура, освітленість, інтенсивність перемішування, склад середовища, pH тощо), які лежать в основі розробки раціональної біотехнології більшості методів вирощування культури клітин в умовах *in vitro*.

Поживне середовище (ПС) – основний фактор культивування ЛР, який впливає на калусоутворення. Основою усіх живильних середовищ є мінеральні солі, необхідні рослині: макроелементи – N, P, K, Ca, Mg; мікроелементи – B, Mn, Zn, Cu, Co, Mo, I, Fe. Важливим фактором, що регулює диференціацію і морфогенез ізольованих тканин, є наявність у ПС регуляторів росту – ауксинів, цитокінінів, гіберилінів. Культивування проводили на середовищі Мурасіге і Скуга (МС) з додаванням регуляторів росту: 0,5 мг/л кінетину, 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) і 3 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК).

Процес культивування ведуть доти, доки триває інтенсивний синтез цільового продукту і доки не будуть вичерпані поживні речовини середовища. При визначенні кінця культивування необхідно враховувати дані мікроскопічного контролю стану культури, відсутність сторонньої мікрофлори, концентрацію основних поживних речовин, pH ПС, біомаси тощо (рис. 1).

Результати і їх обговорення

Технологічні схеми етапів одержання калусної культури ЛР наведено на рис. 2–4.

Приготування посівного матеріалу (ПМ) та поживних середовищ (рис. 2). Калусну масу ЛР вирощують і зберігають у лабораторних умовах. Посівний матеріал (ПМ) вирощують у три стадії.

У малий інокулятор І-1 завантажують дистильовану воду, розчин макросолей. В оболонку апарата подають глуху пару. Апарат герметизують. Суміш, перемішуючи, нагрівають до 120–125 °С. З метою стерилізації її витримують 30 хв. У простерилізований апарат, що містить стерильне ПС макросолей, додають стерильні розчини мікросолей і вітамінів та гормонів. В оболонку подають охолоджувальну (зворотну) воду, за рахунок чого стерильне ПС охолоджують до температури ферментації 26 °С. Після досягнення відповідної температури апарат з'єднують з атмосферою через індивідуальний фільтр. Через спиртовий пальник із чашок Петрі в апарат переносять лабораторну калусну масу ЛР. Подають стерильне аераційне повітря і проводять інокуляцію продуцента. Готовий інокулят стерильним повітрям перетискають з І-1 у середній інокулятор І-2, у якому вже міститься стерильне ПС І, ПС ІІ та ПС ІІІ. Далі проводять аналогічний ферментаційний процес.

Для великого інокулятора І-3 ПС І готують в окремому реакторі-змішувачі РЗ-1. Гаряче ПС спрямовують у змійовик-витримувач, у якому власне відбувається стерилізація ПС. Далі гаряче стерильне середовище проходить крізь холодильник типу "труба в трубі", охолоджується до температури ферментації 26 °С і надходить у попередньо простерилізований великий інокулятор І-3. Додають ПС ІІ та ПС ІІІ, апарат засівають ПМ з І-2. Проводять аналогічні операції і готовий інокулят перетискають у ферментер Ф-1 для проведення робочої ферментації. Цикл приготування ПМ становить 384 год.

Приготування ПС ІІ і ПС ІІІ. Приготування ПС ІІ і ПС ІІІ для інокуляції та робочої ферментації проводять паралельно з вирощуванням ПМ в інокуляторах. У реактор РЗ-3 заванта-

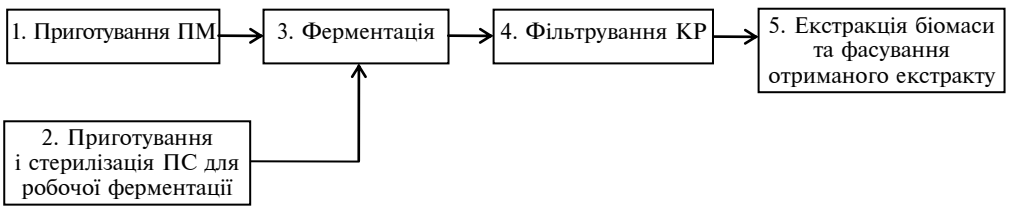

Рис. 1. Схема технологічних стадій

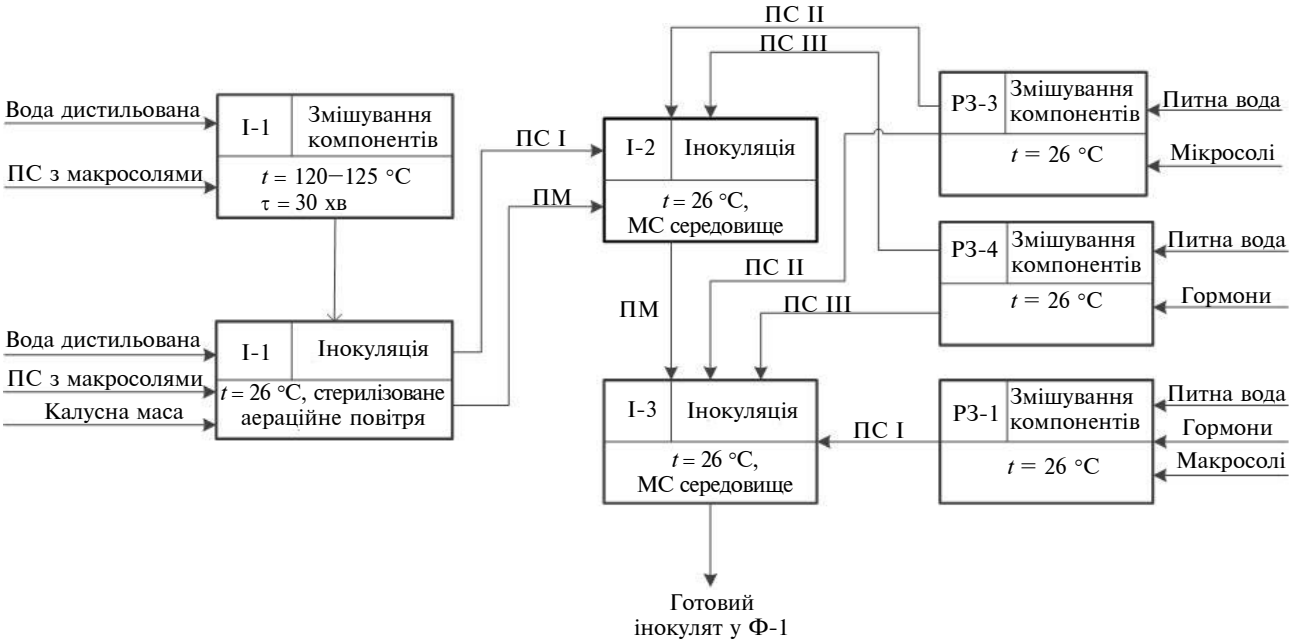

Рис. 2. Приготування ПМ і ПС I, II, III для робочої ферментації

жують питну воду, додають вручну поживні мікросолі. Розчиняють інгредієнти, перемішуючи розчин. Розчин повітряно-мембранним насосом подається в ємність через блок мікрофільтрування. Стерильне ПС II насосом подається у відділення чистої культури і робочий ферментер Ф-1. ПС III готується аналогічно у РЗ-4 і надходить у інокулятори і ферментер Ф-1.

Етап культивування (рис. 3).

Для робочої ферментації ПС I готують у реакторі-змішувачі РЗ-2.

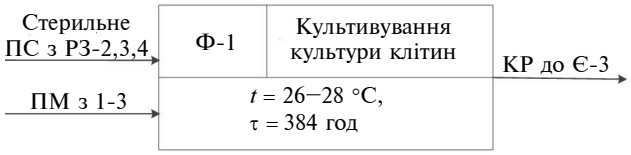

Рис. 3. Культивування

Культивування культури клітин ЛР здійснюється в реакторі Ф-1 об'ємом 80 м^3 при t = 26–28 °C, τ = 384 год, з коефіцієнтом заповнення апарата K = 0,7. Він має корпус у вигляді циліндричної обичайки, всередині якої на валу обертається касета. В порожнині касети містяться носії іммобілізованих клітин, наприклад нерегулярні насадки – кільця Рашига.

Насадки засипаються між стінками касети так, що забезпечується нерухомість носіїв моношару клітин, і це унеможливлює механічне ушкодження біомаси. При культивуванні під час обертання касети ПС повільно перетікає через поверхню носіїв іммобілізованих клітин, що містяться в касеті. Аерація іммобілізованого клітинного шару забезпечується за рахунок дифузії кисню повітря з газової фази в рідину та під час занурення шару насадки у КР.

Частота занурення у КР та перебування частини касети у газовій фазі регулюється швидкістю обертання вала і є регульованим параметром культивування, що визначає оптимальний рівень гідродинамічного стану КР.

Таке технічне рішення ферментера виключає прямий контакт клітин із бульбашками газової фази та контакт клітин моношару з потоками від перемішувального пристрою і аераційною газовою фазою, що дає змогу сформувати моношар клітин із концентрацію клітин 10^6–10^8.

Фільтрування КР і одержання екстракту (рис. 4). З буферної ємності Є-3 насосом КР спрямовують на фільтрування у барабанний вакуум-фільтр закритого типу. Фільтр споряджений двома буферами. Один із них працює під вакуумом і в ньому накопичується фільтрат, а другий перебуває під атмосферним тиском і з нього накопичений фільтрат дренується в каналізацію. Буфери працюють попеременно. Одержана біомаса накопичується в бункері Є-4. З бункера Є-4 волога біомаса за допомогою гвинтового живлювача спрямовується в екстрактор Є-6.

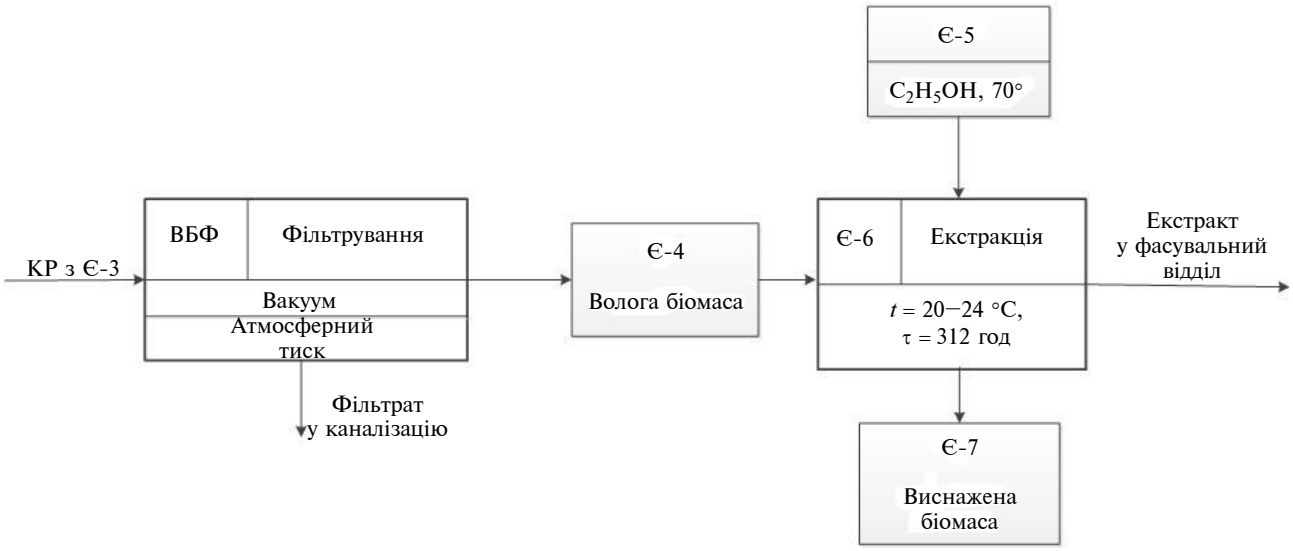

Рис. 4. Фільтрування КР і одержання екстракту

Після завантаження біомаси в екстрактор насосом з ємності Є-5 подають розбавлений етанол. Екстрагент, що просочується крізь шар біомаси у фільтраційному екстракторі Є-6, періодично необхідно повертати з Є-6 за допомогою насоса. Екстракт зливають у ємність Є-6. Отримані екстракти вивантажують у відкриту ємність Є-7, встановлену на пересувний транспортний засіб, за допомогою якого виснажену і промиту біомасу транспортують на звалище. Насосом екстракт перекачують у фасувальне відділення.

Висновки

У біотехнології відомі способи одержання біомаси калусних тканин деяких лікарських рослин – продуцентів БАР: ломиносу виноградолистого *(Clematis vitalba)*, женьшеню *(Panax zingiberensis)*, діоскореї *(Dioscorea)*, княжика сибірського (*Clematis alpina*), гінкго дволопатевого (*Ginkgo biloba*), плюща (*Hedera helix*), полісцеаса кущового (*Polyscias fruticosa*) та ін. Проте для кожного виду рослин біотехнологія отримання калусної маси є унікальною. Нами розроблена технологія культивування в умовах *in vitro* калусної культури дикорослого виду *Gladiolus imbricatus*. Ця технологія допоможе у вирішенні таких важливих питань, як збереження генофонду рослин, поповнення сировинної бази для фармацевтичної, харчової, косметологічної та інших галузей промисловості, оскільки відомо, що ця рослина занесена до Червоної книги України, а її біомаса є джерелом цінних БАР.

За базову взята технологія з використанням штаму клітин женьшеню R1, який вирощують на рідкому середовищі, яке забезпечує оптимальні умови культивування, що підтверджено економічними розрахунками [13].

Відомі розроблені методи для клонального мікророзмноження косариків черепитчастих (*Gladiolus imbricatus*) [14], однак про дослідження умов культивування з метою одержання максимального приросту калусу раніше не повідомлялося. Нами вперше експериментально розроблено умови вирощування та екстракції біомаси косариків черепитчастих (*Gladiolus imbricatus*) за різних параметрів процесу. З урахуванням результатів експериментальних досліджень було визначено оптимальний умови культивування: встановлено склад ПС, концентрацію фітогормонів, стерилізуючі агенти та інші умови, які дають можливість отримати максимальний приріст біомаси.

Базуючись на даних, отриманих у лабораторних умовах, встановлено, що для промислового культивування доцільно використовувати глибинний, аеробний, напівбезперервний метод вирощування біомаси, оскільки він дає змогу одержати екстракт з культури клітин рослин з максимальним вмістом комплексу БАР.

Запропонований спосіб аерації через дифузію кисню повітря з газовою фазою в рідину дає змогу зменшити механічне пошкодження біомаси.

Також нами замість перколяції запропонований метод фільтраційної екстракції, який дає можливість використовувати в процесі екстракції більш тонко подрібнену сировину, різ-

ко зменшити час екстракції, підвищити вихід діючих речовин і отримати висококонцентровані витяжки.

Розроблена технологічна схема одержання БАР з біомаси калусної культури ЛР – контрольована і автоматизована, що забезпечує вихід якісного продукту.

Наступним кроком буде на основі представленої технологічної схеми провести розрахунок економічної доцільності виробництва. З одержаної таким способом біомаси, яка містить низку цінних БАР, на промисловій основі можна виробляти продукт для харчової, фармацевтичної, косметичної, хімічної та інших галузей промисловості. Наведений спосіб дає можливість одержання продукту незалежно від клімату, сезону, погоди, ґрунтових умов.

Список літератури

1. *Wu J., Zhong J.* Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects // J. Biotechnol. – 1999. – **68**. – P. 89–99.
2. *Костюк Р.В.* Розвиток інноваційної діяльності біотехнологічних підприємств у сучасних умовах // Актуальні проблеми економіки. – 2009. – № 8 (98). – С. 79–84.
3. *George E.F.* Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: the Technology. – Edington: Exegetics Ltd., 1993. – 574 p.
4. *Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В.* Технология микроклонального розмножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 228 с.
5. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
6. *Кунах В.А., Можилевская Л.П., Губарь С.И.* Особенности получения и изменчивость суспензионных культур и клеточных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina in vitro* // Биотехнология. – 2001. – № 4. – С. 9–21.
7. *Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко В.О.* Основи біотехнології рослин. – К.: [б. в.], 2000. – 247 с.
8. *Сидоров В.А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция. – К.: Наук. думка,1990. – 280 с.
9. *Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П.* Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування: Навч. посібник. – Львів: Інтелект-Захід, 2008. – 736 с.
10. *Phytochemical* research of plant extracts and use *in vitro* culture in order to preserve rare wild species *Gladiolus imbricatus* / A.S. Krvavych, R.T. Konechna, R.O. Petrina et al. // Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. – 2014. – **5**, № 1. – P. 240–246.
11. *Введення* в культуру *in vitro* відкасника безстеблевого / Р.О. Петріна, Р.Т. Конечна, О.Р. Побігушка, С.О. Матвійків // Вісник НУ "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2013. – № 787. – С.169–172.
12. *Крвавич А.С., Конечна Р.Т., Новіков В.П.* Вивчення біологічно активних речовин косариків черепитчастих *(Gladiolus imbricatus*) // Вісник НУ "Львівська політехніка". Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2014. – № 787. – С. 217–220.
13. *Способ* выращивания биомассы женьшеня: Пат. 2101934 Рос. Фед., МПК А 01 Н 4/00, С 12 N 5/00 / Ю.В. Кольцов, В.Н. Королев, С.А. Кусакин, В.Г. Золотарев. – Заявлено 21.11.1995; Опубл. 20.01.1998.
14. *Rakosy-Tican E., Bors B., Szatmari A.M. In vitro* culture and medium-term conservation of the rare wild species *Gladiolus imbricatus* // African J. Biotech. – 2012. – № 11. – P. 14703–14712.

References

1. J. Wu and J. Zhong, "Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects", *J. Biotechnol.*, vol. 68, pp. 89–99, 1999.
2. R.V. Kostyuk, "The development of biotechnology innovation in thetoday enterprise", *Aktual'ni Problemy Ekonomiky*, no. 8 (98), pp. 79–84, 2009 (in Ukrainian).
3. *George E.F.,* "Plant propagation by tissue culture", *The Technology.* Edington: Exegetics Ltd., 1993, 574 p.
4. F.L. Kalinin *et al.*, *Technology of Microclonal Propagation of Plants.* Kyiv, Ukraine: Naukova Dumka, 1992, 228 p. (in Russian).
5. V.A. Kunakh, *Biotechnology of Medicinal Herbs. Genetic, Physiological and Biochemical Bases*. Kyiv, Ukraine: Logos, 2005, 730 p. (in Ukrainian).
6. V.A. Kunakh *et al.*, "Peculiarities of variability of suspension cultures and cell clones of *Rauwolfia serpentina in vitro*", *Biotehnologiya*, no. 4, pp. 9–21, 2001(in Ukrainian).
7. M.D. Melnychuk *et al.*, *Fundamentals of Plant Biotechnology.* Kyiv, Ukraine, 2000, 247 p. (in Ukrainian).
8. V.A. Sidorov, *Plant Biotechnology. Cell Selection*. Kyiv, Ukraine: Naukova Dumka, 1990, 280p (in Ukrainian).

9. Y.I. Sidorov *et al.*, *Processes and Apparatus of Microbiological and Pharmaceutical Industries. Technological Calculations. Examples and Problems. Fundamentals of Design*. Lviv, Ukraine: Intelect-Zachid, 2008, 736 p. (in Ukrainian).
10. A.S. Krvavych *et al.*, "Phytochemical research of plant extracts and use *in vitro* culture in order to preserve rare wild species *Gladiolus imbricatus*", *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, vol. 5, no. 1, pp. 240–246, 2014.
11. R.O. Petrina *et al.*, "Introduction to in vitro culture *Carlina acaulis*", *Visnyk NU "Lviv Polytechnic", Ser. Khimiya, Tekhnolohiya Rechovyn ta yikh Zastosuvannya*, no. 787, pp. 169–172, 2013 (in Ukrainian).
12. A.S. Krvavych *et al.*, "Study of biologically active substances of *Gladiolus imbricatus*", *Visnyk NU "Lviv Polytechnic", Ser. Khimiya, Tekhnolohiya Rechovyn ta yikh Zastosuvannya*, no. 787, pp. 217–220, 2014 (in Ukrainian).
13. Y.V. Koltsov *et al.*, "Method of growing ginseng biomass", Russian Federation Patent 2101934, issued date Nov. 21, 1995, Jun. 20, 1998.
14. E. Rakosy-Tican *et al.*, "*In vitro* culture and medium-term conservation of the rare wild species *Gladiolus imbricatus*", *African J. Biotech.*, no. 11, pp. 14703–14712, 2012.

А.С. Крвавич, Р.О. Петріна, В.П. Новіков

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ІЗ КАЛУСНОЇ КУЛЬТУРИ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

Проблематика. Широке використання лікарських рослин (ЛР), для отримання біологічно активних речовин (БАР) призвело до стрімкого скорочення їх у природі. Деякі з них належать до рідкісних і зникаючих видів, багато рослин довго відновлюють свої площі виростання. Одним із актуальних напрямів біотехнології є отримання речовин вторинного метаболізму на основі культивованих *in vitro* клітин рослин. Розробка таких біотехнологій базується на дослідженні закономірностей калусогенезу та накопичення вторинних метаболітів у клітинних культурах. У зв'язку з цим культивування тканин і клітин вищих рослин *in vitro* з метою їх промислового використання для отримання БАР та збереження генофонду визначає актуальність цього дослідження.

Мета дослідження. Метою роботи є вивчення умов культивування та розроблення технології одержання БАР із калусної маси ЛР.

Методика реалізації. В роботі використовували біотехнологічні та фізико-хімічні методи дослідження.

Результати дослідження. Підібрано схему стерилізації насіння з найбільшим виходом асептичних експлантів (93 %) та оптимальні умови процесу (для культивування вибрано середовище Мурасіге і Скуга, регулятори росту, світловий і температурний режими).

Висновки. Оптимізовано умови культивування та запропоновано технологічну схему отримання БАР із калусної маси *Gladiolus imbricatus*, що дає можливість одержати комплекс БАР у вигляді екстракту з культури клітин рослин.

Ключові слова: вторинні метаболіти; калусна маса; *Gladiolus imbricatus*; культивування; виробництво.

А.С. Крвавич, Р.А. Петрина, В.П. Новиков

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Проблематика. Широкое использование лекарственных растений (ЛР) для получения биологически активных веществ (БАВ) привело к стремительному сокращению их в природе. Некоторые из них относятся к редким и исчезающим видам, многие растения долго восстанавливают свои площади произрастания. Одним из актуальных направлений биотехнологии является получение веществ вторичного метаболизма на основе культивируемых *in vitro* клеток растений. Разработка таких биотехнологий базируется на исследовании закономерностей каллусогенеза и накопления вторичных метаболитов в клеточных культурах. В связи с этим культивирование тканей и клеток высших растений *in vitro* с целью их промышленного использования для получения БАВ и сохранения генофонда определяет актуальность данного исследования.

Цель исследования. Целью работы является изучение условий культивирования и разработка технологии получения БАВ из каллусной массы ЛР.

Методика реализации. В работе использовали биотехнологические и физико-химические методы исследования.

Результаты исследования. Подобраны схема стерилизации семян с наибольшим выходом асептических эксплантов (93 %) и оптимальные условия процесса (для культивирования выбраны среда Мурасиге и Скуга, регуляторы роста, световой и температурный режимы).

Выводы. Оптимизированы условия культивирования и предложена технологическая схема получения БАС из каллусной массы *Gladiolus imbricatus*, что позволяет получить комплекс БАВ в виде экстракта из культуры клеток растений.

Ключевые слова: вторичные метаболиты; масса каллуса; *Gladiolus imbricatus*; культивирование; производство.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
8 квітня 2015 року