



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A01H 4/00 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021119071, 28.06.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
28.06.2021

Дата регистрации:  
06.06.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.06.2021

(45) Опубликовано: 06.06.2022 Бюл. № 16

Адрес для переписки:  
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО  
"Алтайский государственный университет",  
ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Тихомирова Людмила Ивановна (RU),  
Карпицкий Дмитрий Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Алтайский государственный  
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2677921 C1, 22.01.2019. RU  
2479992 C1, 27.04.2013. MURASHIGE T., et al.,  
A revised medium for rapid growth and bio assays  
with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* - 1962.  
- vol. 5, 95 - P. 473-497.

(54) Способ выращивания растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) с заданным содержанием экстрактивных веществ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для промышленного производства высокоценного сырья с целью получения лекарств, биологически активных добавок, функциональных пищевых продуктов, лечебно-профилактической косметики и индивидуальных биологически активных веществ. Изобретение представляет собой способ получения растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) клональным микроразмножением и выращиванием в условиях гидропоники с заданным содержанием экстрактивных веществ, включающий введение эксплантов в культуру *in vitro*, культивирование на питательной среде MS для получения регенерантов, их размножение и укоренение, согласно изобретению культивирование проводят на трехъярусной

универсальной аэропонной установке, заполненной питательным раствором по прописи Мурасиге-Скуга с концентрацией макро-, микросолей, кальция хлористого и хелата железа с добавлением 10,0 мкМ БАП + 1,0 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК для получения сырья с содержанием экстрактивных веществ 15,5±0,5% на абсолютно сухое сырье (на а.с.с.) и флавоноидов 6,9±0,9% на а.с.с., или 5,0 мкМ БАП для получения сырья с содержанием гидроксикоричных кислот 5,19±0,09% на а.с.с. и дубильных веществ 2,0±0,3% на а.с.с. Посредством изобретения осуществляется выход растительного сырья ириса сибирского с заданным содержанием флавоноидов, гидроксикоричных кислот и дубильных веществ. 1 ил., 1 табл., 4 пр.

RU 2 773 523 C1

RU 2 773 523 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A01H 4/00 (2022.02)*

(21)(22) Application: **2021119071, 28.06.2021**

(24) Effective date for property rights:  
**28.06.2021**

Registration date:  
**06.06.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **28.06.2021**

(45) Date of publication: **06.06.2022** Bull. № 16

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO  
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",  
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Tikhomirova Lyudmila Ivanovna (RU),  
Karpitskij Dmitrij Alekseevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj  
universitet" (RU)**

(54) **METHOD FOR GROWING PLANT RAW MATERIALS OF SIBERIAN IRIS (IRIS SIBIRICA L.) WITH A GIVEN CONTENT OF EXTRACTIVES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology and can be used for the industrial production of high-value raw materials in order to obtain medicines, biologically active additives, functional foods, therapeutic and preventive cosmetics and individual biologically active substances. The invention is a method for obtaining plant raw materials of Siberian iris (*Iris sibirica* L.) by clonal micropropagation and cultivation under hydroponic conditions with a given content of extractive substances, including the introduction of explants into culture in vitro, cultivation on MS nutrient medium to obtain regenerants, their reproduction and rooting, according to the invention, cultivation is carried out on a three-tiered universal aeroponic installation filled with a

nutrient solution according to the Murashige-Skoog recipe with a concentration of macro-, micro-salts, calcium chloride and iron chelate with the addition of 10.0 mcM of benzylaminopurine + 1.0 mcM of naphthyl acetic acid + 0.1 mcM of isopropyl formic acid to obtain raw materials with extractive substances content of  $15.5 \pm 0.5\%$  on absolutely dry raw materials (on a.d.r.m.) and flavonoids  $6.9 \pm 0.9\%$  on a.d.r.m., or 5.0 mcM of benzylaminopurine to obtain raw materials with a content of hydroxycinnamic acids of  $5.19 \pm 0.09\%$  per a.d.r.m. and tannins of  $2.0 \pm 0.3\%$  per a.d.r.m.

EFFECT: output of plant raw materials of Siberian iris with a given content of flavonoids, hydroxycinnamic acids and tannins is carried out.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к биотехнологии, фармакологии, физиологии растений и может быть использовано для промышленного производства высокоценного сырья с целью получения лекарств, биологически активных добавок, функциональных пищевых продуктов, лечебно-профилактической косметики и индивидуальных биологически активных веществ.

Биологически активные вещества в течение многих десятилетий получали преимущественно из дикорастущих растений. Однако такой подход со временем приводит к исчерпанию их природных популяций и ставит отдельные виды лекарственных растений на грань исчезновения. Нельзя забывать и о том, что многие лекарственные растения относятся к исчезающим видам, имеющим узкий ареал распространения. Продовольственная и сельскохозяйственная организация (ФАО) при Организации Объединенных Наций (ООН) ежегодно публикует безвозвратные потери видов растений, в том числе лекарственных, в связи с варварскими методами заготовки.

Выращивание растений на плантациях - прекрасная альтернатива сбору дикорастущих растений, хотя это и требует больших экономических затрат. Появляются проблемы и с качеством сырья, поскольку возникает необходимость использования инсектицидов, гербицидов и других поллютантов. Новым и перспективным подходом для получения вторичных метаболитов растительного происхождения является использование биотехнологических методов. Известен способ получения культуры чая (*Camellia sinensis* L.), включающий выращивание каллусов на питательной среде, содержащей макро- и микросоли, витамины, аденин, дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), агар, при 26°C, перенос их в жидкую питательную среду того же состава и воздействие L-фенилаланина в концентрации 3 мМ, причем неизмельченный каллус помещают в жидкую питательную среду Хеллера, содержащую макро- и микросоли по Хеллеру, витамины по Уайту, мезоинозит - 20 мг/л, Са-пантотенат - 0,1 мг/л, аденин - 5 мг/л, 2,4-Д - 5 мг/л, глюкозу - 25 г/л, выращивают при относительной влажности воздуха 70%, на качалке с частотой 90 об/мин в условиях темноты 14 дней, а в качестве растворителя для L-фенилаланина используют воду. Изобретение позволяет увеличить количество фенилпропаноидов в 4-5 раз по сравнению с контролем, что отмечается на протяжении всего цикла выращивания. Прирост каллусной культуры чая в темноте к 14 дню культивирования составляет 135,2%), что является ее характерной особенностью (Патент РФ №2709692 МПК А01Н 4/00 Способ получения каллусной культуры чайного растения (*Camellia sinensis* L.) / Нечаева Т.Л., Гончарук Е.А., Зубова М.Ю., Загоскина Н.В. Заявитель и патентообладатель: ФГБУН РАН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева». Заявка №2019110068 от 05.04.2019, патент опубликован 19.12.2019). Недостатком данного способа является использование каллусной культуры и малых объемов получения сырья в лабораторных условиях.

Такие биотехнологические подходы, как гидропонные технологии, имеют потенциал для крупномасштабного выращивания растений и производства вторичных метаболитов. Микрклональное размножение дает возможность получить здоровый посадочный материал в необходимом количестве, независимо от времени года, в том числе многолетних и трудно размножаемых видов. Сочетание этих двух технологических подходов позволяют предложить биотехнологию производства лекарственного растительного сырья в промышленных объемах.

Известен способ микрклонального размножения ириса сибирского (Патент РФ №2479992, МПК А01Н 4/00 Способ микрклонального размножения ириса сибирского (*I. sibirica* L.) / Тихомирова Л.И., Смирнов С.В., Куцев М.Г. Заявитель и патентообладатель: ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет». Заявка

№2011143089 от 25.10.2011, патент опубликован 27.04.2013). Данный способ предполагает размножение культуре ткани *I. sibirica* за счет получения регенерантов прямым методом, минуя каллусную культуру, и повышение выхода саженцев за счет увеличения коэффициента размножения.

5 Недостатком данного способа (аналога) является отсутствие этапа адаптации и выращивания *I. sibirica*, с целью получения растительной биомассы.

Наиболее близким (прототипом) является способ получения растительного сырья ириса сибирского (Патент РФ №2677921 МПК: А01Н 4/00 «Способ получения растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) методами биотехнологии» /  
10 Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н. Заявитель: ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет», Заявка на патент №2017142221 от 21.11.2017, патент опубликован 22.01.2019). Данный способ предполагает получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) клональным микроразмножением и выращиванием в  
15 условиях гидропоники, включает следующие этапы: введение эксплантов в культуру *in vitro*, культивирование на питательной среде MS для получения регенерантов их размножение и укоренение. На этапе собственно микроразмножения чередуют питательные среды через один пассаж содержащие MS + (2,5-10,0) мкМ БАП + 1,0 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК и MS + 1 мкМ БАП + 100 мг/л L-глутамин + 100 мг/л аденин  
20 сульфат, полученный посадочный материал выращивают в гидропонной установке промышленного образца на питательной среде MS, содержащей половинный набор макросолей и микросолей, полный набор витаминов, хелата железа и кальция хлористого.

В производстве лекарственного растительного сырья преследуют две цели: наращивание биомассы и накопление растениями максимального количества  
25 биологически активных соединений. Недостатком данного способа (прототипа) является отсутствие возможности регулирования содержания в сырье экстрактивных веществ.

Задачей заявляемого изобретения является выращивание методами биотехнологии растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) с заданным содержанием  
30 экстрактивных, в том числе флавоноидов, гидроксикоричных кислот и дубильных веществ.

Пример 1. Питательные среды готовят по прописи MS (Мурасиге и Скуга), содержащие 30 г/л сахарозы. В них вводят фитогормоны 2,5-10,0 мкМ БАП (6-бензиламинопурин), 1,0 мкМ НУК ( $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту) и 0,1 мкМ ИМК (3-индолилмасляную кислоту). рН среды доводят до 5,8-5,9 и добавляют 0,6% агара. Среды  
35 разливают в пластиковые контейнеры (по 30 мл в каждый) или в культуральные флаконы (по 10 мл в каждый). Автоклавируют приготовленные питательные среды в течение 20 мин. при 120°C. Экспланты культивируют в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24-260°C. Через 30 суток в ткани эксплантов развиваются вегетативные побеги, достаточной величины для пересадки на среды размножения. Укоренение  
40 проводят на питательной среде MS, дополненной 3,0 мкМ НУК.

Растения-регенеранты размноженные на питательной среде MS + (2,5-10,0) мкМ БАП + 1,0 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК и укорененные на среде с 3,0 мкМ НУК отмывают от остатков агара и пересаживают в аэропонную установку для адаптации и  
45 выращивания растительной биомассы. В работе используют трехъярусную универсальную аэропонную установку (фиг. 1), разработанную в ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (автор и разработчик Ю.Ц. Мартиросян). Установка построена по принципу модульности и может быть использована для научно-исследовательских работ для размножения и выращивания сельскохозяйственных и

лекарственных растений. Для аэропонного выращивания объектов исследования питательный раствор готовят по прописи Мурасиге-Скуга с  $\frac{1}{4}$  концентрации макро-, микросолей, кальция хлористого и хелата железа.

Для получения сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.), с максимальным в пределах опыта содержанием экстрактивных веществ  $15,5 \pm 0,5\%$  на абсолютно сухое сырье (на а.с.с), необходимо выращивать биомассу на питательной среде MS + 10,0 мкМ БАП + 1,0 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК (таблица 1).

Содержание экстрактивных веществ определяют в соответствии с ОФС.1.5.3.0006.15 (ОФС 1.5.3.006.15 Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах // ГФ РФ XIV. 2018. Т. 2. С. 2355-2360).

Пример 2. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) осуществляют аналогично Примеру 1. Для получения сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.), с наибольшим в пределах опыта содержанием флавоноидов  $6,9 \pm 0,9\%$  на а.с.с, необходимо выращивать биомассу на питательной среде MS + 10,0 мкМБАП + 1,0 мкМ НУК + 0,1 мкМ (таблица 1).

Для определения содержания суммы флавоноидов берут около 1,0 г сухого сырья, помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, заливают 30 мл 70% этилового спирта, нагревают до кипения и кипятят в течение 30 минут. Полученный экстракт фильтруют через беззольный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Отфильтрованное сырье повторно дважды подвергают экстракции. Объединенное извлечение доводят до метки 70% этиловым спиртом.

Аликвоту извлечения, равную 1 мл, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной и доводят объем раствора до метки водой. Раствор сравнения готовят следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 1 мл извлечения, 2 мл спирта этилового 96%, 0,5 мл кислоты уксусной и доводят водой до метки. Спустя 40 минут измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов в извлечении с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной стенки 10 мм при длине волны 396 нм. Длина волны 396 нм наиболее близка к максимуму поглощения апигенина (398 нм). Содержание суммы флавоноидов в пересчете на апигенин (в % на а.с.с.) рассчитывают по формуле с использованием удельного показателя поглощения апигенина (491):

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{491 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где: А - оптическая плотность испытуемого раствора; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Пример 3. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) осуществляют аналогично Примеру 1. Для получения сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.), с наибольшим в пределах опыта содержанием гидроксикоричных кислот  $5,19 \pm 0,09\%$  на а.с.с, необходимо выращивать биомассу на питательной среде MS + 5,0 мкМБАП (таблица 1).

Для определения содержания суммы гидроксикоричных кислот берут около 1.0 г измельченного сухого сырья, помещают в колбу вместимостью 200 мл, заливают 100 мл спирта этилового 70%. Колбу с содержимым взвешивают и присоединяют к обратному холодильнику для экстрагирования на кипящей водяной бане в течение 45 минут. После охлаждения колбу взвешивают и при необходимости доводят до

первоначальной массы спиртом этиловым 70%, извлечения фильтруют через бумажный фильтр и отбрасывают первые 10 мл фильтрата.

0,5 мл полученного извлечения переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем спиртом этиловым 70% до метки. Оптическую плотность приготовленного раствора измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной стенки 10 мм при длине волны 328 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 50%.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту вычисляют по формуле с использованием удельного показателя поглощения хлорогеновой кислоты (504).

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{504 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где: А - оптическая плотность испытуемого раствора; W - потеря в массе при высушивании сырья, в %, m - масса навески сырья.

Пример 4. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) осуществляют аналогично Примеру 1. Для получения сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.), с наибольшим в пределах опыта содержанием дубильных веществ 2,0±0,3% на а.с.с, необходимо выращивать биомассу на питательной среде MS + 5,0 мкМБАП (таблица 1).

Содержание экстрактивных веществ определяют в соответствии с ОФС.1.5.3.00008.18. (ОФС.1.5.3.00008.18. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах // ГФ РФ XIV. 2018. Том II. С. 2365-2369).

Таблица 1. Состав питательных сред и содержание экстрактивных, в том числе флавоноидов, гидроксикоричных кислот и дубильных веществ у *Iris sibirica* L. сорт Стерх в % на а.с.с.

№ опыта	Гормональный состав питательной среды, мкМ	Экстрактивные вещества	Флавоноиды	Гидроксикоричные кислоты	Дубильные вещества
1	БАП 1,0	12,3±0,2*	5,4±0,3*	2,50±0,08	1,8±0,1*
2/1	БАП 2,5	9,04±0,08	6,4±0,4*	3,7±0,1	1,15±0,07*
2/2	БАП 2,5+А	10,1±0,3	4,3±0,1	2,70±0,04	1,6±0,3*
3/1	БАП 5,0	14,6±0,1*	2,5±0,2	<b>5,19±0,09*</b>	<b>2,0±0,3*</b>
3/2	БАП 5,0+А	13,6±0,2*	2,8±0,1	4,59±0,07*	1,01±0,09*
4/1	БАП 7,5	11,4±0,6	3,6±0,6	4,6±0,1*	1,1±0,1*
4/2	БАП 7,5+А	14,8±0,3*	4,2±0,3	4,86±0,02*	1,31±0,01*
5/1	БАП 10,0	12,2±0,7	6,6±0,7*	4,04±0,05	0,91±0,01*
5/2	БАП 10,0+А	<b>15,5±0,5*</b>	<b>6,9±0,9</b>	5,18±0,04*	1,15±0,06*
без гормонов (контроль)		10,8±0,1	4,3±0,1	3,37±0,06	0,38±0,01

Примечание. А – дополнены ауксинами 1,0 мкМ НУК+ 0,1 мкМ ИМК,

\* - различия с контролем достоверны при P ≤ 0,05

#### (57) Формула изобретения

Способ получения растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) клональным микроразмножением и выращиванием в условиях гидропоники с заданным содержанием экстрактивных веществ, включающий введение эксплантов в культуру *in vitro*,

культивирование на питательной среде MS для получения регенерантов, их размножение и укоренение, отличающийся тем, что культивирование проводят на трехъярусной универсальной аэропонной установке, представленной на фиг.1, заполненной питательным раствором по прописи Мурасиге-Скуга с  $\frac{1}{4}$  концентрации макро-,  
5 микросолей, кальция хлористого и хелата железа с добавлением 10,0 мкМ БАП + 1,0 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК для получения сырья с содержанием экстрактивных веществ  $15,5 \pm 0,5\%$  на абсолютно сухое сырье (на а.с.с.) и флавоноидов  $6,9 \pm 0,9\%$  на а.с.с., или 5,0 мкМ БАП для получения сырья с содержанием гидроксикоричных кислот  $5,19 \pm 0,09\%$  на а.с.с. и дубильных веществ  $2,0 \pm 0,3\%$  на а.с.с.

10

15

20

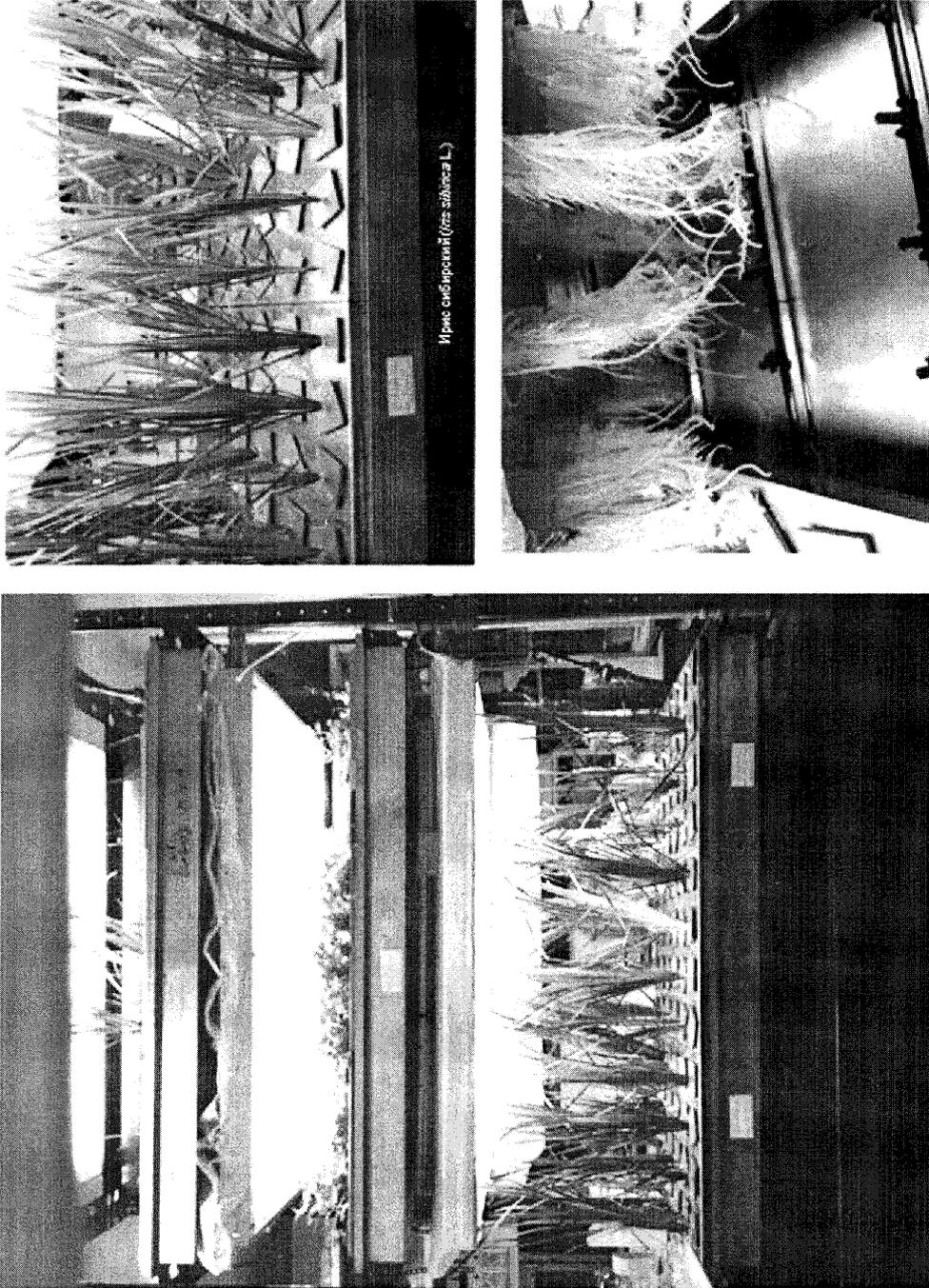
25

30

35

40

45



Фигура 1. Аэропонная установка для выращивания растительного сырья