

Е. А. Буркова, А. В. Канарский, З. А. Канарская

ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ ФИТОБИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Ключевые слова: растения, клеточная технология, ферментирование, экстракция, биологически активные вещества.

Описаны сырьевые источники и способы получения биологически активных веществ из растительного сырья, культуры клеток и тканей, полученных in vitro. Показано, что прогресс в фармакологии, пищевой и парфюмерной промышленности взаимосвязан с развитием методов фитобиотехнологии и их освоением на практике.

Keywords: plants, technology of cell, fermenting, extraction, biological active substances.

Described raw material sources and methods for preparing biologically active substance from plants material, culture of cells and tissues received from in vitro. It is shown that progress in pharmacology, food and perfume industries interconnected with the development of methods fitobiotechnologie and their development in practice.

Актуальность

Проблема сохранения здоровья и увеличения продолжительности жизни человека является наиболее приоритетной и отнесенной к категории государственной важности. Несомненно, обеспечение здорового образа жизни человека взаимосвязано с питанием. Регулярное употребление фруктов, овощей и ягод уменьшает риск развития некоторых заболеваний, в том числе, онкологических и сердечно-сосудистых. Снижению развития заболеваний способствует присутствие в их составе биологически активных веществ, физиологически функциональных пищевых ингредиентов – витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон, пребиотиков. Биологически активные вещества растительного происхождения приобретают определенный статус также в фармацевтике и парфюмерии. Однако, в производстве биологически активных веществ растительного происхождения наблюдается недостаток сырьевых ресурсов при неуклонном росте их спроса.

В настоящее время многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, выделяют из тканей возделываемых или дикорастущих растений, часто принадлежащих к редким видам. Альтернативным источником получения экологически и физиологически безопасных биологически активных веществ является культура растительных клеток и тканей [1, 2]. Культуры клеток и тканей, полученные *in vitro*, как и клетки интактного растения, могут синтезировать вторичные метаболиты (ВМ) и все шире используются в фитобиотехнологии. В связи с этим актуальным является поиск новых сырьевых источников и способов получения этих веществ из известного многообразия растительного мира.

Применение клеточной технологии при синтезе лекарственных средств

Содержание БАВ в различных частях растения неодинаково. Колебания могут быть весьма значительными, например, в листьях, как правило, действующих веществ больше, чем в стеблях. Поэтому в зависимости от того, каких частей (листьев или стеблей) взято больше для

определения, результаты будут отличаться. Каждое лекарственное растение является источником необходимых для человека веществ. Например, календула лекарственная (*Calendula officinalis*) широко культивируется как декоративное растение. В лекарственных целях возделываются сорта с махровыми формами цветов оранжево-красного цвета, так как содержание каротина в них в два раза больше, чем в бледно окрашенных цветах. Цветочные корзинки содержат каротиноиды (до 3,2 мг%), эфирные масла (около 0,02 %), дубильные вещества (до 4,45 %), витамин С, флавоноиды (до 3,5 %) и другие вещества [3]. Календула применяется в основном в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, антисептического, желчегонного, противоракового средства [4].

Широкий спектр биологической активности и «мягкость» действия являются основными преимуществами фармакологических препаратов из природного растительного сырья. На сегодняшний день из растений получают более трети всех лекарственных субстанций, используемых в медицинской практике. Структура многих из них настолько сложна, что растения еще долго будут их единственным источником [5]. В настоящее время известно более 100000 ВМ (вторичные метаболиты), продуцируемых растениями. Многие из них являются практически важными продуктами. При этом в биосфере насчитывается 6 млн. индивидуальных химических соединений, которые тем или иным путем могут попадать и накапливаться в растениях [6].

В таблице 1 указаны наиболее употребляемые лекарственные вещества, получаемые из растений [7].

Лекарственные вещества могут быть получены различными химическими и биотехнологическими способами из растительного, животного или минерального сырья; успехи науки химии позволяют достичь при этом высокой степени чистоты конечного продукта. Однако неумеренное поступление биологически активных веществ может нанести существенный вред здоровью, если будет нарушен баланс между

питательными компонентами, в которых остро нуждается организм человека.

Таблица 1 - Наиболее употребляемые лекарственные вещества, получаемые из растений

Лекарственное вещество	Активность	Растение-источник
Стероиды из диосгенина	Противозачаточные средства	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Кодеин	Болеутоляющее	<i>Papaver somniferum</i>
Атропин	Антихолинэргическое	<i>Atropa belladonna L.</i>
Резерпин	Снижающее давление	<i>Rauwolfia serpentina L.</i>
Гиосциамин	Антихолинэргическое	<i>Hyoscyamus niger L.</i>
Дигоксин	Тонизирующее сердечную деятельность	<i>Digitalis lanata L.</i>
Скополамин	Антихолинэргическое	<i>Datura metel L.</i>
Дигитоксин	Сердечно-сосудистые	<i>Digitalis purpurea L.</i>
Пилокарпин	Холинэргическое	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Хинин	Антималарийное	<i>Cinchona ledgeriana</i>

Только в условиях полного сохранения в рационе необходимых пищевых ингредиентов индивидууму удастся удовлетворить потребность в энергетической подпитке и обеспечить нормальное протекание обменных процессов в организме [8].

Получены каллусные и суспензионные культуры лекарственных растений: эхинацеи пурпурной, шалфея лекарственного, расторопши пятнистой, сирени обыкновенной, каллизии душистой, пажитника греческого, катарантуса розового, барвинка малого и др. Эти растения известны как иммуностимуляторы (Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea*); как вещества, обладающие антиоксидантным, нейтропротекторным, противирусным, гепатопротекторным действиями (шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*); как вещества, обладающие выраженными гепатопротекторными свойствами (Расторопша пятнистая (*Silibum marianum*)) и другие [9].

Использование культуры клеток растений имеет ряд преимуществ: экологическая чистота производства культуры клеток, гарантированное производство биомассы независимо от сезона и погодных условий, отсутствие в биомассе вредных добавок. С 1993 и в России разрешен к применению лекарственный препарат «Pacilitaxel», действующим началом которого является паклитаксел (коммерческий синоним этого соединения – таксол). Этот препарат главным образом используется для лечения метастатического рака яичников, метастатического рака молочной железы и рака легкого, а также в терапии второй линии от СПИДа, связанной с саркомой Капоши. Серьезной проблемой в его получении является низкая концентрация (0,001 – 0,05 %) таксола даже в наиболее продуктивных видах, таких как *T. brevifolia*. Принимая во внимание эти факты, существует необходимость найти другие источники

таксола. Альтернативным источником таксоидов может служить культура растительных клеток. В ИФР РАН получен ряд культур клеток разных видов *Taxus*, однако исследование на предмет содержания таксоидов не проведено.

Проведен сравнительный анализ биосинтетических характеристик шести линий клеток суспензионной культуры *T. baccata*. Проанализировано 6 линий суспензионной культуры клеток, которые отличались между собой по гормональному составу сред и наличию или отсутствию поливинилпирролидона (ПВП):

106, 106 ПВП – α НУК (2 мг/л), БАП (0,3 мг/л); 107, 107 ПВП – пиклорам (2 мг/л), БАП (0,3 мг/л); 108, 108 ПВП – 2,4-D (1 мг/л), кинетин (0,3 мг/л).

Анализ показал наличие пика с временем удерживания, близким к паклитакселу в линиях 106 ПВП, – 21,041 мин.; 107 – 21,043 мин., менее выраженный пик у линии 107 ПВП – 21,045 мин.; в линиях 108 и 108ПВП выраженных пиков с интересующими временами удерживания обнаружено не было. Пик, близкий к баккату III, был также определен только в пробе линии 106 (4,961 мин.). Выводы о наличии или отсутствии исследуемых соединений делали, основываясь на данных ВЭЖХ смеси стандартов баккату III и паклитаксела и совпадении времен удерживания: для баккату III – 4,954 мин., для паклитаксела – 20,993 мин.

Таким образом, для дальнейшей работы по оптимизации ростовых и биосинтетических показателей культуры клеток *T. Baccata* применимы 4 линии из 6, выращиваемые с добавлением таких фитогормонов, как α НУК, БАП, пиклорам. Наличие или отсутствие ПВП в среде культивирования не влияло на содержание таксоидов в культуре клеток. Для стандартизации и оценки качества БАВ, теоретического обоснования их применения эффективны методы ядерного магнитного резонанса [10].

В лекарственном сырье наряду с действующими веществами содержатся и так называемые сопутствующие вещества, которые также могут обладать фармакологической активностью. Довольно часто сопутствующие вещества влияют на действие БАВ, потенцируя или ингибируя их фармакологический эффект. Качественный состав БАВ может быть различным в разных органах у одного и того же растения, это зависит от сроков заготовки лекарственного растительного сырья. Биологически активные вещества неравномерно распределяются по органам и тканям растений с преимущественной локализацией в определенных органах. На образование и накопление БАВ влияет и возраст растений. Это обязательно учитывают при культивировании растений [11].

Как альтернативные источники БАВ растительного происхождения клеточные культуры обладают следующими преимуществами:

- получение экологически чистых продуктов независимо от климата, сезона, погоды;

- создание клеточных линий-сверхпродуцентов путем генетически манипуляций;
- сохранение пула генов редких и исчезающих растений-продуцентов;
- возможность оптимизировать и стандартизировать условия выращивания;
- возможность автоматизации процессов [12].

Благодаря усилиям исследователей накоплено ценная информация о способности культивируемых растительных клеток синтезировать многие традиционные экономически важные продукты: терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, необычные пептиды и специализированные белки, натуральные красители, стероиды, пряности, инсектициды, воски, витамины. Также доказана возможность культур клеток осуществлять биотрансформацию, то есть синтезировать некоторые БАВ из дешевых и доступных их предшественников. Эти «полупродукты» вторичных метаболитов не могут быть преобразованы химическим или микробиологическим путем, и только благодаря активности ферментов клеток растений в культуре происходит их превращение в ценный конечный продукт.

Особенности культивирования клеток тканей растений. Стадия ферментации является основной стадией в биотехнологическом процессе, так как в ее ходе происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов (биомасс, эндо- и экзопродуктов). Эта стадия осуществляется в биохимическом реакторе и может быть организована в зависимости от особенностей используемого продуцента и требований к типу и качеству конечного продукта различными способами. Ферментация может происходить в строго асептических условиях и без соблюдения правил стерильности (так называемая «незащищенная» ферментация); на жидких и на твердых средах; анаэробно и аэробно. Аэробная ферментация, в свою очередь, может протекать поверхностно или глубинно (во всей толще питательной среды). Культивирование биологических объектов может осуществляться в периодическом и проточном режимах, полунепрерывно с подпиткой субстратом. При периодическом способе культивирования биореактор заполняется исходной питательной средой и инокулятом микроорганизмов. В течение определенного периода времени в аппарате происходит взаимодействие микроорганизмов и субстрат сопровождающееся образованием в культуре продукта ($X + S \rightarrow P$). Биохимические превращения в этом аппарате продолжают от десятков часов до нескольких суток. Регуляция условий внутри ферментера – важнейшая задача периодического культивирования клеток тканей растений. В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную, замедления роста, стационарную и отмирания. При этом происходят существенные изменения физиологического

состояния биообъекта, а также ряда параметров среды. Целевые продукты образуются в экспоненциальной (первичные метаболиты – ферменты, аминокислоты, витамины) и стационарной (вторичные метаболиты – антибиотики) фазах. Поэтому в зависимости от целей биотехнологического процесса в современных промышленных процессах применяют принцип дифференцированных режимов культивирования. В результате этого создаются условия для максимальной продукции того или иного целевого продукта. Периодически биореактор опорожняют, производят выделение и очистку продукта, и начинается новый цикл [13].

Ферментирование растительного сырья. В последние годы возросло число лекарственных препаратов и продуктов питания, полученных с использованием ферментированного растительного сырья. Ферментирование представляет собой биохимический процесс, катализируемый собственными энзимами растения, при котором органические вещества растения превращаются в другие химические соединения с выделением химической энергии [14]. Ферментированные продукты лучше сохраняются и, как показали исследования, содержат, помимо питательных веществ, антибактериальные и противовирусные соединения. Есть результаты исследований подтверждающих, что употребление подобных продуктов может препятствовать развитию раковых заболеваний. Так, в настоящее время популярны ферментированные продукты из сои (например, пасты «мисо» и «темпе»; первая используется в традиционной японской кухне). Установлено, что у женщин, регулярно употребляющих эти продукты, существенно снижается риск заболевания раком молочной железы [15]. При ферментировании лекарственного растительного сырья происходят изменения состава биологически активных веществ, например клетчатки, гликозидов, флавоноидов и т.д.

Ферментирование растительного сырья часто используется для увеличения выхода одних групп БАВ или для устранения других нежелательных соединений. При ферментировании гликозидов происходит деструкция с образованием свободного аглика, например у корней горечавки желтой. У некоторых видов лекарственного растительного сырья после ферментирования увеличивается выход эфирного масла (корневища ириса, корневища и корни пиона, корни хрена). Из свежих корней колюрии после ферментирования увеличивается выход эфирного масла до 1,5 % за счет образования эвгенола, а при ферментативном расщеплении гликозидов амигдалина, миндалонитрила или пруназина – в растениях косточковых плодовых пород образуется бензойный альдегид [17].

Другим примером служит получение дигитоксина из листьев наперстянки шерстистой. Предварительное ферментирование листьев увеличивает выход дигитоксина в 4 раза. С этой целью измельченные листья наперстянки замачивают в воде, имеющей температуру 37 — 40 °С, и оставляют при этой температуре на 40 — 48 часов.

Превращения флавоноидов наблюдаются в ходе некоторых технологических процессов, в частности при ферментировании чая, производстве соков и пива. В работе [18] рассмотрены основные закономерности, наблюдающиеся при ферментативных реакциях окисления или восстановления флавоноидов. В результате этих процессов у природных фенольных соединений проявляются более разнообразные виды биологической активности. Экспериментально показано, что хиноны и хинонметиды, стабильные продукты автоокисления полифенолов, а также ряд короткоживущих интермедиатов обладают высокой противоопухолевой активностью [19].

Ферментированием растений возможно удовлетворение потребности человека в питательных веществах. Выражение каждое лекарство должно быть пищей для организма, а каждая пища — лекарством всегда было злостным. Обмен веществ и энергии может нарушаться у человека из-за недостатка в рационе некоторых веществ, которые организм человека сам не способен синтезировать и получает их с пищей. Много таких веществ относят к классу витаминов. Недостаток витаминов в организме человека компенсируется растениями, которые содержат достаточное количество необходимых питательных веществ. Иногда достаточным может быть введение в рацион человека не самого витамина, а его предшественника, в частности, вместо провитамина А — β -каротина [20].

Выделение биологически активных веществ из растительного сырья. На территориях многих регионов России произрастает около 1000 видов растений, из которых, по меньшей мере, 350 являются полезными и свыше 100 применяются в медицине. Кроме того, повсеместно распространены сорняки, лечебное значение которых с каждым годом открывает новые перспективы. Все эти лекарственные растения содержат биологически активные вещества, сочетание которых и определяет фармакологическое действие на организм человека. Это алкалоиды (азотсодержащие щелочные органические соединения), гликозиды (органические вещества, молекулы которых состоят из углеводов и неуглеводного компонента), флавоноиды (красящие гликозиды), сапонины (гликозиды, дающие с водой пену), пектины (органические вещества, по своему химическому строению близкие к камедям и слизям), стеарины (полициклические твердые спирты), танины (дубильные вещества), сахара (глюкоза, фруктоза и др.), органические кислоты (яблочная, лимонная, винная и др.), клетчатка, эфирные масла, микроэлементы (калий, натрий, магний, железо и др.), витамины (С, В, Р, РР, А и др.), и другие. Выделение БАВ из растительного сырья, их разделение и очистка представляют собой сложную задачу. Несмотря на многообразие видов сырья, физических и химических свойств извлекаемых соединений, технология их выделения состоит в основном из следующих стадий: измельчение исходного сырья, приведение его в тесный контакт с растворителем, отделение экстракта от сырья, удаление и регенерация растворителя из экстракта и

исходного сырья, выделение и очистка биологически активного вещества [21].

Экстракция природных веществ из растительных тканей может быть осуществлена либо извлечением комплекса содержащихся в них соединений с последующим разделением на отдельные компоненты, либо последовательной экстракцией отдельных соединений или классов соединений. Обычно в растениях содержится несколько биогенетически связанных соединений, сходных по химической структуре и свойствам, что значительно усложняет задачу. Вот почему чаще всего извлекается сумма БАВ с примесью других сопутствующих природных соединений, содержащихся в исходном сырье.

При выделении БАВ необходимо учитывать возможность их разложения под влиянием растворителей, температуры, условий выполнения экстракции, а также воздействия ферментов, содержащихся в растительном сырье. Лечебное действие многих видов лекарственных растений, применяемых в настоящее время в народной медицине, связано с наличием в них различных биологически активных веществ, которые при поступлении в организм животных и человека проявляют нужный физиологический эффект и оказывают терапевтическое действие. Они называются действующими веществами, имеют разнообразный состав и относятся к различным классам химических соединений. К числу основных действующих веществ относятся алкалоиды, сердечные гликозиды, флавоноиды, хинон, смолы, дубильные вещества, а также эфирные масла, состоящие из смеси различных веществ, и витамины [22, 23, 24].

Выводы

Прогресс в фармакологии, пищевой и парфюмерной промышленности взаимосвязан с дальнейшим развитием методов фитобиотехнологии и их освоением на практике.

Литература

1. Mulabagal, V. Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering. Vol. 2. P. 29–48. (2004).
2. В.М. Юрин, Основы ксенобиологии. Учебное пособие. Минск: ООО “Новое знание”. 267 с. (2002).
3. А.В. Бабилова, Т.Ю. Горпеченко, Ю.Н. Журавлев, Растение как объект биотехнологии. Вып. LV. С. 184–211. (2007).
4. И. Хиггинс, Д. Беста, Дж. Джонса. Биотехнология – принципы и применение. М. (1988).
5. Г.Ж. Валиханова. Биотехнология растений. Алматы: «Конжык». 272 с. (1996).
6. W Barz, B.Ellis. Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production. Natural Products as Medicinal Agents. Stuttgart, Hippokrates. P. 471–507. (1981).
7. M Then, R. Szollosy, K. Vasarhelyi-Peredi, K. Szentmihalyi. Polyphenol-, mineral element content and total antioxidant power of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. Acta Horticulturae: XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants. P. 123–129. (2004).

8. В.А. Куркин, Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств Химико-фармацевтический журнал. Т. 37. №4. (2003).
9. В.Н. Самородов, С.В. Поспелов, Г.Ф. Мусеева, А.В. Середа Фитохимический состав представителей рода *Echinacea* Moench. и его фармакологические свойства. Химико-фармацевтический журнал. № 4. С. 32–37. В.А. (1996).
10. Научный журнал КубГАУ, № 93 (09), (2013).
11. О.А. Бочарова. Вести РАМН. № 5. С. 49 – 53. (2002).
12. S. Malik, M. Rosa, B. Cusido. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures. Process Biochemistry. V. 46. 23–34 p. (2011).
13. Л.В. Тимоценко, М.В. Чубик, А.Н. Пестряков, Основы микробиологии и биотехнологии: учебное пособие; Томск: Изд. Томского политех. ун-ва. 188 с. (2012).
14. Б. Бурцев, В. Никонов Теоретические основы технологии ароматизированных вин. http://www.ovine.ru/aromatic_vine/theory.htm
15. И.С. Васильева, В.А. Пасеишниченко, Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 80. – С. 105–110.
16. A.V. Velikorodov, V.B. Kovalev, A.G. Tyrkov. The study of the chemical composition and antifungal activity of essential oil *Lophanthus anisatum* Benth. // Chemistry of plant raw materials. № 2. P. 143–146. (2010).
17. A.H. Abdelaziz, A.V. Velikorodov, A.G. Tyrkov. Application of of essential oils traditional plants and new plants in Russia – *lofanta anisic (Lophanthus anisatus* B. Natural Science. № 3. P. 78-86. (2009).
18. Н.С. Терёшина, И.А. Самылина, З.П. Костенникова. “Фармация”, № 3, 53-56. (2012).
19. W.D. Rabotyagov, N.N. Bakova, L.A. Hlypenko, T.F. Golubeva. Essential oil crops and pryanoaromaticheskies plants for use in herbal medicine. Yalta. 82 p. (1998).
20. L.G. Boros, M. Nichelatti, Y. Shoenfeld, Fermented wheat ger extract (Avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases. Journal: Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 1051. P. 529–542. 2005.
21. Технология препаратов сердечных гликозидов, дигитоксин, целанид, дигоксин <http://farmast.ru/index>.
22. С.Я. Соколов. Фитотерапия и фитофармакология: руководство для врачей. М.: Мед. инф. агентство. 976 с. (2000).
23. Конюхова О.М., Масленникова К.А., Канарский А.В. Вест. Казан. технол. ун-ва. № 22, С. 222-225. (2013).
24. Фаттахова Г.А., Канарский А.В. Вест. Казан. технол. ун-ва. № 3. С. 196-202. (2014).

© Е. А. Буркова – асп. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ ekaterina_1012@mail.ru; А. В. Канарский – д-р техн. наук, проф. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, alb46@mail.ru; З. А. Канарская – канд. тех наук, доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru.

© Е. А. Burkova - Graduate Federal state budgetary educational University higher professional University, KNRTU, ekaterina_1012@mail.ru; А. В. Kanarskii - Dr. technical sciences, Prof., Department of Food Biotechnology, KNRTU alb46@mail.ru; Z. A. Kanarskaya – Ph.D, Associate Professor, Department of Food Biotechnology, KNRTU, zosya_kanarskaya@mail.ru.