

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

## ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ НАКОПЛЕНИЯ И ИЗВЛЕЧЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *IRIS* L.

© Л.И. Тихомирова\*, Н.Г. Базарнова, А.А. Бондарев, Я.В. Пономарёва, С.О. Миронова

Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул, 656049  
(Россия), L-tichomirova@yandex.ru

Для оптимального накопления биомассы и фенольных соединений (флавоноидов, дубильных, ксантонов, гидроксикоричных кислот) у *Iris sibirica* и *Iris spuria* в культуре ткани использовали среды, содержащие 1.0–2.5 мкМ БАП. Высокое содержание цитокинина вызывало стрессовую ситуацию, на первом этапе которой происходило массовое образование адвентивных и пазушных побегов, далее при повышении концентрации гормона коэффициент размножения снижался, растения прекращали размножаться, останавливались в росте и погибали. В экстремальных условиях фенольные соединения тратятся на выполнение защитных функций, в связи с чем происходило падение их общего уровня в тканях ирисов.

Для биотехнологического сырья представителей *Iris* L. проведено сравнение эффективности субкритической последовательной экстракции с традиционными методами (в аппарате типа Сокслет). В субкритических условиях извлекалось больше флавоноидов и дубильных веществ: во фракции 96% этанол флавоноидов и дубильных – в 2 раза; во фракции 60% этанол флавоноидов – в 2 раза, дубильных – в 3 раза; во фракции вода флавоноидов – в 3 раза, дубильных – в 1.4 раза. Водой в аппарате Сокслет извлекалось в 1.3 раза больше гидроксикоричных кислот, чем в субкритических условиях.

Соотношение конденсированных и гидролизуемых танинов в аэропонном сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх при традиционной экстракции определяли как 13 : 1, при экстракции в субкритических условиях – 8 : 1.

**Ключевые слова:** *Iris sibirica* L., *Iris spuria* L., вторичные метаболиты, растения-регенеранты, биотехнология получения лекарственного растительного сырья, методы экстракции.

### Введение

Биотехнологическое производство растительного сырья является привлекательной альтернативой, но на сегодняшний день имеет лишь ограниченный коммерческий успех из-за отсутствия разработанных методов регуляции накопления и извлечения фармацевтически значимых вторичных метаболитов.

Фенольные соединения (ФС) – один из важнейших классов вторичных метаболитов, имеющих широкое распространение в растениях. Разнообразие функций ФС в растительной клетке в сочетании с широким спектром биологического действия на живые организмы определяют актуальность и интерес к изучению этого класса соединений [1]. Зная пути биосинтеза полифенольных соединений, можно влиять на их направление и интенсивность с целью получения важных биологически активных метаболитов с высоким выходом.

Основная масса фенольных соединений происходит из гидроксикоричных кислот, которые образуются из фенилаланина и тирозина. Кроме того, источником фенолов являются промежуточные соединения,

*Тихомирова Людмила Ивановна* – заведующая отделом биотехнологии растений, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

*Базарнова Наталья Григорьевна* – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой органической химии, e-mail: bazarnova@chem.asu.ru

*Бондарев Александр Александрович* – научный сотрудник НИИ Биологической медицины, e-mail: alex\_root@mail.ru

*Пonomарёва Ярослава Викторовна* – магистрант, e-mail: yaroslavna.kasymova@mail.ru

*Миронова Стения Олеговна* – магистрант, e-mail: stenyam@mail.ru

возникающие на пути образования фенилаланина и тирозина – хинная и шикимовая кислоты. Из этих кислот образуются фенольные кислоты и гидролизуемые танины. Гидроксикоричные кислоты образуют кумарины, меланины, участвуют в образовании лигнина и В-кольца флавоноидов. А-кольцо флавоноидов синтезируется из ацетил-СоА (и малонил-СоА). Флавоноиды являются источником конденсированных танинов. В образовании

\* Автор, с которым следует вести переписку.

ряда фенольных соединений (гидролизуемых таннинов) участвуют сахара и продукты распада углеводов и липидов – ацетил-СоА (малонил-СоА). Конденсированные таннины являются полимерами флавоноидов и образуются как продукты фенилпропаноидного метаболизма. Образование конденсированных дубильных веществ является следствием окислительных реакций, катализируемых ферментами фенолоксидазного или пероксидазного типа. Гидролизуемые таннины состоят из остатков галловой кислоты, которые в основном связаны с молекулами гексоз [2]. Отмечено влияние кониферилового спирта как предшественника биосинтеза флавонолигнанов при получении силимариновых компонентов в суспензионной культуре *Silybum marianum* L. Сообщалось о влиянии аминокислот валина и изолейцина в составе питательных сред на биосинтез гиперфорина и адгиперфорина в культуре побегов *Hypericum perforatum* L. [3, 4].

Виды рода *Iris* богаты вторичными метаболитами, прежде всего флавоноидами и изофлавоноидами, флавонами, хинонами и ксантонами. В листьях ириса сибирского найдены флавоноиды (кверцетин, мирицетин); антоцианы (дельфинидин, цианидин). В траве ириса сибирского установлено присутствие флавоноидов: рутин, кверцетрин и монозида мирицетина. Определено количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин  $1.97 \pm 0.23$ . Разработана технология получения сырья ириса сибирского методами биотехнологии, изучен биохимический состав биотехнологического сырья *I. sibirica* в сравнении с традиционным. Сырье ириса сибирского разного способа получения имеет идентичный групповой состав биологически активных веществ. А суммарное накопление экстрактивных веществ в биотехнологическом сырье *I. sibirica* превышает их содержание в интактных растениях в 2 раза [5–8].

Растения обычно продуцируют вторичные метаболиты в природе в качестве защитного механизма против патогенов и насекомых. В культивируемых *in vitro* клетках и тканях растений показана возможность регулировать биосинтез ФС при введении в питательную среду гормоноподобных соединений, которые направленно регулируют синтез определенных типов этих соединений [9]. Ауксины способствуют синтезу растворимых фенольных соединений, в том числе флавонов, тогда как цитокинины преимущественно воздействуют на образование лигнина. При этом во всех вариантах происходили лишь количественные изменения в синтезе фенольных соединений, что обусловлено активацией ряда ферментов фенольного метаболизма (фенилаланинаминиакилазы, оксикиннамоил-КоА-лигазы и др.) [9].

Природным ауксином является индолуксусная-3-кислота (ИУК). Ауксины способствуют росту и удлинению клеток. В культурах *in vitro* они индуцируют деление клеток, удлинение клеток, образование придаточных корней и ингибирование образования придаточных и адвентивных побегов, индукцию эмбриогенеза, инициацию каллуса и рост. Синтетические ауксины как 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), нафтилуксусной кислоты (НУК) и индолилмасляная кислота (ИМК) часто используют благодаря их химической стабильности [10]. Ауксины обычно используют в диапазоне концентраций 0.01–10.0 мг/л<sup>-1</sup>.

Наиболее распространенным природным цитокинином является зеатин. В культурах *in vitro* чаще используют кинетин и зеатин [11] и бензиламинопуридин (БАП) – синтетический цитокинин. Цитокинины регулируют деление клеток, стимулируют пролиферацию адвентивных и придаточных побегов, ингибируют образование корней. Кроме того, они активируют синтез РНК. В культурах *in vitro* цитокинины используют в диапазоне концентраций 0.01–10.0 мг/л<sup>-1</sup>.

В целом цитокинины используются в культурах *in vitro* в присутствии ауксинов. Когда требуется только цитокинин, предполагается, что клетки продуцируют свои собственные ауксины [12].

В технологической схеме получения лекарственных препаратов на основе растительного сырья основополагающим требованием является наиболее полный переход из растений в лекарственную форму комплекса биологически активных веществ (БАВ), который определяет терапевтическую эффективность препарата и связан со многими технологическими факторами. На эффективность экстрагирования БАВ растений влияют различные факторы, такие как стандартность сырья, способ получения извлечения, концентрация экстрагента, продолжительность настаивания и др. [13].

Целью данной работы являлась разработка элементов технологической схемы получения фитопрепаратов на основе биотехнологического сырья *Iris* L. путем оптимизации условий для накопления и извлечения максимального количества фенольных соединений.

### Экспериментальная часть

*Растительный материал.* В качестве объектов исследования использовали растения, размноженные микроклонально (растения-регенеранты), которые далее выращивали в условиях гидропоники (гидропонтные) в отделе биотехнологии растений Алтайского государственного университета.

Работу проводили на основе общепринятых в биотехнологии растений методов [14]. При исследовании морфогенетических потенций органов и тканей в условиях *in vitro* использовали стандартную питательную среду MS [15].

Для регулирования процессов морфогенеза *in vitro* ириса в питательную среду вводили следующие фитогормоны: 6-бензиламинопури́н (БАП) Sigma, США,  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК) Sigma, США. В качестве основного углевода для культивирования органов и тканей добавляли сахарозу в концентрации 30 г/л.

В разработке биотехнологии микрклонального размножения *Iris sibirica* и *Iris spuria* нами использованы синтетические аналоги фитогормонов БАП, НУК и ИМК. На этапе собственно микроразмножения в питательные среды вводили БАП 2.5–10.0 мкМ, а также использовали среды, содержащие аналогичное количество цитокинина, дополненные ауксинами А (НУК 1.0 мкМ+ИМК 0.1 мкМ). Всего для опыта готовили восемь вариантов питательных сред. Контролем являлась среда, содержащая БАП 1.0 мкМ (на безгормональных средах ирисы не растут). Рассчитывали среднее значение коэффициента размножения и высоты растений, перемножая эти показатели, получали общую высоту растений.

Контейнеры с растениями располагали на стеллажах в культуральной комнате, где поддерживалась температура 20–30 °С, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения (2000–4000 лк) и 70% относительная влажность воздуха.

Сырье выращивали в условиях аэропоники. В работе была использована трехъярусная универсальная аэропонная установка, разработанная ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Ю.Ц. Мартиросян). Установка построена по принципу модульности и может быть использована для научно-исследовательских работ по селекции картофеля, а также для размножения и выращивания других сельскохозяйственных культур и лекарственных растений.

*Методы исследования.* Экстракцию проводили в аппарате Сокслета, последовательно извлекая биологически активные соединения петролейным эфиром, 96% этанолом, 60% этанолом, водой.

Процедура извлечения биологически активных соединений в субкритических условиях состояла в следующем: навеску в 0.5 г сухого среднеизмельченного исходного сырья помещали в экстрактор (цилиндрический толстостенный сосуд из нержавеющей стали внутренним объемом 20 мл), в который добавляли 18 мл растворителя. Экстрактор герметично закрывали и устанавливали в сушильный шкаф с заданной температурой 250 °С (точность термостатирования  $\pm 1$  °С) на 1 ч. Затем экстрактор охлаждали до комнатной температуры в емкости с холодной проточной водой. Пробу экстракта фильтровали через складчатый бумажный фильтр [16].

Определение содержания экстрактивных веществ проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.00006.15 [17]. Для количественного определения содержания флавоноидов в экстрактах использована методика, основанная на их способности образовывать окрашенный комплекс с раствором  $AlCl_3$  [18]. Количественное определение дубильных веществ проводили путем окисления перманганатом калия в присутствии индигокармина в соответствии с ОФС.1.5.3.00008.18. [19]. Содержание кумаринов определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 272 нм [20]. Количественное определение мангиферина и суммы ксантонов осуществляли по методике Т.А. Кукушкиной и коллег (2011) [21]. Сумму гидроксикоричных кислот определяли в соответствии с рекомендацией Бубенчиковой В.Н. [22].

*Статистическая обработка.* Все измерения проведены не менее чем в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов измерений проводили с помощью программы SigmaPlot 12.5.

### **Обсуждение результатов**

Целью пищевой и фармацевтической промышленности является разработка биотехнологий, позволяющих получать продукцию вторичных метаболитов растений, менее дорогостоящих, чем извлеченных из интактных растений (выращенных в естественных условиях) и дешевле, чем синтезированных. Исследования в этой области являются как фундаментальными, так и прикладными. Стратегию получения вторичных метаболитов из растительных тканей можно представить как многостадийный процесс (рис. 1), начальным этапом которого является выбор растения-донора, высокопродуктивного в отношении индивидуального вещества, или группы веществ.



Рис. 1. Технологическая схема получения и использования растительного сырья

*Клональное микроразмножение.* Следующим этапом является получение необходимого количества саженцев методами клонального микроразмножения. На данной стадии возможно, изменяя химический состав питательной среды, влиять на содержание вторичных метаболитов в тканях получаемых растений.

В результате наших исследований была доказана видоспецифичность реакции культуры ткани ириса на действие фитогормонов. *Iris sibirica* более отзывчив на повышение концентрации БАП. Достоверно различимым с контролем являлся вариант с 10.0 мкМ. Ауксины оказали положительное влияние на накопление биомассы в вариантах с 5.0+А, 7.5+А и 10.0+А. При этом максимальные значения общей высоты растения  $346 \pm 6.0$  мм отмечали при 5.0 мкМ БАП в сочетании с ауксинами (табл. 1). В случае с *Iris spuria* единственным достоверно различимым с контролем являлся вариант с 5.0+А. Данный вид ириса для полноценного развития предпочитает более низкое содержание цитокинина 1.0–5.0 БАП (табл. 2).

Низкие концентрации фитогормонов не вызывают формообразовательные процессы в культуре органов и ткани, в свою очередь излишне высокие – могут быть токсичными, приводя к остановке роста и последующей гибели растений. Из данных литературы известно, что накопление флавоноидов обычно коррелирует с морфогенезом растений [23]. Однако чаще всего такая корреляция имеет отрицательный коэффициент. Самая низкая концентрация БАП вызывает индуцированное накопление полифенолов, повышение концентрации – снижение содержания метаболитов, а высокие концентрации фитогормона угнетают как морфогенез, так и биосинтез биологически активных веществ [24–27].

У ирисов в целом, за некоторыми исключениями, высокие показатели производства биомассы оказывают негативное воздействие на соответствующие производство вторичных метаболитов (флавоноидов, дубильных, ксантонов, гидроксикоричных кислот) (рис. 2, 3). Исключение составляет накопление суммы флавоноидов в фитомассе *Iris sibirica*. С увеличением концентрации БАП выше 5.0 мкМ содержание флавоноидов в вариантах опыта растет. В связи с тем, что фитогормоны и их синтетические аналоги стоят дорого, для оптимального накопления биомассы и фенольных соединений (флавоноидов, дубильных, ксантонов, гидроксикоричных кислот) у *Iris sibirica* и *Iris spuria* в культуре ткани желательнее использовать среды, содержащие 1.0–2.5 мкМ БАП. С целью получения активно пролиферирующей культуры необходимо чередовать для *Iris sibirica* с 1 мкМ БАП+L-глутамин и аденин сульфат (100 мг/мл), для *Iris spuria* с безгормональной средой, содержащей L-глутамин и аденин сульфат (100 мг/мл) через один пассаж.

Основными определяющими факторами синтеза фенольных веществ является оптимальное для данного вида растения сочетание условий окружающей среды. Подобное мы наблюдали в культуре ткани ириса. Сбалансированная по минеральному и гормональному составу питательная среда позволяла побегам ириса активно наращивать биомассу и фенольные соединения. Показано, что наиболее интенсивно биосинтез фенольных соединений происходит в молодых активно вегетирующих органах.

Таблица 1. Количественное содержание некоторых групп полифенольных соединений в сырье *I. sibirica* сорт Стерх, % на а.с.в.

БАВ	Аэропонное сырье		Традиционное сырье	
	листья	корневища с корнями	листья	корневища с корнями
Флавоноиды	4.40±0.02	–	4.40±0.05	0.020±0.007
Дубильные вещества	0.49±0.08	1.02±0.1	2.69±0.07	3.62±0.07
Кумарины	0.10±0.05	–	0.82±0.06	0.40±0.04
Ксантоны	0.78±0.02	0.51±0.03	0.2±0.01	0.18±0.01

Таблица 2. Содержание биологически активных веществ в растениях-регенерантах *Iris spuria* сорт Art And Soul при традиционной экстракции (ТЭ) и в субкритических условиях (СКЭ), в % на а.с.в.

Растворитель	Экстрактивные		Флавоноиды		Дубильные	
	ТЭ	СКЭ	ТЭ	СКЭ	ТЭ	СКЭ
Петролейный эфир	0.225±0.06	–	0.01±0.001	–	0.2	–
96% этанол	2.0±0.9	4.2±0.3	0.53±0.01	1.05±0.01	0.68±0.46	1.34±0.17
60% этанол	1.2±0.2	6.30±0.03	0.39±0.03	0.70±0.03	0.34±0.01	1.21±0.01
Вода	1.1±0.5	6.6±0.7	0.24±0.01	0.75±0.01	0.84±0.23	1.21±0.01
Сумма	4.5	17.1	1.17	2.5	1.86	3.76

Рис. 2. Влияние гормонального состава питательных сред на накопление биомассы и содержание фенольных соединений в сырье растений-регенерантов *Iris sibirica* L. сорт Стерх

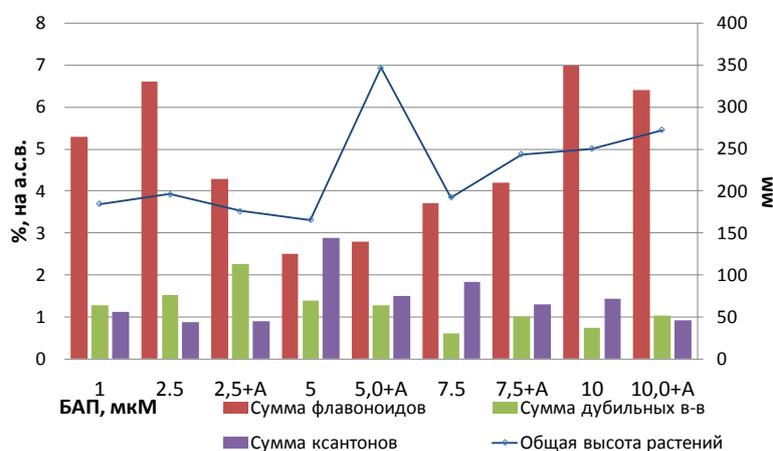
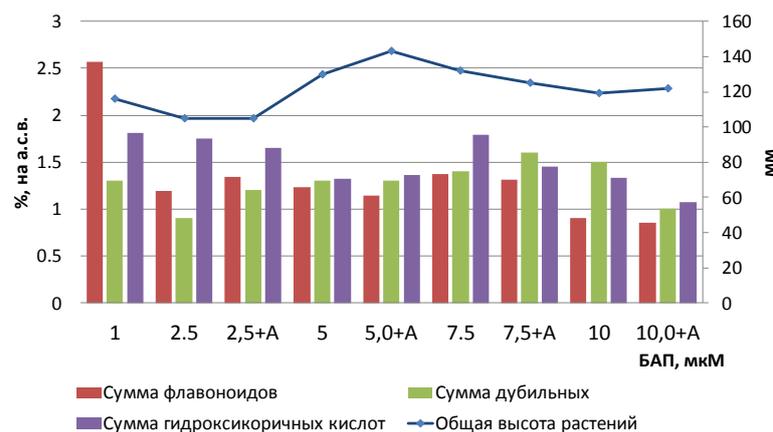


Рис. 3. Влияние гормонального состава питательных сред на накопление биомассы и содержание фенольных соединений в сырье растений-регенерантов *Iris spuria* сорт Art And Soul



Высокое содержание цитокинина вызывало стрессовую ситуацию, на первом этапе которой происходило массовое образование адвентивных и пазушных побегов, далее при повышении концентрации гормона коэффициент размножения снижался, растения прекращали размножаться, останавливались в росте и погибали. В экстремальных условиях фенольные соединения тратятся на выполнение защитных функций, в связи с чем происходило падение их общего уровня в тканях *Iris sibirica* и *Iris spuria*.

Аэропонное выращивание растений-регенерантов с целью получения биомассы является ключевым звеном в технологической схеме производства растительного сырья. На данный момент этот этап слабо от-

работан. Нами получены первые результаты выращивания сырья *I. sibirica* сорт Стерх. За 6 месяцев культивирования на площади 1 м<sup>2</sup> в аэропонной установке прирост массы составил 0.576 кг сухого сырья. Содержание фенольных соединений сравнивали с сырьем интактных 6-летних растений, заготовленных в окрестностях г. Новоалтайска Алтайского края в 2015 г. (традиционное сырье).

Как известно, качество фитопрепаратов определяется многими факторами. Эти факторы действуют от начала выращивания растений до момента использования готовых форм. Ряд ученых выделяют «внешние» факторы, касающиеся загрязнений растительного материала и продуктов из него (пестицидами, тяжелыми металлами, микроорганизмами), а также преднамеренного (фальсификация) или непреднамеренного (ошибочная идентификация растений) изменения состава фитопрепарата по сравнению со стандартом и «внутренние» факторы – это непостоянство химического состава из-за спонтанной внутривидовой изменчивости, непостоянство химического состава, не обусловленного генетическими факторами (из-за адаптационных эффектов, вызванных переменными внешней среды) [28].

Растительное сырье ириса, полученное на основе микрклонального размножения и выращивания в условиях аэропоники, позволяет избежать вышеперечисленные «внешние» и «внутренние» проблемы. Растительное сырье в условиях аэропонного выращивания не подвержено влиянию пестицидов, тяжелых металлов, загрязнению микроорганизмами. Исключена преднамеренная или ошибочная видовая фальсификация. Постоянные условия выращивания не влекут за собой изменения химического состава сырья.

Проведенные исследования качественного состава основных групп биологически активных веществ в траве аэропонного сырья *Iris sibirica* L. сорт Стерх показало наличие фенолоксилов, полифенолов, индофенолов, конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ, кумаринов и изокумаринов, ксантонов, флавоноидов [29].

В своей работе мы определяли количественное содержание некоторых веществ фенольной природы. Необходимо отметить влияние условий произрастания *I. sibirica* на количественные показатели полифенолов. Дубильных веществ и кумаринов в аэропонном сырье содержалось значительно меньше, чем в интактных растениях. Ксантоны накапливались в аэропонных листьях в 3.9 раза больше, а в корнях – в 2.7 раза, чем в традиционном сырье. Флавоноиды определяли в одинаковом количестве (табл. 1).

*Методы экстрагирования.* Методы экстрагирования растительного сырья в производстве фитопрепаратов подразделяют на периодические и непрерывные. Циркуляционную (последовательную) экстракцию в аппарате Сокслета относят к периодическим методам. Метод циркуляционной экстракции имеет следующие преимущества:

- 1) использование небольшого количества экстрагента;
- 2) создание высокой разности концентраций на границе раздела фаз (на сырье каждый раз поступает чистый экстрагент);
- 3) сокращение общей длительности экстрагирования;
- 4) достижение высокого выхода действующих веществ [13].

В результате последовательной экстракции биотехнологического сырья *Iris spuria* в аппарате Сокслета (ГЭ) различными растворителями установлено, что сырье содержало незначительное количество веществ, извлекаемых петролейным эфиром (4.8%), гораздо больше – 60% этанолом (27.9%) и водой (25.6%), доминирующей являлась фракция, извлекаемая 96% этанолом (46.5%) (рис. 4).

Под экстракцией в среде субкритической воды понимают экстракцию с использованием в качестве растворителя горячей воды под давлением (температура 100–374 °С). Это интенсивно развиваемые в последнее десятилетие методики для замены традиционных методов экстракции с использованием органических растворителей. Субкритическая водная экстракция – экологически дружелюбная методика, которая может обеспечить высокий выход экстракта из твердых образцов [30].

В научной литературе есть сведения о том, что проведено сравнение эффективности субкритической водной экстракции с традиционными методами (в аппарате типа Сокслет). Экстракты гвоздики (*Syzygium aromaticum*) демонстрировали, что количество эвгенола (1-окси-2-метокси-4-аллилбензол), полученного с использованием субкритической воды при 150 °С, сравнимо с извлеченным с применением традиционной экстракции. Эвгенол и его ацетаты обладают антиоксидантными свойствами, подобными другим естественным компонентам, типа α-токоферола [31].

В нашем эксперименте последовательно из одной и той же навески сырья извлекали БАВ разными растворителями (60% этанолом, 96% этанолом, водой) в субкритических условиях. При извлечении в субкрити-

ческих условиях (СКЭ) количество экстрагируемых веществ из сырья *Iris spuria* увеличивалось, а также менялось соотношение фракций. Доминирующей фракцией являлась вода (38.6%). Субкритической водой экстрагировалось в 6 раз больше, чем в традиционных условиях. 60% этиловым спиртом извлекалось 36.8%, что в 5.5 раза больше. Меньше всего извлекалось 96% этанолом в субкритических условиях (26.6%), что 2.1 раза больше, чем традиционно. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что извлечение экстрактивных веществ зависит от способа экстракции и от полярности растворителя. При традиционных условиях количество экстрактивных увеличивается с повышением полярности растворителя (96% этанол → 60% этанол → вода), в субкритических условиях картина кардинально меняется (вода → 60% этанол → 96% этанол) (рис. 4).

Для более полной фитохимической характеристики нового вида сырья *Iris spuria* нами изучен количественный состав и соотношение флавоноидов, дубильных веществ и гидроксикоричных кислот в разных фракциях и при различных видах экстракции. В субкритических условиях извлекалось больше флавоноидов и дубильных веществ: во фракции 96% этанол флавоноидов и дубильных – в 2 раза; во фракции 60% этанол флавоноидов – в 2 раза, дубильных – в 3 раза; во фракции вода флавоноидов – в 3 раза, дубильных – в 1.4 раза (табл. 2). Водой в аппарате Сокслет извлекалось  $2.03 \pm 0.30\%$  на а.с.в. гидроксикоричных кислот, водой в субкритических условиях –  $1.50 \pm 0.08\%$ , что в 1.3 раза меньше.

Дубильные вещества являются одними из наиболее важных вторичных метаболитов. В медицинской практике долгое время считалось, что основным фармакологическим эффектом всех дубильных веществ является проявление вяжущих свойств, в последнее время было доказано наличие антиоксидантной, ангиопротекторной, противоопухолевой и других видов активности, которая зависит от структурных особенностей молекул танинов [32]. В связи с этим поиск новых видов лекарственного растительного сырья, в составе которых содержатся дубильные вещества, является актуальной задачей.

Как было представлено выше (табл. 1), дубильных веществ в аэропонном сырье *I. sibirica* сорт Стерх содержалось значительно меньше, чем в интактных растениях. Но тем не менее есть способы регуляции накопления танинов в биотехнологическом сырье. Нами изучена зависимость накопления суммы дубильных веществ от гормонального состава питательных сред у двух представителей рода *Iris L.* Оптимальным для накопления биомассы *Iris sibirica* и *Iris spuria* является среда с 5.0+A, при этом содержание дубильных веществ в сырье незначительное, в два раза меньше максимального уровня. Наибольшее количество метаболитов *Iris spuria* накапливает в контрольном варианте питательной среды с наименьшей концентрацией БАП (1.0), *Iris sibirica* – при 2.5+A (рис. 5).

Из вышесказанного следует, что если *Iris sibirica* выращивать на питательных средах с 2.5 мкМ БАП+1.0 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК, то содержание танинов составит  $2.3 \pm 0.2\%$  на а.с.в., что в 5 раз больше, чем на безгормональной среде MS в условиях аэропоники.

Другим способом увеличения количества извлеченных танинов может быть экстракция водой в субкритических условиях. Нами проведено сравнительное изучение количественного содержания суммы дубильных веществ в траве и корневищах с корнями аэропонного сырья *Iris sibirica L.* сорт Стерх разного способа извлечения. Как следует из представленных данных, в условиях субкритики водой извлекается в 3.6 раза больше дубильных веществ из травы и в 2 раза больше из корневищ. В связи с этим последний способ извлечения является более предпочтительным (табл. 3).

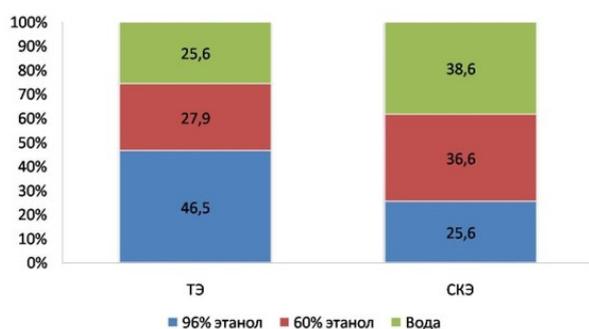


Рис. 4. Содержание экстрактивных веществ в растениях-регенерантах *Iris spuria* сорт Art And Soul при традиционной экстракции (ТЭ) и в субкритических условиях (СКЭ)

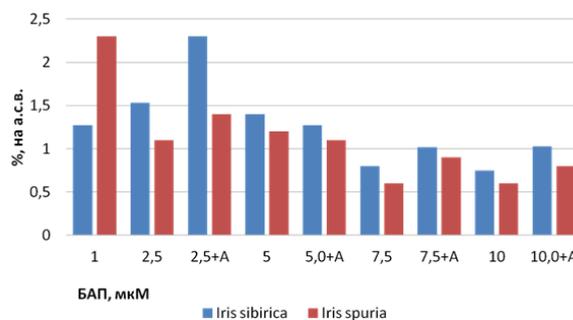


Рис. 5. Влияние гормонального состава питательных сред на накопление биомассы и содержание суммы дубильных веществ в сырье растений-регенерантов *Iris sibirica* и *Iris spuria*

Таннины делятся на две основные группы, в зависимости от их химической структуры и свойств: гидролизуемые (НТ) и конденсированные таннины (СТ). К первому классу – гидролизуемым дубильным веществам – относятся гликозиды галловой кислоты (галлотанины) и гликозиды эллаговой кислоты (эллаготанины). Второй класс – конденсированные дубильные вещества (так называемые проантоцианидины) – представлен полимерами флаван-3-ол мономерных субъединиц, таких как (+)-катехин, (-)-эпикатехин и их галлаты. Конденсированные дубильные вещества состоят из флаваноидных единиц (флаван-3-ол), связанных углерод-углеродными связями. Они встречаются у многих видов растений, таких как *Acacia* spp, *Sericea lespedeza*, а также у пастбищных видов, таких как *Lotus* spp. Гидролизуемые таннины обычно встречаются в более низких концентрациях в растениях, чем СТ [33, 34].

Соотношение конденсированных и гидролизуемых танинов в аэропонном сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх при традиционной экстракции определяли как 13 : 1, при экстракции в субкритических условиях – 8 : 1 (табл. 4).

Таблица 3. Определение суммы дубильных веществ в аэропонном сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх в пересчете на таннин, % на а.с.в. (n=10, P=0.95)

Вид сырья	Традиционная водная экстракция	Экстракция водой в субкритических условиях
Трава	0.49±0.01	1.77±0.01
Корневища с корнями	1.02±0.01	2.04±0.03

Таблица 4. Конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества в сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх разного способа извлечения, % на а.с.в. в соответствии с рекомендациями Л.М. Федосевой [42]

Сырье, способ извлечения	Сумма дубильных веществ	СТ (конденсированные)	НТ (гидролизуемые)	Влажность, %
Трава, ТЭ	0.49±0.01	0.455±0.004	0.035±0.005	6.14
Трава, СКЭ	1.77±0.01	1.59±0.002	0.18±0.007	6.14
Регенеранты, СКЭ	2.27±0.04	2.03±0.03	0.24±0.001	5.17

### Заключение

Стратегию получения вторичных метаболитов из растительных тканей можно представить как многостадийный процесс, начальным этапом которого является выбор растения-донора, высокопродуктивного в отношении индивидуального вещества, или группы веществ. На следующем этапе преследуют две цели: получение максимального количества биомассы и накопление биологически активных веществ.

Для оптимального накопления биомассы и фенольных соединений (флавоноидов, дубильных, ксантонов, гидроксикоричных кислот) у *Iris sibirica* и *Iris spuria* в культуре ткани желательно использовать среды, содержащие 1.0–2.5 мкМ БАП. С целью получения активно пролиферирующей культуры необходимо чередовать для *Iris sibirica* с 1 мкМ БАП+L-глутамин и аденин сульфат (100 мг/мл), для *Iris spuria* с безгормональной средой, содержащей L-глутамин и аденин сульфат (100 мг/мл) через один пассаж. Высокое содержание цитокинина вызывало стрессовую ситуацию, на первом этапе которой происходило массовое образование адвентивных и пазушных побегов, далее при повышении концентрации гормона коэффициент размножения снижался, растения прекращали размножаться, останавливались в росте и погибали. В экстремальных условиях фенольные соединения тратятся на выполнение защитных функций, в связи с чем происходило падение их общего уровня в тканях ирисов.

Для биотехнологического сырья представителей *Iris* L. проведено сравнение эффективности субкритической последовательной экстракции с традиционными методами (в аппарате типа Сокслет). В субкритических условиях извлекалось больше флавоноидов и дубильных веществ: во фракции 96% этанол флавоноидов и дубильных – в 2 раза; во фракции 60% этанол флавоноидов – в 2 раза, дубильных – в 3 раза; во фракции вода флавоноидов – в 3 раза, дубильных – в 1.4 раза. Водой в аппарате Сокслет извлекалось 2.03±0.30% на а.с.в. гидроксикоричных кислот, водой в субкритических условиях – 1.50±0.08%, что в 1.3 раза меньше.

Соотношение конденсированных и гидролизуемых танинов в аэропонном сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх при традиционной экстракции определяли как 13 : 1, при экстракции в субкритических условиях – 8 : 1.

## Список литературы

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. М., 1996. 45 с.
2. Борисова Г.Г., Ермошин А.А., Малева М.А., Чукина Н.В. Основы биохимии вторичного обмена растений. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. 128 с.
3. Tumova L., Rimakova J., Tuma J., Dusck J. *Silybum marianum in vitro* – flavolignan production // Plant Cell Environ. 2006. Vol. 52. Pp. 454–458. DOI: 10.17221/3466-PSE.
4. Karppinen K., Hokkanen J., Tolonen A., Malttila S., Hohtola A. Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum* // Phytochem. 2007. Vol. 68. Pp. 1038–1045. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.01.001.
5. Базарнова Н.Г., Ильичёва Т.Н., Тихомирова Л.И., Синицина А.А. Скрининг химического состава и биологической активности *Iris sibirica* L. сорт Cambridge // Химия растительного сырья. 2016. №3. С. 49–57. DOI: 10.14258/jcprgm.2017011527.
6. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Халявин И.А. Элементный состав *Iris sibirica* L. в культуре *in vitro* // Химия растительного сырья. 2017. №2. С. 119–126. DOI: 10.14258/jcprgm.2017021517.
7. Базарнова Н.Г., Тихомирова Л.И., Синицына А.А., Афанасенкова И.В. Сравнительный анализ химического состава растительного сырья *Iris sibirica* L. // Химия растительного сырья. 2017. №1. С. 137–144. DOI: 10.14258/jcprgm.2017042741.
8. Tikhomirova L. Morphogenesis and histology of cultures of *Iris ensata* Thunb. Generative organs // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2017. Vol. 53. N3. Pp. 270–273. DOI: 10.1007/s11627-017-9817-6.
9. Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Биосинтез фенольных соединений в суспензионной культуре гречи татарской и способы его активации // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. В 2 частях. Иркутск, 2018. С. 1229–1233. DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1229-1233.
10. Загоскина Н.В., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения: некоторые аспекты образования полифенолов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 32–35.
11. Morini S., D'Onofrio C., Bellocchi G., Fisichella M. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves // Plant Cell Tissue Org Cult. 2000. Vol. 63. Pp. 47–55. DOI: 10.1023/A:1006456919590.
12. Aremu A.O., Gruz J., Subrtová M., Szucová L., Dolezal K. Antioxidant and phenolic acid profiles of tissue cultured and acclimatized *Merwillia plumbea* plantlets in relation to the applied cytokinins // J Plant Physiol. 2013. Vol. 170. Pp. 1303–1308. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.04.008.
13. Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. М.: ГЕОТАР-МЕД, 2004. 560 с.
14. Калинин Ф.Л., Сариацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 488 с.
15. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaya with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N4. P. 473.
16. Ветрова Е.В., Максименко Е.В., Борисенко С.Н., Лекарь А.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Экстракция антиоксидантов рутина и кверцетина из бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.) в среде субкритической воды // Сверхкритические флюиды. Теория и практика. 2016. Т. 11. №4. С. 73–79.
17. ОФС.1.5.3.00006.15. Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. М., 2015. 5 с.
18. Музыкакина Р.А. Технология производства и анализ фитопрепаратов. Алматы, 2011. 360 с.
19. ОФС.1.5.3.00008.18. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. М., 2018. 4 с.
20. Кукушкина Т.А., Зиннер Н.С., Высочина Г.И., Свиридова Т.П. Содержание ксантонов в надземной части растений *Hedysarum theinum* Krasnob. и *H. alpinum* L. (fabaceae) при выращивании в Сибирском ботаническом саду (Томск) // Химия растительного сырья. 2011. №3. С. 113–116.
21. Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Разработка и валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в растениях рода тимьян // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. №5. С. 14–18.
22. Pasqua G., Avato P., Monacelli B., Santamaria A.R., Argentieri M.P. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv.Topas // Plant Science. 2003. Vol. 165. Pp. 977–982. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00275-9.
23. Stafford A. Natural Products and Metabolites from Plants and Plant Tissue Cultures // Plant Cell and Tissue Culture. Open University Press, Buckingham, UK, 1991. Pp 124–238.
24. Palacio L., Cantero J.J., Cusidoc R.M., Goleniowska M.E. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.) // Plant Sci. 2012. Vol. 193–194. Pp. 1–7. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.05.007.
25. Karalija E., Parić A. The effect of BA and IBA on the secondary metabolite production by shoot culture of *Thymus vulgaris* L. // Biol. Nyssana. 2011. Vol. 2. Pp. 29–35.

26. Danova K., Čellárová E., Macková A., Daxnerová Z., Kapchina-Toteva V. In vitro culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids // In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant. 2010. Vol. 46. Pp. 422–429. DOI: 10.1007/s11627-010-9299-2.
27. Santiago L., Louro R. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* and their induction by copper sulphate // Annals of botany. 2000. Vol. 86. Pp. 1023–1032. DOI: 10.1006/anbo.2000.1271.
28. Морозов С.В., Ткачева Н.И., Ткачев А.В. Проблемы комплексного химического профилирования лекарственных растений // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 5–28. DOI: 10.14258/jcrpm.2018044003.
29. Миронова С.О., Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г. Изучение водных экстрактов биотехнологического сырья *Iris sibirica* L., полученных в субкритических условиях // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. Бийск, 2018. С. 254–257.
30. Борисенко Н.И. Развитие методологии использования субкритической воды для получения физиологически активных субстанций на основе растительных метаболитов: дис. ... докт. хим. наук. Ростов-на-Дону, 2014. 284 с.
31. Okuda T., Ito H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants – Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins // Molecules. 2011. Vol. 16(3). Pp. 2191–2217. DOI: 10.3390/molecules16032191.
32. Hassanpour S., Maheri-Sis N., Eshratkhan B., Mehmandar F.B. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review // Int. J. Forest, Soil and Erosion. 2001. Vol. 1(1). Pp. 47–53. DOI: 10.1007/s00468-016-1438-x.
33. Антонова Н.П., Калинин А.М., Прохвятилова С.С., Шефер Е.П., Матвеевкова Т.Е. Оценка эквивалентности методов определения дубильных веществ, используемых для анализа лекарственного растительного сырья // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2015. №1. С. 11–16.
34. Федосеева Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае // Химия растительного сырья. 2005. №3. С. 45–50.

Поступила в редакцию 27 августа 2019 г.

После переработки 22 февраля 2020 г.

Принята к публикации 23 февраля 2020 г.

**Для цитирования:** Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Бондарев А.А., Пономарёва Я.В., Миронова С.О. Выбор оптимальных условий накопления и извлечения фенольных соединений из биотехнологического сырья представителей *Iris* L. // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 249–260. DOI: 10.14258/jcrpm.2020026333.

*Tikhomirova L.I.\**, *Bazarnova N.G.*, *Bondarev A.A.*, *Ponomareva Ya.V.*, *Mironova S.O.* SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR ACCUMULATION AND EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BIOTECHNOLOGICAL RAW MATERIALS OF IRIS L. REPRESENTATIVES

*Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: L-tikhomirova@yandex.ru*

For optimal accumulation of biomass and phenolic compounds (flavonoids, tannins, xanthonenes, hydroxycinnamic acids) from *Iris sibirica* and *Iris spuria* in tissue culture, it is desirable to use a medium containing 1.0 to 2.5  $\mu\text{M}$  BAP. The high content of cytokinin caused a stressful situation, at the first stage of which there was a mass formation of adventitious and axillary shoots, then with an increase in the concentration of the hormone, the reproduction coefficient decreased, the plants stopped reproducing, stopped growing and died. In extreme conditions, phenolic compounds are spent on the performance of protective functions, in connection with which there was a drop in their overall level in the tissues of irises.

For biotechnological raw materials of *Iris L.* representatives, the efficiency of subcritical sequential extraction was compared with traditional methods (in Soxhlet type apparatus). In subcritical conditions have been removed more flavonoids and tannins: in fraction 96% ethanol of flavonoids and tannins – in 2 times; at a fraction of 60% ethanol flavonoids – 2 times, tanning – 3 times; at a fraction of the water of flavonoids in 3 times, tanning – 1.4 times. The water in the apparatus of Soxhlet extracted 1.3 times more hydroxycinnamic acids than in subcritical conditions.

The ratio of condensed and hydrolyzable tannins in aeroponic raw material of *Iris sibirica L.* varieties Sterkh traditional extraction was determined as 13 : 1, the extraction in subcritical conditions 8 : 1.

**Keywords:** *Iris sibirica L.*, *Iris spuria L.*, secondary metabolites, regenerated plants, biotechnology for the production of medicinal plants, extraction method.

### References

1. Zaprometov M.N. *Fenol'nyye soyedineniya i ikh rol' v zhizni rasteniya*. [Phenolic compounds and their role in plant life]. Moscow, 1996, 45 p. (in Russ.).
2. Borisova G.G., Yermoshin A.A., Maleva M.A., Chukina N.V. *Osnovy biokhimii vtorichnogo obmena rasteniy*. [Fundamentals of biochemistry of secondary metabolism of plants]. Yekaterinburg, 2014, 128 p. (in Russ.).
3. Tumova L., Rimakova J., Tuma J., Dusck J. *Plant Cell Environ.*, 2006, vol. 52, pp. 454–458. DOI: 10.17221/3466-PSE.
4. Karppinen K., Hokkanen J., Tolonen A., Malttila S., Hohtola A. *Phytochem.*, 2007, vol. 68, pp. 1038–1045. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.01.001.
5. Bazarnova N.G., Il'ichova T.N., Tikhomirova L.I., Sinitsina A.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2016, no. 3, pp. 49–57. DOI: 10.14258/jcprm.2017011527. (in Russ.).
6. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Khalyavin I.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2017, no. 2, pp. 119–126. DOI: 10.14258/jcprm.2017021517. (in Russ.).
7. Bazarnova N.G., Tikhomirova L.I., Sinitsyna A.A., Afanasenkova I.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2017, no. 1, pp. 137–144. DOI: 10.14258/jcprm.2017042741. (in Russ.).
8. Tikhomirova L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 2017, vol. 53, no. 3, pp. 270–273. DOI: 10.1007/s11627-017-9817-6.
9. Gumerova Ye.A., Akulov A.N., Rumyantseva N.I. *Mekhanizmy ustoychivosti rasteniy i mikroorganizmov k neblagopriyatnym usloviyam sredy. Sbornik materialov Godichnogo sobraniya Obshchestva fiziologov rasteniy Rossii, Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem i shkoly molodykh uchenykh*. [Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to adverse environmental conditions. The collection of materials of the Annual Meeting of the Society of Plant Physiologists of Russia, the All-Russian Scientific Conference with international participation and the school of young scientists.]. Irkutsk, 2018, pp. 1229–1233. DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1229-1233. (in Russ.).
10. Zagorskina N.V., Zaprometov M.N. *Biologiya kul'tiviruyemykh kletok i biotekhnologiya rasteniy*. [Cultured cell biology and plant biotechnology]. Moscow, 1991, pp. 32–35. (in Russ.).
11. Morini S., D'Onofrio C., Bellocchi G., Fisichella M. *Plant Cell Tissue Org Cult.*, 2000, vol. 63, pp. 47–55. DOI: 10.1023/A:1006456919590.
12. Aremu A.O., Gruz J., Subrtová M., Szucová L., Dolezal K. *J Plant Physiol.*, 2013, vol. 170, pp. 1303–1308. DOI: 10.1016/j.jplph.2013.04.008.
13. Minina S.A., Kaukhova I.Ye. *Khimiya i tekhnologiya fitopreparatov*. [Chemistry and technology of phytopreparations]. Moscow, 2004, 560 p. (in Russ.).
14. Kalinin F.L., Sariatskaya V.V., Polishchuk V.Ye. *Metody kul'tury tkaney v fiziologii i biokhimii rasteniy*. [Methods of tissue culture in the physiology and biochemistry of plants]. Kiev, 1980, 488 p. (in Russ.).
15. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, no. 4, p. 473.
16. Vetrova Ye.V., Maksimenko Ye.V., Borisenko S.N., Lekar' A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Sverkhkriticheskiye flyuidy. Teoriya i praktika*. 2016, vol. 11, no. 4, pp. 73–79. (in Russ.).
17. *OFS.1.5.3.0006.15. Opredeleniye soderzhaniya ekstraktivnykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'ye i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatakh*. [OFS.1.5.3.0006.15. Determination of the content of extractive substances in medicinal plant materials and medicinal herbal preparations]. Moscow, 2015, 5 p. (in Russ.).

\* Corresponding author.

18. Muzychkina R.A. *Tekhnologiya proizvodstva i analiz fitopreparatov*. [Production technology and analysis of herbal remedies]. Almaty, 2011, 360 p. (in Russ.).
19. OFS.1.5.3.0008.18. Opredeleniye soderzhaniya dubil'nykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'ye i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatakh. [OFS.1.5.3.0008.18. Determination of the content of tannins in medicinal plant materials and herbal medicines]. Moscow, 2018, 4 p. (in Russ.).
20. Kukushkina T.A., Zinner N.S., Vysochina G.I., Sviridova T.P. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2011, no. 3, pp. 113–116. (in Russ.).
21. Bubenchikova V.N., Starchak Yu.A. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*, 2015, no. 5, pp. 14–18. (in Russ.).
22. Pasqua G., Avato P., Monacelli B., Santamaria A.R., Argentieri M.P. *Plant Science*, 2003, vol. 165, pp. 977–982. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00275-9.
23. Stafford A. *Plant Cell and Tissue Culture*. Open University Press, Buckingham, UK, 1991, pp. 124–238.
24. Palacio L., Canterob J.J., Cusidoc R.M., Goleniowska M.E. *Plant Sci.*, 2012, vol. 193–194, pp. 1–7. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.05.007.
25. Karalija E., Parić A. *Biol. Nyssana*, 2011, vol. 2, pp. 29–35.
26. Danova K., Čellárová E., Macková A., Daxnerová Z., Kapchina-Toteva V. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 2010, vol. 46, pp. 422–429. DOI: 10.1007/s11627-010-9299-2.
27. Santiago L., Louro R. *Annals of botany*, 2000, vol. 86, pp. 1023–1032. DOI: 10.1006/anbo.2000.1271.
28. Morozov S.V., Tkacheva N.I., Tkachev A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 5–28. DOI: 10.14258/jcprm.2018044003. (in Russ.).
29. Mironova S.O., Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G. *Tekhnologii i oborudovaniye khimicheskoy, biotekhnologicheskoy i pishchevoy promyshlennosti. Materialy XI Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiyem*. [Technologies and equipment of the chemical, biotechnological and food industries. Materials of the XI All-Russian scientific-practical conference of students, graduate students and young scientists with international participation]. Biysk, 2018, pp. 254–257. (in Russ.).
30. Borisenko N.I. *Razvitiye metodologii ispol'zovaniya subkriticheskoy vody dlya polucheniya fiziologicheskii aktivnykh substansiy na osnove rastitel'nykh metabolitov: dis. ... dokt. khim. nauk*. [Development of a methodology for the use of subcritical water to obtain physiologically active substances based on plant metabolites: dis. ... doc. Chem. sciences]. Rostov-on-Don, 2014, 284 p. (in Russ.).
31. Okuda T., Ito H. *Molecules*, 2011, vol. 16(3), pp. 2191–2217. DOI: 10.3390/molecules16032191.
32. Hassanpour S., Maheri-Sis N., Eshratkhan B., Mehmandar F.B. *Int. J. Forest, Soil and Erosion*, 2001, vol. 1(1), pp. 47–53. DOI: 10.1007/s00468-016-1438-x.
33. Antonova N.P., Kalinin A.M., Prokhvatilova S.S., Shefer Ye.P., Matveyenkova T.Ye. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*, 2015, no. 1, pp. 11–16. (in Russ.).
34. Fedoseyeva L.M. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2005, no. 3, pp. 45–50. (in Russ.).

Received August 27, 2019

Revised February 22, 2020

Accepted February 23, 2020

**For citing:** Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Bondarev A.A., Ponomareva Ya.V., Mironova S.O. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 2, pp. 249–260. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020026333.