



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01H 4/00 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022116016, 14.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.06.2022

Дата регистрации:
26.12.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.06.2022

(45) Опубликовано: 26.12.2022 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Токтаревой
Т.М.

(72) Автор(ы):

Маслова Елена Владимировна (RU),
Семькина Валерия Витальевна (RU),
Тимошичева Анастасия Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: АБДУРАХМАНОВ Б.А. и др.
Технология получения из отходов переработки
травы *Hypericum perforatum* L. субстанции,
обладающей ростостимулирующей
активностью, Химия растительного сырья,
2019, N1, с. 281-288. RU 2568912 C1, 20.11.2015.
RU 2771960 C1, 16.05.2022. MURASHIGE T, A
revised medium for rapid growth and with tohoco
tissues cultures., *Physiol* (см. прод.)

(54) Способ получения субстанции из каллусных культур зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.)

(57) Реферат:

Способ получения субстанции из каллусных культур зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) относится к области биотехнологии. Способ осуществляют путем ступенчатой стерилизации семян зверобоя продырявленного, для чего первоначально обрабатывают растительные экспланты в мыльном растворе, затем отмывают дистиллированной водой, далее в ламинарном боксе помещают в 70% спирт на 1 минуту, а затем в основной стерилизующий раствор, которым выступает белизна 50% или 100% при воздействии в течение 10-20 минут, или перекись водорода 36% при воздействии в течение 15 минут, или сулема 0,1% при воздействии в течение не более 15 минут. Далее семена отмывают автоклавированной дистиллированной

водой в трёхкратной повторности по 15 минут и помещают растительные экспланты на питательную среду Мурасиге и Скуга без использования фитогормонов для получения проростков, культивируют в термостате при температуре 24°C. Полученные проростки в стерильных условиях разрезают и помещают на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина для индукции каллусогенеза. Через 28-30 дней получают каллусную культуру, которую высушивают при температуре не выше 40°C и далее измельчают. Затем готовят экстракт путем растворения 1 части каллусной культуры в двух частях 40% спирта, перемешивают и

центрифугируют 15 минут на скорости 10000 оборотов с последующим сливанием жидкости в пустую стерильную пробирку, повторяют процедуру и сливают жидкость в ту же пробирку, снова заливают 40% спиртом, перемешивают и ставят в холодильник отстаиваться на сутки при температуре 4°C, затем вновь центрифугируют, сливают жидкость в ту же пробирку и высушивают полученный экстракт. Заявленный способ позволяет получить субстанцию с

антиоксидантными и антибактериальными свойствами, в том числе в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, методом культивирования растительных клеток и тканей *Hupéricum perforátum* L., причем процесс получения каллусной культуры осуществляется в лабораторных условиях и не связан с выращиванием и сбором растений в поле. 2 ил., 5 пр.

(56) (продолжение):

Plantarum. -1962, N 15, p.475-477.

R U 2 7 8 6 9 1 1 C 1

R U 2 7 8 6 9 1 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01H 4/00 (2022.08)

(21)(22) Application: **2022116016, 14.06.2022**

(24) Effective date for property rights:
14.06.2022

Registration date:
26.12.2022

Priority:

(22) Date of filing: **14.06.2022**

(45) Date of publication: **26.12.2022** Bull. № 36

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):

**Maslova Elena Vladimirovna (RU),
Semykina Valeriya Vitalevna (RU),
Timoshicheva Anastasiya Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR OBTAINING SUBSTANCE FROM CALLUS CULTURES OF ST. JOHN'S WORT (HYPERICUM PERFORATUM L.)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for obtaining the substance from callus cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) relates to the field of biotechnology. The method is carried out by stepwise sterilization of the seeds of St. John's wort, for which plant explants are initially treated in a soapy solution, then washed with distilled water, then placed in a laminar box in 70% alcohol for 1 minute, and then into the main sterilizing solution, which is whiteness 50% or 100% when exposed for 10-20 minutes, or hydrogen peroxide 36% when exposed for 15 minutes, or sublimate 0.1% when exposed for no more than 15 minutes. Next, the seeds are washed with autoclaved distilled water three times for 15 minutes and the plant explants are placed on the Murashige and Skoog nutrient medium without the use of phytohormones to obtain seedlings, cultivated in a thermostat at a temperature of 24°C. The resulting seedlings are cut under sterile conditions and placed on a Murashige and Skoog nutrient medium with the addition of phytohormones 0.2 mg/l indoleacetic acid

and 0.5 mg/l kinetin to induce callusogenesis. After 28-30 days, a callus culture is obtained, which is dried at a temperature not exceeding 40°C and then crushed. Then an extract is prepared by dissolving 1 part of the callus culture in two parts of 40% alcohol, mixed and centrifuged for 15 minutes at a speed of 10,000 revolutions, followed by pouring the liquid into an empty sterile tube, repeat the procedure and pouring the liquid into the same tube, pour 40% alcohol again, mix and put in a refrigerator to settle for a day at a temperature of 4°C, then centrifuge again, pour the liquid into the same test tube and dry the resulting extract.

EFFECT: method allows to obtain a substance with antioxidant and antibacterial properties, including against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, by cultivating plant cells and tissues of *Hypericum perforatum* L., and the process of obtaining a callus culture is carried out in laboratory conditions and is not associated with growing and collecting plants in field.

1 cl, 2 dwg, 5 ex

RU 2 786 911 C1

RU 2 786 911 C1

Изобретение относится к области биотехнологии, фармации, медицины, сельского хозяйства.

В пат. RU 2771960 A01H 4/00 (2006.01) предложен способ введения в культуру *in vitro*, получения каллусов и растений-регенерантов вздутоплодника сибирского (PHLOJODICARPUS SIBIRICUS (STEPH.) K.-POL.), с использованием в качестве первичных эксплантов вегетативных или генеративных органов. Заявленный способ обеспечивает получение каллусных культур и растений-регенерантов вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.), относящегося к редким лекарственным видам растений, с целью сохранения и воспроизводства как в природе, так и питомниках, а также для дальнейшего использования каллусов в качестве ценного источника вторичных метаболитов. Способ микроклонального размножения *in vitro* вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) осуществляют на питательной среде Мурасиге-Скуга из соцветий, оберточного листа и корня материнского растения.

Недостатком данного способа является невозможность его использования для других видов растений, например, для *Hypericum perforatum* L. (зверобоя продырявленного), так как известно, что каждое растение требует своих индивидуально подобранных стерилизаторов, времени воздействия и концентрации и определенного состава питательных сред и регуляторов роста для выращивания растений регенерантов и каллусных тканей.

В статье Бабаян А.М., Исаджян С.А., Петросян М.Т., Саакян Н.Ж., Грчунян А.А. Оценка антимикробной и антиоксидантной активностей изолированной культуры (интернет ссылка: <https://publikacia.net/archive/2014/6/1/9?>) предложен способ получения каллусных тканей растений с антибактериальной и антиоксидантной активностью из растений зверобоя вытянутого (*Hypericum elongatum* Ledeb.) .

Особенностью данного способа является то, что он предназначен для получения каллусных тканей для другого вида, а именно зверобой вытянутый (*Hypericum elongatum* Ledeb.), а не для зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), что обусловило использование других регуляторов роста и их концентраций. Так, авторы получали каллусные ткани на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС), отличающейся составом фитогормонов 0.5мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК), 1.0 мг/л кинетина и 0.2мг/л гиббереллиновой кислоты (ГК).

Из статьи Е.Н. Щербакова, А.Н. Арзуманян, Ю.Г. Попов, Ереван, 2004 г. Фармакологическое действие вторичных метаболитов изолированных культур некоторых растений рода *Hypericum* (интернет ссылка:

<https://www.lekrs.ru/%d1%84%d0%b0%d1%80%d0%bc%d0%b0%d0%ba%d0%be%d0%bb%d0%be%d0%b3%d0%b8%d1%87%d0%b5%d1%81%d0%ba%d0%be%d0%b5%d0%b4%d0%b5%d0%b9%d1%81%d1%82%d0%b2%d0%b8%d0%b5%d0%b2%d1%82%d0%be%d1%80%d0%b8%d1%87%d0%bd%d1%8b/>)

известно, что антибактериальную активность проявляют экстракты как каллусных тканей, так и интактных растений исследуемых видов зверобоя, причем активность экстрактов из каллусных тканей была выше. Согласно полученным данным ни каллусные ткани, ни интактные растения *H. perforatum*, не ингибировали рост *Escherichia coli*.

Следовательно, есть потребность в разработке способа получения субстанций на основе каллусных культур *Hypericum perforatum* L. в лабораторных условиях, обладающих подтвержденной антиоксидантной и антибактериальной активностью, в том числе в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Техническая задача – разработка способа получения субстанций на основе каллусных культур *Hupéricum perforátum* L. в лабораторных условиях, обладающих подтвержденной антиоксидантной и антибактериальной активностью.

Технический результат заключается в получении субстанции с антиоксидантными и антибактериальными свойствами, в том числе в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, методом культивирования растительных клеток и тканей *Hupéricum perforátum* L., причем процесс получения каллусной культуры осуществляется в лабораторных условиях и не связан с выращиванием и сбором растений в поле.

Решение технической задачи достигается предложенным способом получения субстанции на основе каллусных культур *Hupéricum perforátum* L., который характеризуется тем, что в качестве растительных эксплантов используют семена растений, которые дезинфицируют ступенчатой стерилизацией. Для этого первоначально обрабатывают растительные экспланты в мыльном растворе, затем отмывают дистиллированной водой, далее в ламинарном боксе помещают в 70% спирт на 1 минуту, а затем в основной стерилизующий раствор, которым выступает белизна 50% или 100% при воздействии в течение 10-20 минут, или перекись водорода 36% при воздействии в течение 15 минут, или сулема 0,1% при воздействии в течение не более 15 минут. Далее семена отмывают автоклавированной дистиллированной водой в трёхкратной повторности по 15 минут и помещают растительные экспланты на питательную среду Мурасиге и Скуга, без использования фитогормонов для получения проростков, культивируют в термостате при температуре 24°C. Полученные проростки в стерильных условиях разрезают и помещают на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 0,2 мг/л ИУК (индолил-уксусная кислота) и 0,5 мг/л кинетина для индукции каллусогенеза. Через 28-30 дней получают каллусную культуру, которую высушивают при температуре не выше 40°C и далее измельчают и готовят экстракт, для чего 1 грамм исследуемого объекта измельчают, добавляют 2 мл 40% спирта, перемешивают и центрифугируют 15 минут на скорости 10000 оборотов, с последующим сливанием жидкости в пустую стерильную пробирку. Повторно добавляют растворитель и повторяют смешивание и центрифугирование, потом сливают жидкость в ту же пробирку, снова заливают растворителем, перемешивают и ставят в холодильник отстаиваться на сутки при температуре 4°C. Через сутки снова повторяют перемешивание и центрифугирование, сливают жидкость в ту же пробирку и высушивают полученный экстракт.

Изобретение характеризуется на следующих графических изображениях.

Фиг. 1 – Антибактериальная активность *Hupéricum perforátum*

Фиг. 2 – Антиоксидантная активность *Hupéricum perforátum*

Новизна и изобретательский уровень заявленного способа подтверждается тем, что из уровня техники не выявлены состав и концентрация используемых фитогормонов, для получения субстанции с антиоксидантными и антибактериальными свойствами, в том числе в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, а также способ стерилизации растительных эксплантов при введении семян зверобоя продырявленного в условиях *in vitro*.

Примеры получения субстанции из каллусных культур зверобоя продырявленного (*Hupéricum perforátum* L.), обладающей антимикробной и антиоксидантной активностью.

Пример 1

Первоначально обрабатывают растительные экспланты в мыльном растворе, затем отмывают дистиллированной водой, далее в ламинарном боксе помещают в 70% спирт на 1 минуту, а затем в основной стерилизующий раствор, которым выступает белизна

50% для воздействия в течение 20 минут. Далее семена отмывают автоклавированной дистиллированной водой в трёхкратной повторности по 15 минут и помещают растительные экспланты на питательную среду Мурасиге и Скуга, без использования фитогормонов для получения проростков, культивируют в термостате при температуре 24°C. Полученные проростки в стерильных условиях разрезают и помещают на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 0,2 мг/л ИУК (индолил-уксусная кислота) и 0,5 мг/л кинетина для индукции каллусогенеза. Через 28-30 дней получают каллусную культуру, которую высушивают при температуре не выше 40°C и далее измельчают и готовят спиртовой экстракт, для чего 1 грамм порошка измельчают в ступке при помощи пестика, затем добавляют 2 мл 40% спирта и перемешивают при помощи «Вортекса», далее центрифугируют 15 минут. Надосадочную жидкость, полученную в результате центрифугирования сливают в пустую стерильную пробирку. К оставшемуся после центрифугирования осадку повторно добавляют 2 мл спирта 40%, вновь перемешивают, центрифугируют и сливают надосадочную жидкость, добавляя ее к первой порции в стерильной пробирке. В третий раз заливают осадок 2 мл спирта 40% и ставят в холодильник при температуре 4°C на сутки. Через сутки снова повторяют все этапы и высушивают трехкратно полученную жидкость в темном месте при комнатной температуре в течение 48 часов.

Пример 2

Первоначально обрабатывают растительные экспланты в мыльном растворе, затем отмывают дистиллированной водой, далее в ламинарном боксе помещают в 70% спирт на 1 минуту, а затем в основной стерилизующий раствор, которым выступает перекись водорода 36% при воздействии в течение 15 минут. Далее семена отмывают автоклавированной дистиллированной водой в трёхкратной повторности по 15 минут и помещают растительные экспланты на питательную среду Мурасиге и Скуга, без использования фитогормонов для получения проростков, культивируют в термостате при температуре 24°C. Полученные проростки в стерильных условиях разрезают и помещают на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 0,2 мг/л ИУК (индолил-уксусная кислота) и 0,5 мг/л кинетина для индукции каллусогенеза. Через 28-30 дней получают каллусную культуру, которую высушивают при температуре не выше 40°C и далее измельчают и готовят спиртовой экстракт, для чего 1 грамм порошка измельчают в ступке при помощи пестика, затем добавляют 2 мл 40% спирта и перемешивают при помощи «Вортекса», далее центрифугируют 15 минут. Надосадочную жидкость, полученную в результате центрифугирования сливают в пустую стерильную пробирку. К оставшемуся после центрифугирования осадку повторно добавляют 2 мл спирта 40%, вновь центрифугируют и сливают надосадочную жидкость, добавляя ее к первой порции в стерильной пробирке. В третий раз заливают осадок 2 мл спирта 40% и ставят в холодильник при температуре 4°C на сутки. Через сутки снова повторяют все этапы и высушивают трехкратно полученную жидкость в термостате при температуре 36°C в течении 24 часов.

Пример 3

Первоначально обрабатывают растительные экспланты в мыльном растворе, затем отмывают дистиллированной водой, далее в ламинарном боксе помещают в 70% спирт на 1 минуту, а затем в основной стерилизующий раствор, которым выступает сулема 0,1% при воздействии в течение 15 минут. Далее семена отмывают автоклавированной дистиллированной водой в трёхкратной повторности по 15 минут и помещают растительные экспланты на питательную среду Мурасиге и Скуга, без использования фитогормонов для получения проростков, культивируют в термостате при температуре

24°C. Полученные проростки в стерильных условиях нарезают и помещают на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 0,2 мг/л ИУК (индолил-уксусная кислота) и 0,5 мг/л кинетина для индукции каллусогенеза. Через 28-30 дней получают каллусную культуру, которую высушивают при температуре не выше 40°C и далее измельчают и готовят спиртовой экстракт, для чего 1 грамм порошка измельчают в ступке при помощи пестика, затем добавляют 2 мл 40% спирта и перемешивают при помощи «Вортекса», далее центрифугируют 15 минут. Надосадочную жидкость, полученную в результате центрифугирования сливают в пустую стерильную пробирку. К оставшемуся после центрифугирования осадку повторно добавляют 2 мл спирта 40%, вновь центрифугируют и сливают надосадочную жидкость, добавляя ее к первой порции в стерильной пробирке. В третий раз заливают осадок 2 мл спирта 40% и ставят в холодильник при температуре 4°C на сутки. Через сутки снова повторяют все этапы и высушивают трехкратно полученную жидкость в темном месте при комнатной температуре 22°C в течении 48 часов.

Пример 4

Первоначально обрабатывают растительные экспланты в мыльном растворе, затем отмывают дистиллированной водой, далее в ламинарном боксе помещают в 70% спирт на 1 минуту, а затем в основной стерилизующий раствор, которым выступает белизна 100% при воздействии в течение 10 минут. Далее семена отмывают автоклавированной дистиллированной водой в трёхкратной повторности по 15 минут и помещают растительные экспланты на питательную среду Мурасиге и Скуга, без использования фитогормонов для получения проростков, культивируют в термостате при температуре 24°C. Полученные проростки в стерильных условиях нарезают и помещают на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 0,2 мг/л ИУК (индолил-уксусная кислота) и 0,5 мг/л кинетина для индукции каллусогенеза. Через 28-30 дней получают каллусную культуру, которую высушивают при температуре не выше 40°C и далее измельчают и готовят спиртовой экстракт, для чего 1 грамм порошка измельчают в ступке при помощи пестика, затем добавляют 2 мл 40% спирта и перемешивают при помощи «Вортекса», далее центрифугируют 15 минут. Надосадочную жидкость, полученную в результате центрифугирования сливают в пустую стерильную пробирку. К оставшемуся после центрифугирования осадку повторно добавляют 2 мл спирта 40%, вновь перемешивают, центрифугируют и сливают надосадочную жидкость, добавляя ее к первой порции в стерильной пробирке. В третий раз заливают осадок 2 мл спирта 40% и ставят в холодильник при температуре 4°C на сутки. Через сутки снова повторяют все этапы и высушивают трехкратно полученную жидкость в термостате при температуре 36°C в течении 24 часов.

Пример 5.

Полученные по примерам 1-4 образцы субстанции растительного происхождения из каллусной культуры зверобоя далее подвергали проверке на антимикробную и антиоксидантную активность.

Для чего сначала готовили 100% экстракт путем разведения 1 части полученной каллусной культуры в 1 части стерильной (автоклавированной) воды. Для получения разбавления 1:10 отбирали с помощью автоматического дозатора 1 мл 100% экстракта и добавляли его в пробирку с 9 мл стерильной (автоклавированной) воды и взбалтывали с помощью «Вортекса». В качестве контроля использовали антибиотик цефепим для *Escherichia coli*, а для *Staphylococcus aureus* использовали левофлоксацин.

Антибактериальная активность полученной субстанции растительного происхождения из каллусной ткани *Hupéricum perforátum* L. доказана по отношению к *Escherichia coli* и

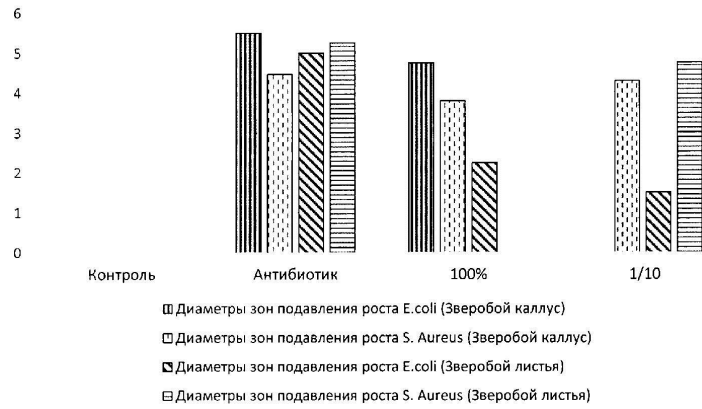
Staphylococcus aureus (Фиг.1). 100% экстракт из каллусной культуры обладал наибольшей антибактериальной активностью по отношению к *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, а антибактериальную активность к *Staphylococcus aureus* проявлял и при разведении 1/10.

5 Полученный экстракт из каллусной ткани *H. perforatum* был протестирован на антиоксидантную активность. Как видно из фиг. 2, экстракт из каллусной ткани *H. perforatum* обладает более высокой антиоксидантной активностью, по сравнению с раствором аскорбиновой кислоты (контроль) и интактным растением (экстракт из листьев растений).

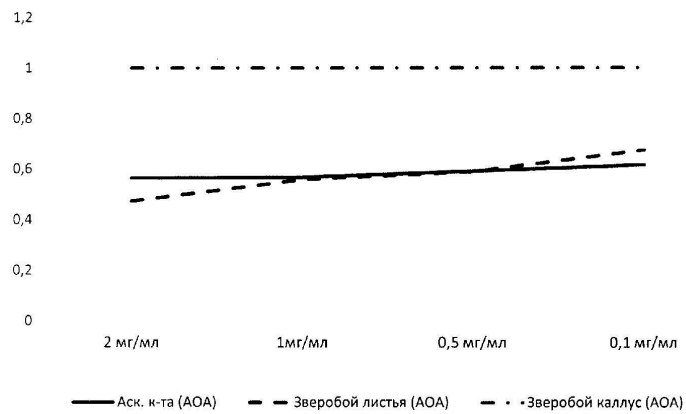
10 Таким образом, поставленная задача решена и заявленный способ обеспечивает получение субстанции из каллусной культуры зверобоя продырявленного (*Hypéricum perforatum* L.) с антибактериальными свойствами по отношению к *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, и с высокой антиоксидантной активностью.

15 (57) Формула изобретения

Способ получения субстанции из каллусных культур зверобоя продырявленного (*Hypéricum perforatum* L.) с антиоксидантной и антибактериальной активностью, включающий получение каллусной ткани на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга, отличающийся тем, что в качестве растительных эксплантов
 20 используют семена зверобоя продырявленного, которые дезинфицируют ступенчатой стерилизацией, для чего первоначально обрабатывают растительные экспланты в мыльном растворе, затем отмывают дистиллированной водой, далее в ламинарном боксе помещают в 70% спирт на 1 минуту, а затем в основной стерилизующий раствор, которым выступает белизна 50% или 100% при воздействии в течение 10-20 минут, или
 25 перекись водорода 36% при воздействии в течение 15 минут, или сулема 0,1% при воздействии в течение не более 15 минут, далее семена отмывают автоклавированной дистиллированной водой в трёхкратной повторности по 15 минут и помещают растительные экспланты на питательную среду Мурасиге и Скуга без использования фитогормонов для получения проростков, культивируют в термостате при температуре
 30 24°C, полученные проростки в стерильных условиях разрезают и помещают на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина для индукции каллусогенеза, через 28-30 дней получают каллусную культуру, которую высушивают при температуре не выше 40°C и далее измельчают; а экстракт готовят путем растворения 1 части каллусной
 35 культуры в двух частях 40% спирта, перемешивают и центрифугируют 15 минут на скорости 10000 оборотов с последующим сливанием жидкости в пустую стерильную пробирку, повторяют процедуру и сливают жидкость в ту же пробирку, снова заливают 40% спиртом, перемешивают и ставят в холодильник отстаиваться на сутки при температуре 4°C, затем вновь центрифугируют, сливают жидкость в ту же пробирку и
 40 высушивают полученный экстракт.



Фиг. 1



Фиг. 2