

## ТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ

В. Р. Гамада

Національний університет “Львівська політехніка”,  
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології  
vrhamada@gmail.com

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ФЕНОЛЬНОЇ ПРИРОДИ З *ADONIS VERNALIS*

<https://doi.org/10.23939/ctas2021.01.126>

Показано можливість застосування біотехнологічного методу для одержання біологічно активних сполук, основанийого на *in vitro* культивуванні калюсних культур. Одержано калюсну біомасу *Adonis vernalis*, отримано екстракти на її основі, визначено вміст флавоноїдів, фенольних сполук, також досліджено їх антиоксидантну активність. Результати досліджень свідчать про те, що калюсна біомаса не поступається рослинній сировині за вмістом біологічно активних речовин та біологічною активністю.

**Ключові слова:** *in vitro*; калюсна маса; *Adonis vernalis*; фенольні сполуки.

## Вступ

Широкого застосування набувають лікарські засоби на основі рослинної сировини, які є ефективними, безпечними, не викликають алергічних реакцій, звикання до препарату, у яких менше побічних дій. На особливу увагу заслуговують рослини, природні запаси яких є незначними чи які перебувають під загрозою зникнення, проте це важливі сировинні джерела для потреб фармацевтичної промисловості.

Тому пошук альтернативних джерел одержання біологічно активних речовин актуальний для сучасної науки. В наш час тривають пошуки нових екологічно чистих сировинних джерел біологічно активних речовин, а також способів оптимізації процесів їх отримання [2].

На сучасному етапі розвитку біотехнологія може запропонувати методи одержання біологічно активних сполук, основанийі на *in vitro* культивуванні клітин рослин та отриманні калюсних культур.

*Adonis vernalis* – це багаторічна рослина родини *Ranunculaceae* (Жовтецевих). Офіційальною сировиною є трава Горицвіту весняного – *Herba Adonidis vernalis*, яку заготовляють під час цвітіння або дозрівання плодів. Науковий інтерес

до *Adonis vernalis* зумовлений наявністю у рослині комплексу цінних біологічно активних сполук, а саме: серцевих глікозидів (цимарин, адонізид, адонівернозид, адонітоксин та інші), тритерпенових сапонінів, генінів, флавоноїдів, органічних кислот, танінів тощо [6, 8]. Проте вміст біологічно активних речовин та фармакологічні властивості *Adonis vernalis* все ще вивчені недостатньо.

Рослину застосовують як у традиційній, так і в народній медицині як ефективний засіб для лікування та профілактики різних захворювань. Фармакологічні властивості *Adonis vernalis* полягають у сповільненні та підсиленні серцевих скорочень, збільшенні ударного хвилинного об'єму серця, заспокійливій дії на нервову систему, застосовують її при вегетосудинних дистоніях, неврозах серця тощо [6, 10, 13].

Вирощування біомаси культури в умовах *in vitro* є важливим та ефективним методом збереження рослинного різноманіття, особливо рідкісних рослин. Застосування цього методу передбачає виділення культивованої біомаси, яка містить ті самі біологічно активні речовини, що й інтактна рослина. Культивована біомаса є цінною альтернативною сировиною у технології одержання лікарських засобів. Технологія отримання культивованої

біомаси для лікарських рослин має низку переваг порівняно з традиційними методами вирощування. Оптимізація умов на всіх етапах процесу культивування передбачає високу результативність [12].

Мета роботи – одержання комплексу біологічно активних речовин фенольної природи з калюсної біомаси *Adonis vernalis* (Горицвіту весняного), отриманої за допомогою біотехнологічного методу культури клітин, тканин та органів *in vitro*.

### Матеріали та методи досліджень

Об'єкт досліджень – насіння *Adonis vernalis*, яке заготовлено на території Українських Карпат в травні–червні 2019–2020 рр. Калюсна біомаса *Adonis vernalis* та екстракти на її основі були об'єктами для фітохімічних досліджень.

Для покращення проростання насіння здійснювали його допосівне оброблення *Adonis vernalis* трьома способами:

- схема 1: оброблення водою (99 °C) 1 хв і експозиція за 5–7 °C протягом 72 год;
- схема № 2: оброблення H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (конц.) 1 хвилину із подальшим змочуванням холодною стерильною водою та експозиція за 5–7 °C протягом 72 год;
- схема № 3: механічне оброблення оболонки насінини з подальшим змочуванням холодною стерильною водою та експозиція за 5–7 °C протягом 72 год.

На наступному етапі насіння замочували в 90 % етанолі 2–3 хв. Після цього витримували в стерилізувальних агентах: розчинах H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %), NaClO (10 %), HgCl<sub>2</sub> (0,1 %) за експозиції (20 і 40 хв) та три рази промивали у бідистильованій стерильній воді [4].

Підготовлене насіння переносили на агаризоване поживне середовище Мурасіге–Скуга (МС) в чашки Петрі та інкубували за (+24±2°C), 16-годинного фотоперіоду за освітлення 3000 лк і відносної вологості повітря 80 % [9]. Вивчали ефективність стерилізації (відсоток асептичного насіння відносно загальної кількості вихідних насінин) та ефективність проростання (відсоток насіння, яке після оброблення стерилізувальними агентами утворювало життєздатні паростки) [4, 5].

Культивування *Adonis vernalis* здійснювали на середовищі МС із додаванням регуляторів росту. Сегменти асептично вирощених паростків слугували експлантами для ініціації калюсогенезу. Для калюсогенезу використано кінетин

(Кін), індолілоцову (ІОК) та нафтилоцову (НОК) кислоти за різних концентрацій і співвідношень. Культивування тривало 50 діб за температури 24 °C (±2 °C), освітлення 3000 лк, фотоперіоду 16/8 год (світло/темрява) та відносної вологості 80 %. Частоту калюсогенезу визначали як відношення кількості експлантів із калюсом до їх загальної кількості. Дослідження проведено тричі, одержані результати оброблено статистично [12].

Калюсну біомасу клітин висушували за температури (55±2) °C, аналізували за показниками (вологість, загальна зола, зола, нерозчинна в HCl, загальний вміст екстрактивних речовин) та використовували для одержання екстрактів [12].

Індекс росту розраховано за формулою:

$$IP = \frac{M - m}{m},$$

де *IP* – індекс росту; *M* – маса через 20 діб; *m* – початкова вага [4, 5].

Екстракти калюсної біомаси *Adonis vernalis* одержували методом мацерації, як екстрагент використовували водно-спиртові розчини за концентрації 20, 40, 70 та 90 %. Співвідношення силовини та екстрагенту становило 1:10 [12].

Одержані екстракти досліджували на вміст біологічно активних сполук – фенольних сполук та флавоноїдів.

Загальний вміст фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом Фоліна–Чокальтеу [1, 7]. Оптичну густину зразків вимірювали на спектрофотометрі Hitachi U-2810 за довжини хвилі 760 нм. Загальний вміст фенольних сполук виражено як кількість у мг галової кислоти на 1 мл екстракту, вимірювання виконували тричі.

Визначення загального вмісту флавоноїдів здійснено спектрофотометричним методом із довжиною хвилі 420 нм [1]. Вміст флавоноїдів обчислювали як кількість кверцетину в мг на 1 мл екстракту, всі вимірювання проводили тричі.

Антиоксидантну активність екстрактів калюсної біомаси вивчали модифікованим методом Meda et al. [3, 1]. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі за 517 нм, контроль – етанол.

Антиоксидантну активність екстрактів обчислювали за формулою:

$$\%_{\text{inhibition}} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \%,$$

де *A<sub>control</sub>* – оптична густина вихідного розчину ДФПГ; *A<sub>sample</sub>* – оптична густина одержаної суміші

екстракту з розчиномДФПГ. Всі вимірювання відтворено тричі.

Одержані результати обробляли статистично за допомогою пакета статистичних функцій програми Microsoft Excel та програми STATISTICA 8. Визначено середнє арифметичне значення  $M$ , середнє арифметичне відхилення  $m$ , кількість повторень  $n$ ,  $t$  – критерій Стьюдента [1].

**Результати досліджень та їх обговорення**

За результатами досліджень підібрано умови допосівного оброблення та стерилізації насіння *Adonis vernalis* з найбільшим виходом асептичних експлантів.

Результати проведених досліджень щодо виходу життєздатних експлантів за різних умов передпосівного оброблення насіння *Adonis vernalis* та застосування різних стерилізувальних агентів з різним часом експозиції подано у табл. 1.

Таблиця 1

**Умови стратифікації та стерилізації насіння *Adonis vernalis***

Схема передпосівного оброблення	Стерилізуючий агент	Час експозиції, хв	Вихід життєздатних експлантів, %
1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	62
		40	66
	NaClO	20	58
		40	60
	HgCl <sub>2</sub>	20	59
		40	62
2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	55
		40	59
	NaClO	20	56
		40	66
	HgCl <sub>2</sub>	20	51
		40	58
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	63
		40	71
	NaClO	20	57
		40	61
	HgCl <sub>2</sub>	20	52
		40	56

На підставі результатів проведеного дослідження встановлено оптимальну схему допосівного оброблення і стерилізації насіння *Adonis vernalis* для

висаджування на живильне середовище МС – пошкодження оболонки насіння механічним обробленням, змочування у стерильній холодній воді та експозиція за 5–7 °С протягом 72 год – 90 % етанол, на 2–3 хв – 30 % розчин H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 хв) – тричі бідистильована вода. За вказаних умов вихід життєздатних експлантів становив 71 %. Наступним етапом було подальше культивування *Adonis vernalis*.

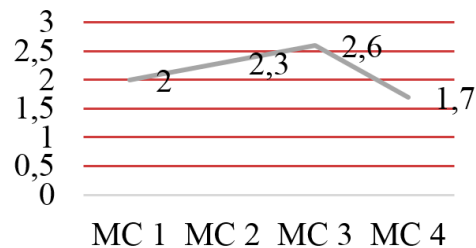
Сегменти асептично вирощених проростків слугували експлантами для ініціації калюсогенезу. Культивування проводили на середовищі МС із додаванням Кін у комбінації з іншими регуляторами росту: ІОК, НОК. Відомо, що на індукцію калюсогенезу впливають певні фактори: умови культивування, склад культурального середовища та інші [6]. Варіанти живильного середовища МС з різним вмістом регуляторів росту, які використано у дослідженні, подано в табл. 2.

Таблиця 2

**Вміст регуляторів росту в живильних середовищах, мг/л**

Регулятори росту	Живильне середовище МС			
	МС1	МС2	МС3	МС4
Кін	0,1	0,05	0,03	–
ІОК	0,4	0,8	1,2	1,8
НОК	0,5	1,5	2,5	3,5

Культивування здійснювали впродовж 50 діб. Експланти культивували за таких умов: фотоперіод 16/8 год (світло/темрява), освітлення 3000 лк, температура 24 °С (±2 °С), відносна вологість 80 %. Залежно від варіанта поживного середовища спостерігались значні відмінності в інтенсивності ростових процесів під час культивування. На рис. 1 наведено індекс росту калюсної культури *Adonis vernalis* на 50-ту добу культивування на різних варіантах досліджуваних поживних середовищ (МС1 – МС4).



Індекс росту калюсної біомаси *Adonis vernalis* на різних варіантах живильного середовища на 50-ту добу культивування

Найнижчі значення індексу росту характерні для калусної культури *Adonis vernalis*, що культивувалась на поживному середовищі МС 4 із додаванням 1,8 мг/л ІОК і 3,5 мг/л НОК. Найвище значення індексу росту спостерігали на середовищі МС 3 із додаванням 0,03 мг/л Кін, 1,2 мг/л ІОК та 2,5 мг/л НОК.

Досліджено час подвоєння біомаси *Adonis vernalis*, яку культивували на різних варіантах живильного середовища (МС 1 – МС 4) до 50-ї доби культивування. Встановлено, що оптимальним серед досліджуваних середовищ є середовище МС 3, на якому спостерігались найвищі значення індексу росту (див. рисунок) і, відповідно, найменший час подвоєння біомаси калусів (сьома доба).

Одержали калусну біомасу: пористу, тверду масу блідо-жовтого кольору з нерівною поверхнею, частинки розміром 0,3–1,1 см зі специфічним запахом і смаком, маса – 86 г/л культурального середовища.

Аналіз калусної біомаси *Adonis vernalis* виконували за такими показниками: вологість, загальна зола, зола, нерозчинна в НСІ, та вміст екстрактивних речовин відповідно до вимог Державної фармакопеї України [12]. Результати аналізу наведено в табл. 3.

Таблиця 3

**Аналіз калусної маси *Adonis vernalis***

Показник	Калусна біомаса
Вологість, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	5,88±0,03
Загальна зола, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	9,75±0,01
Зола, нерозчинна в НСІ, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	0,43±0,04
Екстракт калусної біомаси	
Концентрація етанолу	Вміст екстрактивних речовин, %, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$
20 %	9,28±0,01
40 %	9,43±0,03
70 %	8,04±0,01
90 %	6,37±0,02

Результати експериментальних досліджень свідчать, що калусна біомаса, вирощена на агаровому середовищі, за основними показниками відповідає вимогам нормативної документації (табл. 3).

На наступному етапі визначено загальний вміст флавоноїдів та фенольних сполук в екстрактах *Adonis vernalis*. Результати наведено в табл. 4.

**Загальний вміст фенольних сполук і флавоноїдів у екстрактах калусної біомаси *Adonis vernalis* та їх антиоксидантна активність**

Водно-етанольний екстракт, %	Загальний вміст фенолів, мг галової кислоти, мл, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	Загальний вміст флавоноїдів, мг кверцетину, мл, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$	Антиоксидантна активність, ДФП, %, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ , $n = 3$
20	1,1726±0,02	1,7226±0,01	40,5261±0,04
40	1,9317±0,02	2,3064±0,01	73,3722±0,02
70	1,3590±0,03	1,9655±0,04	70,1621±0,01
90	1,3114±0,01	1,5183±0,02	60,4972±0,03

Результати свідчать про максимальний вміст фенольних сполук і флавоноїдів у 40 % водно-етанольних екстрактах калусної біомаси *Adonis vernalis*. Вміст виявлених сполук в екстрактах калусної біомаси і в екстрактах рослинної сировини *Adonis vernalis* практично рівноцінний, що дає змогу використовувати калусну біомасу як альтернативне джерело біологічно активних речовин [13].

Встановлено, що максимальну антиоксидантну активність виявляють 40 % водно-етанольні екстракти калусної біомаси *Adonis vernalis*.

**Висновки**

У результаті проведених досліджень встановлено, що культивування калусної культури *Adonis vernalis* доцільно здійснювати на живильному середовищі Мурасіге–Скуга з додаванням 0,03 мг/л Кін, 1,2 ІОК та 2,5 мг/л НОК за температури (+24±1)°С, освітлення 3000 лк і відносної вологості повітря 80 %, на якому спостерігались найменший час подвоєння біомаси калусів і найвищі значення індексу росту відповідно.

Показано, що калусна маса *Adonis vernalis* за показниками вологості, золи загальної та нерозчинної в НСІ та вмістом екстрактивних речовин відповідає вимогам Державної фармакопеї України та може використовуватись як альтернатива рослинної сировини під час розроблення лікарських засобів. Визначено вміст фенольних сполук та флавоноїдів у екстрактах калусної біомаси *Adonis vernalis* у перерахунку на галову кислоту та

кверцетин відповідно. Максимальний вміст фенольних сполук становив 1,9317 мг, флавоноїдів – 2,3064 мг відповідно в екстрактах, виготовлених із використанням 40 % розчину етанолу.

Досліджено антиоксидантну активність екстрактів калусної біомаси *Adonis vernalis* та встановлено, що найбільший ступінь інактиваціїДФПГ проявив екстракт *Adonis vernalis*, виготовлений із використанням 40 % розчину етанолу. Встановлено, що калусна біомаса може використовуватись як джерело фенольних сполук, а застосування біотехнологічного методу розширить асортимент сировинних джерел для потреб фармацевтичної промисловості та дасть змогу впровадити у практичне використання цінні лікарські рослини.

### References

1. Bazavluk, Y., Hamada, V., Polish, N., Konechna, R., Mykytiuk, S., & Novikov, V. (2019). Total Phenolic And Flavonoid Content, Antioxidant Activity And Antimicrobial Potential Of *Phlomis Pungens* Willd. *Scientific Journal of Polonia University*, 37(6), 133–139.
2. Bazavluk, Y. V., Konechna, R. T., & Fedorova, O. V. (2020). *Prospective Species Of Medicinal Plants Of The Family Ranunculaceae In The Flora Of The Ukrainian Carpathians*. Publishing House “Baltija Publishing”, 7–10.
3. Hamada, V. R., Kolb, Y. I., Konechna, R. T., Novikov, V. P., Mykytiuk, S. R., & Konechnyi, Y. T. (2019). Prediction Of Acute Toxicity Of Biologically Active Substances Of *Adonis Vernalis*. In *Фізико-хімічна біологія як основа сучасної медицини*, 74–76.
4. Khropot, O. S., Bazavluk, Y. V., Konechna, R. T., Hubytska, I. I., Konechnyi, Y. T., Jasicka-Misiak, I., & Novikov, V. P. (2020). Одержання та дослідження калусної маси *Delphinium Elatum* L. *Фармацевтичний Часопис*, (2), 5–15.
5. Kokotkiewicz A. (2014). Light and temperature conditions affect bioflavonoid accumulation in callus cultures of *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) / A. Kokotkiewicz, A. Bucinski, M. Luczkiewicz // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118, No. 3, 589–593.
6. Kropf, M., Bardy, K., Höhn, M., & Plenck, K. (2020). Phylogeographical structure and genetic diversity of *Adonis vernalis* L. (Ranunculaceae) across and beyond the Pannonian region. *Flora*, 262, 151497, 1–10.
7. Kravych, A. S., Hamada, V. R., Konechna, R. T., Mylyanych, A. O., Zhurakhivska, L. R., Buchkevych, I. R., Novikov, V. P. (2019). Extraction of phenolic compounds from the Plant *Adonis Vernalis*. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii*, 5, 54–57.
8. Mészáros, T., & Józsan, Z. (2020). Inter-Annual Variability In The Aculeata Pollinators Of *Adonis Vernalis* L. *Botanikai Közlemények*, 107(1), 45–55.
9. T. Murashige, F. Skoog (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15, 3, 473–497.
10. Sattari, R., Khayati, G. R., & Hoshyar, R. (2020). Preparation and physical characterization of *Adonis vernalis* aqueous leaf extract-mediated green synthesized silver nanoparticles and its toxicity effect on breast cancer cells. *Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials*, 53(2), 183–189.
11. Ucuncu, O., Baltaci, C., Akar, Z., Duzgun, A. O., Cuce, M., & Kandemir, A. (2020). Biological Activities And Phytochemical Screening Of Ethanol Extracts From *Adonis Paryadraca* (Ranunculaceae). *Farmacologia*, 68(6), 1062–1068.
12. Derzhavna Farmakopeya Ukrainy. *Dopovnennya 1 / Derzhavne pidpryyemstvo “Ukrayins’kyy naukovyy tsentr yakosti likars’kykh zasobiv”*. 1-e vyd. Kharkiv: Derzhavne pidpryyemstvo “Ukrayins’kyy naukovyy tsentr yakosti likars’kykh zasobiv”, 2009. 620.
13. Kolb, Yu. I., Konechna, R. T., & Novikov, V. P. (2018). Prohnozuvannya biolohichnoyi aktyvnosti ta druglike” spoluk rodyny Ranunculaceae yak poshuk novykh efektyvnykh diyuchykh rehovyn. *Vcheni zapysky Tavriys’koho natsional’noho universytetu imeni V. I. Vernads’koho. Seriya: Tekhnichni nauky*, (29 (68), 6 (2)), 70–76.

V. R. Hamada

Lviv Polytechnic National University,

Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

vrhamada@gmail.com

### BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF OBTAINING PHENOLIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF ADONIS VERNALIS

This article shows the possibility of using a biotechnological method to obtain biologically active compounds based on in vitro cultivation of callus cultures. The callus biomass of *Adonis vernalis* was obtained in vitro by using the biotechnological method. The extracts based on callus biomass of *Adonis vernalis* were obtained. The content of flavonoids and phenolic compounds was determined. The antioxidant activity of callus biomass of *Adonis vernalis* has also been studied. The research results show that the content of biologically active substances and biological activity in callus biomass does not differ from plant raw materials.

**Key words:** *in vitro*; callus mass; *Adonis vernalis*; phenolic compounds.