

СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО ХРАНИТЕЛНО-
ВКУСОВИ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ ВАК

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ”

МИЛЕН ИВАНОВ ГЕОРГИЕВ

**ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА ПОВИШАВАНЕ ДОБИВА
НА РОЗМАРИНОВА КИСЕЛИНА ОТ
КЛЕТЪЧНА КУЛТУРА *LAVANDULA VERA* MM**

АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИЯ

За получаване на образователна и научна степен „ДОКТОР”

Научна специалност: 02.11.11. “Технология на биологично-активните
вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)”

Научен ръководител: ст. н. с. I ст. Младенка Паунова Илиева, д.т.н.

Научен консултант: ст. н. с. II ст. д-р Атанас Иванов Павлов

Рецензенти:

1. ст. н. с. I ст. Мария Ангелова, д.б.н.
2. ст. н. с. II ст. д-р Мария Крачанова

София, 2005 г.

Автор: Милен Иванов Георгиев

Заглавие: Възможности за повишаване добива на розмаринова киселина от
клетъчна култура *Lavandula vera* MM

ВЪВЕДЕНИЕ

От векове хората използват растенията като източници на голям брой метаболити, намиращи приложение като лекарствени препарати, агрохимикали, багрила, козметични и хранителни добавки. От известните над 30 000 натурални продукти около 80 % са от растителен произход. Днес лекарствените препарати на фитооснова са 25 % от предписваните медикаменти, като продажбите на лекарства от растителен произход възлизат на повече от 3 милиарда долара за година.

Получаването на биологично-активни вещества от растителен произход по класическите методи е свързано с редица трудности, произтичащи предимно от сезонността, географското местоположение, почвата и др. Изолирането на тези вещества (обикновено в ниски концентрации) от големи растителни маси е трудоемко и води до оскъпяването им. Получаването на определени биологично-активни вещества в промишлени количества създава и сериозни екологични проблеми. Една перспективна алтернатива са растителните биотехнологии, които предоставят възможност за получаване на биологично-активни вещества чрез *in vitro* култивиране на клетки, тъкани и органи в биореактори по методи и техники, използвани в микробните биотехнологии.

Розмариновата киселина притежава антивирусни, антибактериални, антиалергични, противовъзпалителни и антимутагенни свойства, а също така е добър антиоксидант, което обуславя приложението ѝ във фармацевтичната, козметичната и хранителната промишлености. Тя е вторичен метаболит, разпространен широко в растителния свят, но в много ниски концентрации, което прави промишленото ѝ получаване неефективно. Една алтернативна възможност предлагат клетъчните биотехнологии. Предхождащите изследвания с растителна клетъчна култура *Lavandula vera* MM показаха, че тя е нов и перспективен продуцент на розмаринова киселина.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Целта на настоящата дисертационна работа е:

Да се изследват някои възможности за повишаване добивите на розмаринова киселина от растителна клетъчна култура *Lavandula vera* MM.

За постигане на целта в рамките на дисертацията бяха проведени изследвания по следните задачи:

1. Изследване на влиянието на условията на култивиране в лабораторен биореактор.

2. Оптимизиране на условията на култивиране в лабораторен биореактор.

3. Селекция на високопродуктивни клетъчни линии.

4. Изследване на влиянието на различни абиотични елиситори.

5. Изолиране и пречистване на розмариновата киселина от клетките на продуцента.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Хранителни среди

Растителната клетъчна култура *Lavandula vera* MM се култивира на хранителна среда Linsmayer-Skoog (LS) (Linsmayer and Skoog, 1965), допълнена с 30 g/L захароза, 0.2 mg/L 2,4-дихлорфеноксидна киселина и 5.5 g/L агар. Преди автоклавиране рН на хранителната среда се коригира до 5.6 – 5.8.

Калусната култура се развива в термостат при 26°C, на тъмно, а суспензионната култура се култивира в ерленмайерови колби с обем 1000 mL и работен обем 200 mL, на клатачка (11.6 rad/s), на тъмно при 26°C. За посевна култура се използва 20 % (v/v) клетъчна суспензия, култивирана при същите условия в продължение на 7 дни.

Култивирането на клетъчната суспензия в лабораторен биореактор, както и при експериментите по елиситиране и дълбочинно култивиране на селектираните линии се извършва в модифицирана LS хранителна среда (Павлов, 1998) при описаните по-горе условия.

2. Култивиране в лабораторен биореактор

Култивирането се осъществява в 3-литров лабораторен биореактор (BioFlo 110, New Brunswick) с работен обем 2.25 литра, снабден с пропелерна бъркачка. За поддържане на постоянна концентрация на разтворен кислород биореакторът е оборудван с "Four-gas mix device". Изследвани са условията на култивиране в лабораторния биореактор: концентрация на разтворен кислород (10 – 50 %), скорост на разбъркване (200 – 400 min⁻¹) и температура на култивиране (22 – 30°C).

3. Селекция на високопродуктивни клетъчни линии

За изолиране на високопродуктивни клетъчни линии се използват селекционните агенти р- и m-флуоро-D,L-фенилаланин (стерилизирани чрез филтруване през микрофилтър) в концентрации от 0.2 ÷ 0.8 mM и 0.2 ÷ 1.0 mM, съответно. Селекцията е проведена по метод описан от Gonzales и Widholm (1985), при който хранителната среда (съдържаща съответното количество селекционен агент и агар) се смесва с еквивалентно количество 7-дневна клетъчна суспензия и се разлива в петритата. След 42-дневно култивиране, прорасналите колонии са отделени и препосаяти на стандартна

LS агаризирана среда. За оценяване на растежа им е използвана скала от 0 (без растеж) до 5 (отличен растеж).

4. Елиситиране на *Lavandula vera* MM

Изследваните елиситори се добавят на единадесетия ден от началото на култивирането. Като контроли се използват проби, към които се прибавят еквивалентни количества от съответния разтворител на елиситора (етанол или вода). Ефектът на елиситорите се проследява чрез вземане на проби на 4-тия, 8-мия, 12-тия, 24-тия, 36-тия и 48-мия час след добавянето им. Изследвано е влиянието на матилжасмонат (12.5 – 150 µM/L), бензотиадиазол (25 – 100 µM/L) и ванадилсулфат (6.25 – 75 mg/L)

5. Изолиране и пречистване на розмаринова киселина

5.1. Екстракция на розмариновата киселина от клетките на продуцента

За екстракция на розмариновата киселина от клетъчната биомаса (влажна и лиофилизирана) са изследвани възможностите на различни екстрагенти – вода, оцетна киселина, водно-алкохолни смеси. Екстракцията с вода и водни разтвори се провежда при температура 70°C и 80°C, а с водно-алкохолните – при 70°C. При отделните варианти на екстракция е използвана различна продължителност (3 x 20 min и 3 x 40 min) и различни хидромодули. Осъществявани са опити с или без предварително стриване с кварцов пясък.

5.2. Пречистване на розмариновата киселина от първичния екстракт

За експериментите по пречистване на розмариновата киселина е използван лиофилизиран екстракт (лиофилизатор Alpha 1-2, Christ, Germany) със съдържание на розмаринова киселина 38.8 mg/g сухо тегло. Използвани са следните методи за пречистване:

5.2.1. Колонна хроматография на Amberlite XAD смоли

Използвани са адсорбционни смоли Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-4 и Amberlite XAD-7. За целта лиофилизираният екстракт се разтваря във вода (pH 3) и се пропуска през колона, запълнена със съответната Amberlite XAD смола (диаметър на колоната – 12 mm, височина на колоната – 90-100 mm, тегло на смолата – около 10 g). След промиване на колоната с вода (pH 3) се провежда елуиране с 40 % и 80 % водни разтвори на етанол.

5.2.2. Екстракция с етилацетат

За целта лиофилизираният екстракт се разтваря във вода (pH 3) и се насища с NaCl до постигане на 10 % концентрация, след което се екстрахира трикратно с етилацетат (наситен воден разтвор на NaCl : етилацетат = 1 : 2). Обединените етилацетатни екстракти се промиват с вода и се изсушават с безводен Na₂SO₄, след което се изпаряват под вакуум при 45°C (ротационен вакуум изпарител Laborota 4002, Heidolph) до сухо.

Сухият остатък се разтваря в 50 % етанол и се използва за количествено определяне на розмариновата киселина.

5.2.3. Утаяване с калциев хидроксид

За целта лиофилизираният екстракт се разтваря във вода (pH 3) и към него се добавя наситен разтвор на Ca(OH)₂ до pH 10. Получената утайка, съдържаща Ca-розмаринат се отделя чрез центрофугиране (5000 x g за 20 min). Към получената супернатанта се добавя ново количество Ca(OH)₂ като процедурата се повтаря трикратно. Получените утайки от Ca-розмаринат се събират и изсушават. Ефективността на метода се определя индиректно, чрез определяне на количеството на розмаринова киселина в супернатанта.

6. Методи за анализ

6.1. Определяне на количеството суха биомаса

Биомасата се отделя чрез филтруване и количествено се определя по тегловен метод чрез сушене (при 60°C) до постоянно тегло (Dixon, 1985).

6.2. pH и специфична електропроводимост на средата

Специфичната електропроводимост на средата и pH се определят на pH/кондуктометър (INOLAB, WTW, Germany).

6.3. Екстракция и анализ на розмаринова киселина

6.3.1. Екстракция на розмаринова киселина от клетъчната биомаса на *Lavandula vera* MM

Растителните клетки се отделят от културалната среда чрез филтруване, хомогенизират се и се екстрахира с 50 % етанол при 70°C на обратен хладник, трикратно в продължение на 20 min. Етанолният екстракт се концентрира под вакуум при 70°C, след което се разтваря в 70 % етанол и се съхранява за 24 h при -10°C. Получената утайка се отделя чрез филтруване, а надутаечната течност се използва за количествен анализ на розмаринова киселина.

6.3.2. Екстракция на розмариновата киселина от културалната течност

Културалната течност се отделя от биомасата чрез филтруване, концентрира се под вакуум, след което се разтваря в 70 % етанол и се съхранява за 24 h при -10°C. Получената утайка се отделя чрез филтруване, а надутаечната течност се използва за количествен анализ на розмаринова киселина.

6.3.3. Количествен анализ на розмаринова киселина

Определянето на розмариновата киселина се осъществява на спектрофотометър (UV/VIS Shimadzu 1240) при дължина на вълната 327 nm (Lopez-Arnaldos et al., 1995). Като стандарт за съставяне на

калибрационна крива се използва чиста розмаринова киселина на фирмата Extrasynthese (Genay, France).

6.4. ТСХ – анализи на розмаринова киселина

За целта се използват хроматографски плаки със силикагел G₂₅₄ и подвижна фаза: хлороформ : метанол : оцетна киселина : вода - 59 : 29 : 8.4 : 3.6. Визуализирането на петната от розмаринова киселина се осъществява с UV лампа (при 356 nm) и чрез напръскване с 1 % разтвор на FeCl₃ и пари от йод.

6.5. Усвояване на глюкоза, фруктоза и захароза от клетъчна култура *Lavandula vera* MM

За определяне на концентрацията на захарите в културалната среда са използвани ензимните тестове на фирмата R-Biopharma (Кат. номер 10716260035).

6.6. Усвояване на нитратни, амониеви и фосфатни йони

За определяне на концентрацията на нитратни, амониеви и фосфатни йони в културалната среда са използвани химични тестове на фирмата Merck (Кат. номера 114773, 114752, 114842, съответно).

7. Математико - статистически методи

За оптимизиране на условията на култивиране в лабораторен биореактор е използван пасивен многофакторен експеримент (Draeger and Smith, 1981). Обработката на опитните данни е проведена с компютърна програма MULTR, заимствана от IBM (System 360).

За оценяване на регресионните коефициенти b_i е използван метода на най-малките квадрати (Вучков и Стоянов, 1986; Дончев и сътр., 2002). Като оптимизационен метод е използван модифициран симплекс метод на Нелдер и Мид (Himmelbau, 1972) чрез компютърна програма MSIP.

Проведена е проверка за адекватността на предложения модел при ниво на значимост $\alpha = 0.05$.

За статистическа обработка на данните са използвани компютърни програми EXCEL и Sigma Plot 2001.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

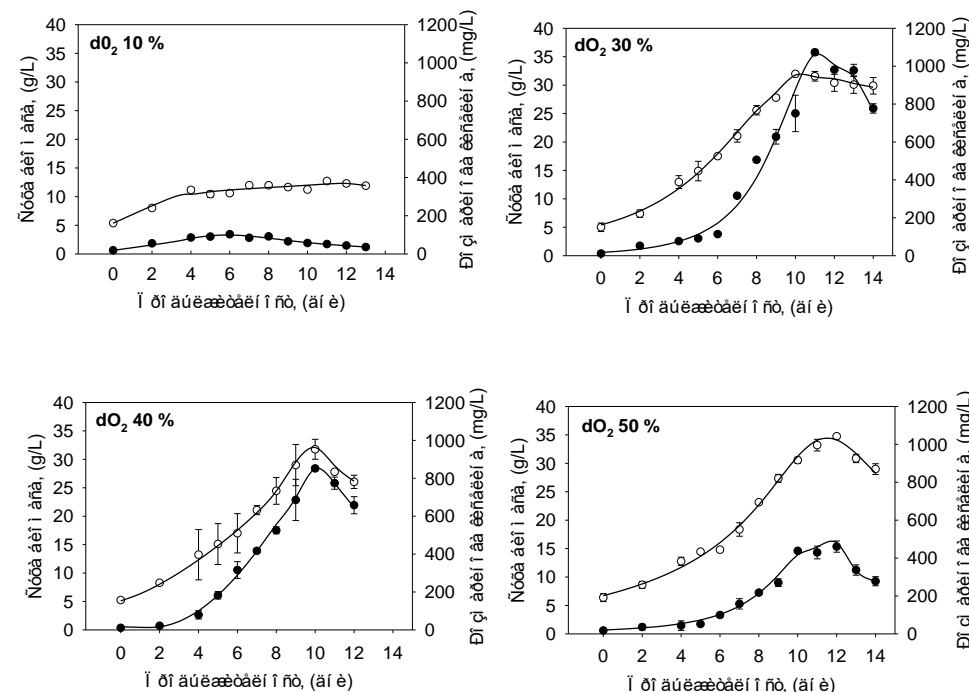
1. КУЛТИВИРАНЕ НА *LAVANDULA VERA* MM В ЛАБОРАТОРЕН БИОРЕАКТОР

В резултат на проведените експерименти по оптимизиране на състава на хранителната среда при култивирането на клетъчната суспензия *L. vera* MM в колби на клатачка е постигнат добив на розмаринова киселина от

1786.4 mg/L (Павлов, 1998). Следващият важен етап от създаването на биотехнологичен метод за получаване на розмаринова киселина от клетъчен продуцент *L. vera* MM е трансферът на процеса от колби в биореактори и съответно оптимизиране на параметрите на култивиране (концентрация на разтворен кислород, скорост на разбъркване и температура).

1.1. ВЛИЯНИЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД

Влиянието на изследваните концентрации на разтворен кислород върху развитието и биосинтеза на розмаринова киселина по време на култивирането на растителната клетъчна суспензия *L. vera* MM са показани на фиг. 1.

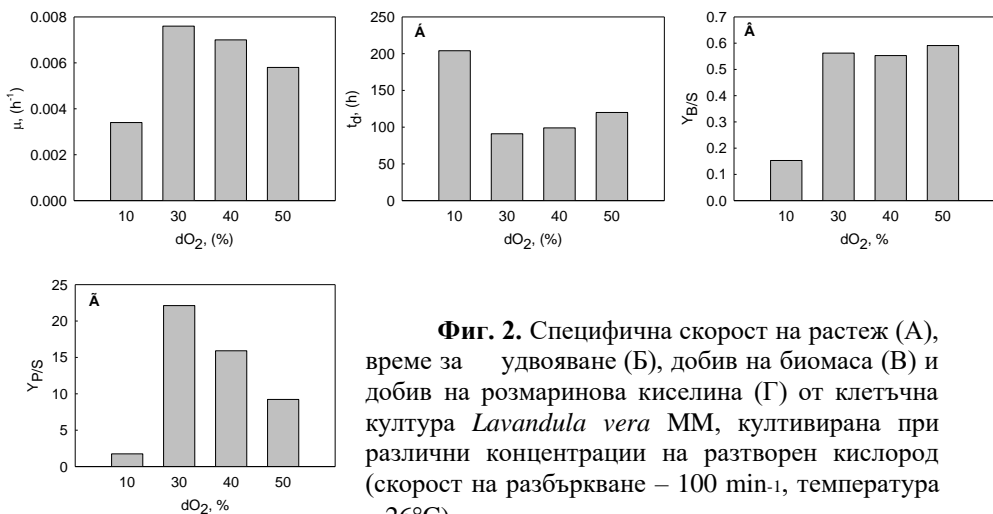


Фиг. 1. Влияние на концентрацията на разтворения кислород върху растежа (○) и биосинтеза на розмаринова киселина (●) от клетъчна култура *Lavandula vera* MM в 3-литров биореактор (скорост на разбъркване – 100 min⁻¹, температура – 26°C)

Най-голямо количество биомаса (34.8 g/L) *L. vera* MM акумулира при 50 % разтворен кислород, а при 30 % и 40 % разтворен кислород акумулираната биомаса е съответно 32.0 g/L и 31.8 g/L (фиг. 1). При култивирането на клетъчната суспензия в присъствие на 10 % разтворен кислород се наблюдава значително инхибиране на растежа. Най-висока специфична скорост на растеж и най-кратко време за удвояване се калкулират при култивиране в присъствие на 30 % и 40 % разтворен кислород (фиг. 2).

Биосинтезът на розмариновата киселина от *L. vera* MM следва динамиката на развитие на културата (фиг. 1). Максимално количество розмаринова киселина се получава при ниво на разтворен кислород 30 % (1073 mg/L) на 11-тия ден от началото на култивирането, а при 10 %, 40 % и 50 % разтворен кислород количеството на биосинтезираната розмаринова киселина е съответно 103 mg/L (на 6-тия ден), 851.9 mg/L (на 10-тия ден) и 460.5 mg/L (на 12-тия ден).

Концентрацията на разтворен кислород влияе в по-голяма степен върху добива на розмаринова киселина, отколкото върху добива на биомаса (фиг. 2). Повишаването на концентрацията на разтворения кислород от 30 % на 50 % води до понижаване добива на розмаринова киселина от 22.12 mg/g захароза до 9.22 mg/g захароза (повече от два пъти), докато добивът на биомаса се повишава незначително от 0.56 mg/g захароза до 0.59 mg/g захароза.

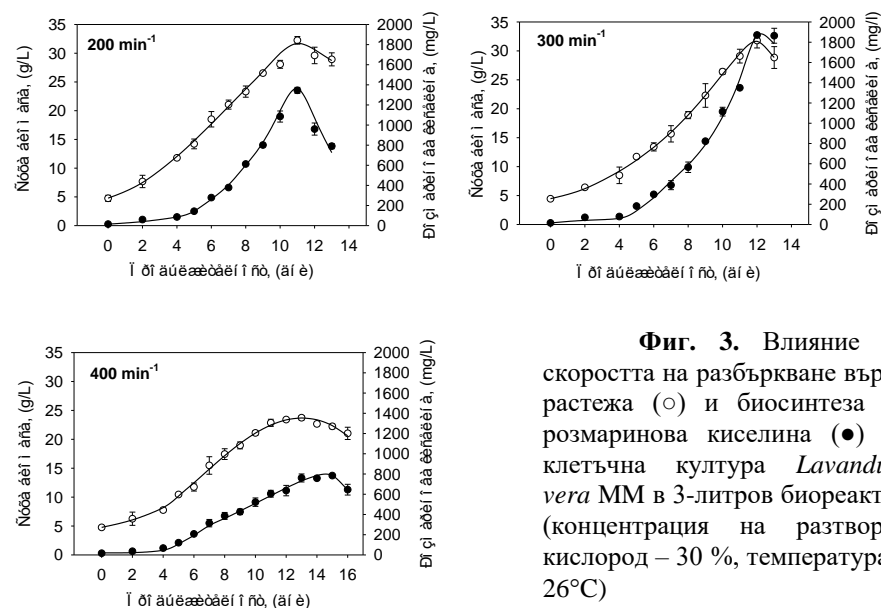


Фиг. 2. Специфична скорост на растеж (А), време за удвояване (Б), добив на биомаса (В) и добив на розмаринова киселина (Г) от клетъчна култура *Lavandula vera* MM, култивирана при различни концентрации на разтворен кислород (скорост на разбъркване – 100 min⁻¹, температура – 26°C)

В заключение трябва да се отбележи, че разтвореният кислород е много важен фактор както за развитието на клетъчната суспензия *L. vera* MM, така и за биосинтеза на розмаринова киселина. Култивирането на *L. vera* MM при различни нива на разтворен кислород позволява да се управлява биосинтетичния процес за получаване на високи добиви биомаса и/или високи добиви розмаринова киселина.

1.2. ВЛИЯНИЕ НА СКОРОСТТА НА РАЗБЪРКВАНЕ

Получените данни от изследването на влиянието на скоростта на разбъркване върху развитието на клетъчната култура *L. vera* MM и биосинтеза на розмаринова киселина са представени на фиг. 3. Както следва, максимално количество биомаса се акумулира при скорост на разбъркване 200 min⁻¹ (32.2 g/L) и се запазва почти постоянно при повишаване на оборотите на бъркачката до 300 min⁻¹ (31.8 g/L). Това повишаване на скоростта на разбъркване обаче кореспондира с повишаване на количеството на биосинтезираната розмаринова киселина (1870.6 mg/L на 12-тия ден от началото на култивирането).

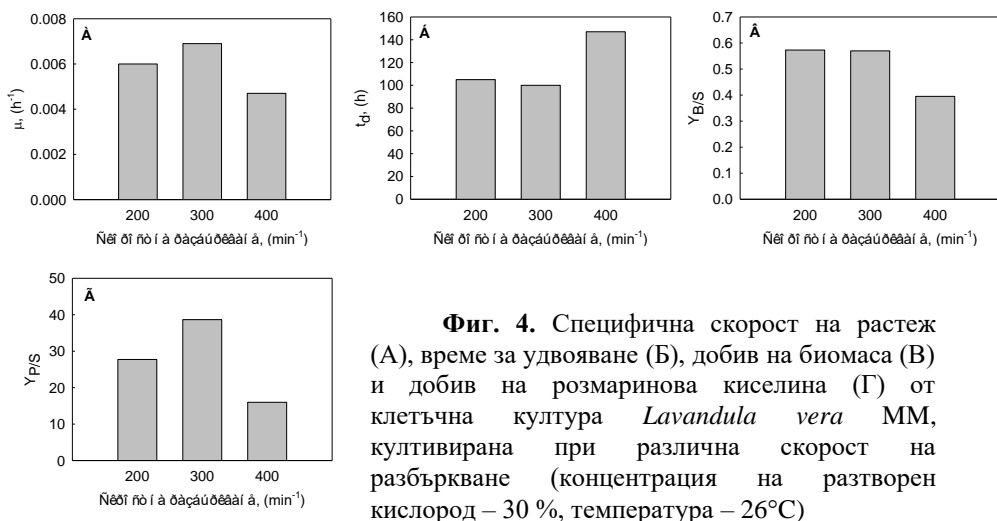


Фиг. 3. Влияние на скоростта на разбъркване върху растежа (○) и биосинтеза на розмаринова киселина (●) от клетъчна култура *Lavandula vera* MM в 3-литров биореактор (концентрация на разтворен кислород – 30 %, температура – 26°C)

Следващото увеличаване на оборотите на бъркачката от 300 до 400 min⁻¹ води до значително инхибиране на растежа (23.7 g/L или с около 26 % понижение в сравнение с култивирането при 300 min⁻¹), което се свързва с повишения механичен стрес, на който са подложени растителните клетки в биореактора (фиг. 3). Повишените нива на механичен стрес са причината и

за понижаване на специфичната скорост на растеж и на времето за удвояване, а с това и за по-ниския добив на биомаса (фиг. 4) в сравнение с култивирането при обороти на бъркачката от 200 и 300 min⁻¹. Количеството на биосинтезираната розмаринова киселина, като вътреклетъчен метаболит също намалява при обороти на бъркачката от 400 min⁻¹.

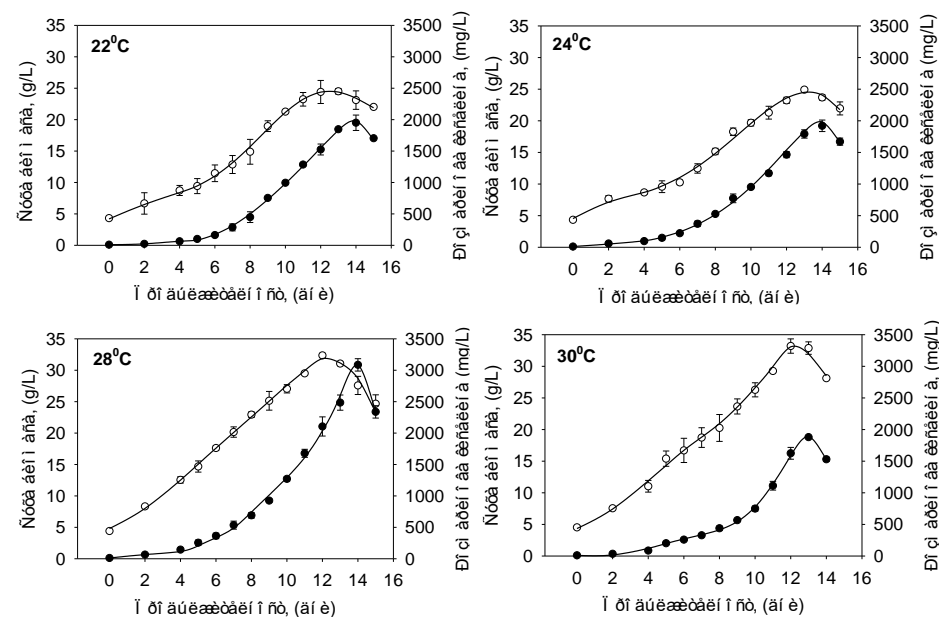
Резултати показват, че скоростта на разбъркване е важен фактор както за развитието на клетъчния щам, така и за биосинтеза на розмаринова киселина. Биосинтезираното количество розмаринова киселина от 1870.6 mg/L е сравнимо с добива, получен при култивирането на *L. vera* MM в колби (1786.7 mg/L) (Pavlov et al., 2000), което е важен резултат, тъй като редица автори съобщават за инхибиране на растежа и понижаване на добивите от целевите метаболити при трансфера на процеса от колби в биореактори (Schiel et al., 1987; Scragg et al., 1987; Rodriguez-Monroy and Galindo, 1999; Zhong et al., 1999).



Фиг. 4. Специфична скорост на растеж (А), време за удвояване (Б), добив на биомаса (В) и добив на розмаринова киселина (Г) от клетъчна култура *Lavandula vera* MM, култивирана при различна скорост на разбъркване (концентрация на разтворен кислород – 30 %, температура – 26°C)

1.3. ВЛИЯНИЕ НА ТЕМПЕРАТУРАТА НА КУЛТИВИРАНЕ

Изследвано е влиянието на температурата на култивиране в интервала от 22°C до 30°C (фиг. 5). Резултатите показват, че температури по-ниски от 26°C оказват неблагоприятно влияние върху растежа на клетъчната суспензия, като при 22°C натрупаната биомаса е 24.5 g/L, а при 24°C – 24.9 g/L. При температури по-високи от 26°C се наблюдава интензивно развитие на клетъчната култура (> 30 g/L).

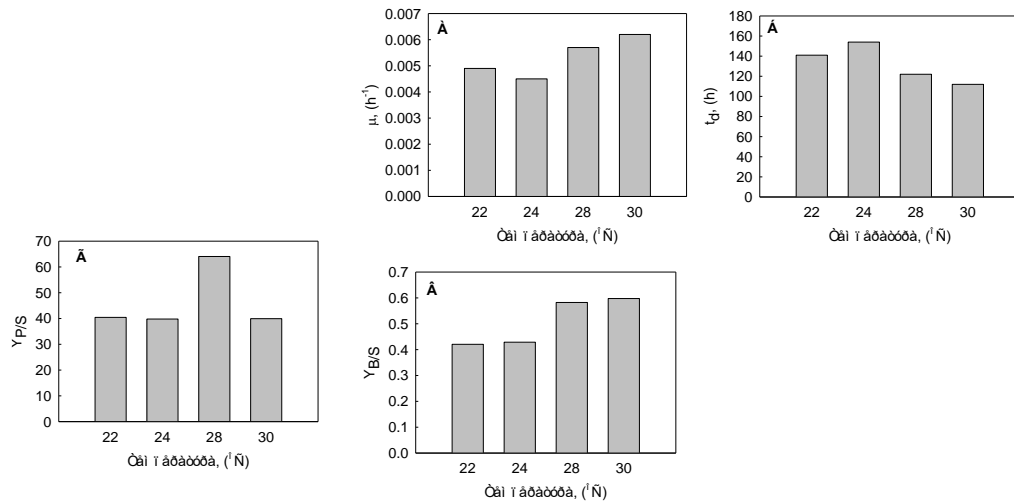


Фиг. 5. Влияние на температурата на култивиране върху растежа (○) и биосинтеза на розмаринова киселина (●) от клетъчна култура *Lavandula vera* MM в 3-литров биореактор (концентрация на разтворен кислород – 30 %, скорост на разбъркване – 300 min⁻¹)

Максимално количество биомаса (33.2 g/L) се акумулира при 30°C (фиг. 5), поради което най-висока специфична скорост на растеж и най-краткото време за удвояване са калкулирани при тази температура (фиг. 6).

Биосинтезът на розмаринова киселина също се повлиява от температурата (фиг. 5). По-ниското количество розмаринова киселина, като вътреклетъчен метаболит, при температури от 22°C (1950.1 mg/L) и 24°C (1920.3 mg/L) се дължи на инхибирането на развитието на културата и съответно на по-ниските добиви на биомаса. Максимално количество розмаринова киселина (3085 mg/L) се биосинтезира при 28°C или това количество е с около 1.7 пъти повече в сравнение с култивирането в колби на клаткачка.

Сравнението между добивите на биомаса и розмаринова киселина спрямо вложена захароза показва, при температура 28°C количеството на биосинтезираната розмаринова киселина е 64.04 mg/g захароза, докато понижаването или повишаването на температурата с 2°C, кореспондира с 41 % и 38 % понижаване на добивите, съответно (фиг. 6).



Фиг. 6. Специфична скорост на растеж (А), време за удвояване (Б), добив на биомаса (В) и добив на розмаринова киселина (Г) от клетъчна култура *Lavandula vera* ММ, култивирана при различни температури (концентрация на разтворен кислород – 30 %, скорост на разбъркване – 300 min^{-1})

Получените данни от изследване на влиянието на температурата на култивиране показват, че тя оказва значително влияние в малък температурен интервал. Това означава, че температурата на култивиране трябва стриктно да се контролира по време на култивационния процес.

2. ОПТИМИЗАЦИЯ НА УСЛОВИЯТА НА КУЛТИВИРАНЕ В ЛАБОРАТОРЕН БИОРЕАКТОР

На база получените резултати при изследване на влиянието на концентрацията на разтворен кислород (X_1), скоростта на разбъркване (X_2) и температурата на култивиране (X_3) върху биосинтеза на розмаринова киселина (Y) е създадена матрица за оптимизация на условията на култивиране в лабораторен биореактор (табл. 1).

Таблица 1. Матрица за пасивен многофакторен експеримент ($n = 3$)

dO ₂ , (%) X_1	Разбъркване, (min ⁻¹) X_2	Температура, (°C) X_3	Розмаринова киселина, (mg/L) Y
10	100	26	103.0
30	100	26	1073.0
40	100	26	851.9
50	100	26	460.5
30	200	26	1344.9
30	300	26	1870.6
30	400	26	783.6
30	300	22	1950.1
30	300	24	1920.3
30	300	28	3085.0
30	300	30	1879.3

Съставени са линейни модели на отчитаната функция на отклика Y . Като се имат предвид статистически значимите коефициенти е получен следния модел:

$$Y = -394.7 + 37.8 X_1 - 0.5297 X_2 - 24.39 X_3 + 0.1777 X_1 X_2 + 2.15 X_1 X_3 + 0.05965 X_2 X_3 - 1.698 X_{12}$$

$$R_m = 0.946$$

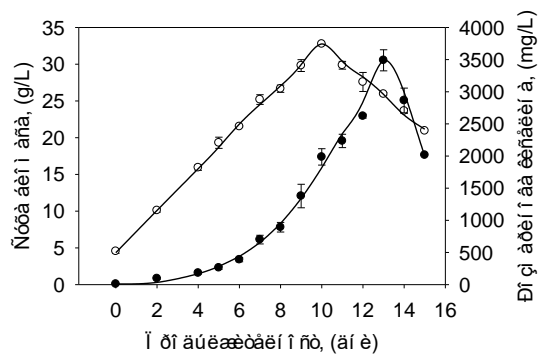
Моделът се характеризира с това, че са значими и взаимните влияния на разглежданите фактори. Проверката за адекватност е направена чрез критерия на Фишер и е установено, че получения модел е адекватен при ниво на значимост $\alpha = 0.05$. Получените стойности на променливите (X_1 , X_2 и X_3) за максимален биосинтез на розмаринова киселина (Y) от *L. vera* ММ са представени на табл. 2.

Таблица 2. Оптимални стойности на условията на култивиране за максимален биосинтез на розмаринова киселина

Условия на култивиране	Оптимално ниво
Разтворен кислород, (%)	50
Скорост на разбъркване, (min ⁻¹)	400
Температура, (°C)	29.9

$$\hat{Y}_{\max} (\text{теоретичен добив}) = 3790.8 \text{ mg/L}$$

Проведено е култивиране на клетъчната суспензия *L. vera* MM при получените оптимални стойности на условията на култивиране (фиг. 7). От фигурата се вижда, че максимално количество биомаса (32.8 g/L) се акумулира на 10-тия ден от началото на култивирането, докато максимумът в биосинтеза на розмаринова киселина (3489.4 mg/L) се достига в късната стационарна фаза – 13-тия ден от началото на култивирането.

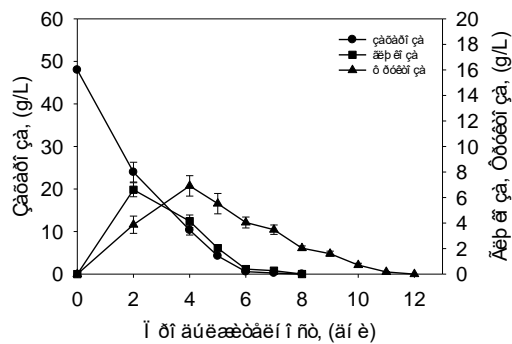


Фиг. 7. Динамика на развитие (○) и биосинтез на розмаринова киселина (●) от клетъчна култура *Lavandula vera* MM в 3-литров биореактор (концентрация на разтворен кислород – 50 %, скорост на разбъркване – 400 min⁻¹ и температура – 29.9°C)

Полученото отклонение (2) от теоретично изчисления максимум е 301.4 mg/L или 7.9 %. Това показва високата степен на адекватност на предложения регресионен модел.

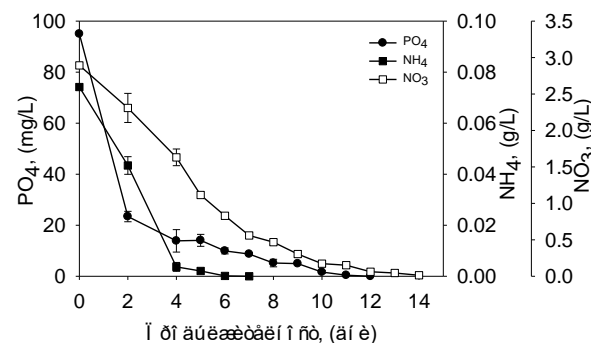
$$\Delta Y_{\max} = \hat{Y}_{\max} - Y_{\max} = 3790.8 - 3489.4 = 301.4 \text{ mg/L}$$

Изследвана е и физиологичната характеристика на клетъчния продуцент *L. vera* MM, култивиран при оптималните условия (фиг. 8 и 9). Ясно се очертава бързата инверсия на захарозата до глюкоза и фруктоза, която приключва на 6-тия ден от началото на култивирането (фиг. 8). Получените глюкоза и фруктоза се усвояват с различна скорост, като до 8-мия ден от началото на култивирането глюкозата е напълно изчерпана, докато усвояването на фруктозата продължава до 12-тия ден (фиг. 8). Това е характерна особеност на растителната клетъчна култура *L. vera* MM (Павлов, 1998).



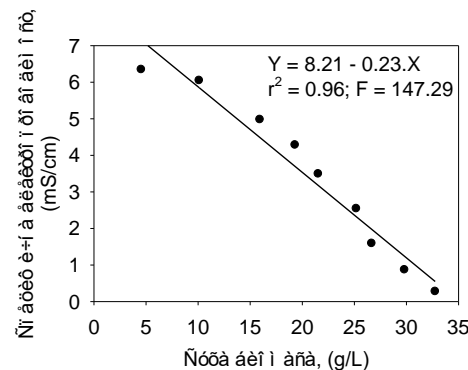
Фиг. 8. Динамика на усвояване на захарозата от растителна клетъчна култура *Lavandula vera* MM в 3-литров биореактор

Азотните източници (NH₄⁺ и NO₃⁻) се усвояват интензивно от клетъчния продуцент, като на 7-мия ден от началото на култивирането NH₄⁺ йони са напълно усвоени, докато усвояването на NO₃⁻ йони продължава до края на култивационния процес (фиг. 9). Фосфорният източник също се метаболизира с висока скорост от клетките на *L. vera* MM още в началните етапи на развитие, като между 10-тия и 12-тия ден от началото на култивирането неговото количество е напълно изчерпано (фиг. 9).



Фиг. 9. Динамика на усвояване на фосфорния и азотния източник от растителна клетъчна култура *Lavandula vera* MM в 3-литров биореактор

Известно е, че съществува пряка връзка между изменението на специфичната електропроводимост на средата и развитието на клетъчните продуценти (Dixon, 1985; Suresh et al., 2001). Тази зависимост при клетъчния продуцент *L. vera* MM е представена на фиг. 18. Корелационният коефициент на зависимостта е 0.96 (фиг. 10), което показва, че специфичната електропроводимост на средата може да служи за определяне на растежа и количеството натрупана биомаса. Тази зависимост (обратнопропорционална) между изменението на електропроводимостта на средата и развитието на клетъчния продуцент е от особено значение за контрола и управлението на биосинтетичния процес при култивирането на *L. vera* MM в биореактори с по-големи обеми.



Фиг. 10. Зависимост между специфичната електро-

проводимост на средата и концентрацията на биомаса при култивиране на *Lavandula vera* MM в 3-литров биореактор

В заключение, с оптимизацията на условията на култивиране в лабораторен биореактор е постигнато увеличение на биосинтезираната розмаринова киселина до 3489.4 mg/L (табл. 3). Този добив е с около 51 пъти по-висок в сравнение с първоначалното определеното количество при култивиране на *L. vera* MM в стандартна LS среда (Ilieva and Pavlov, 1997) и с около 2 пъти по-висок в сравнение с постигнатото количество розмаринова киселина при култивиране на *L. vera* MM в колби на оптимизирана LS среда (Pavlov et al., 2000).

Таблица 3. Сравнение между добивите на биомаса и розмаринова киселина и продуктивност от клетъчна култура *Lavandula vera* MM

Параметър	Култивиране в колби		Култивиране в 3-литров биореактор на оптимизирана LS хранителна среда
	Стандартна LS хранителна среда ^а	Оптимизирана LS хранителна среда ^б	
Розмаринова киселина, (mg/L)	68.0	1786.7	3489.4
Y _{w/s} , (g/g захароза)	0.54	0.72	0.59
Y _{p/s} , (g/g захароза)	2.75	34.22	72.47
Продуктивност, mg/(L.day)	8.5	148.9	268.4

^а Ilieva and Pavlov, 1997; ^б Pavlov et al., 2000

Оптимизацията на условията на култивиране не оказва съществено влияние върху добива на биомаса (Y_{w/s}), но води до повишаване на добива на продукт (Y_{p/s}) с около 26 пъти в сравнение с култивирането на стандартна LS среда и с около 2 пъти в сравнение с култивирането на оптимизирана LS среда в колби. Наблюдава се и значително повишаване на продуктивността (табл. 3). Постигнатата продуктивност от 268.4 mg/(L.day) е една от най-високите за розмаринова киселина, съобщавани досега. Получените данни са предпоставка за мащабирането на процеса за получаване на розмаринова киселина в биореактори с по-големи обеми с цел създаването на ефективна биотехнология за поучаването ѝ от клетъчен продуцент *L. vera* MM.

3. СЕЛЕКЦИЯ НА ВИСОКОПРОДУКТИВНИ КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ

За селекция на високопродуктивни клетъчни линии в нашите експерименти са използвани *p*- и *m*-флуоро-D,L-фенилаланин. Прорасналите калуси демонстрират различен растеж в зависимост от концентрацията на селекционния агент (табл. 4), като тенденцията е инхибиране на растежа с повишаване на концентрацията на MFP и PFP. При използването на MFP обаче се наблюдава по-слабо инхибиране на растежа (наблюдава се растеж до концентрации от 0.8 mM) на клетъчната

култура *L. vera* MM в сравнение с PFP (наблюдава се растеж до концентрации от 0.6 mM).

Таблица 4. Влияние на концентрацията на селекционните агенти върху растежа на клетъчна култура *Lavandula vera* MM

Селекционен агент	Брой изолирани линии	Степен на растеж
без селекционен агент (контрола)	8	+++++
0.2 mM MFP	5	++++
0.4 mM MFP	5	++++
0.5 mM MFP	4	+++
0.6 mM MFP	3	++
0.8 mM MFP	3	+
1.0 mM MFP	–	–
0.2 mM PFP	4	++++
0.4 mM PFP	4	+++
0.5 mM PFP	3	++
0.6 mM PFP	3	+
0.8 mM PFP	–	–

+++++ отличен (5); ++++ много добър (4); +++ добър (3); ++ среден (2); + слаб (1); – няма растеж (0)

Изолираните линии са анализирани за съдържание на розмаринова киселина (табл. 5 и 6).

Таблица 5. Съдържание на розмаринова киселина в получените калусни линии на *Lavandula vera* MM след въздействие с *m*-F-D,L-фенилаланин

Концентрация на MFP, (mM)	Линия	Розмаринова киселина, (mg/g суха биомаса)	% спрямо контролата
–	контрола *	5.08	100
0.2 mM MFP	MF1 ₁	4.56	90
	MF1 ₂	5.17	102
	MF1 ₃	4.47	88
	MF1 ₄	5.60	110
	MF1 ₅	4.60	91
0.4 mM MFP	MF2 ₁	4.82	95
	MF2 ₂	5.51	109
	MF2 ₃	5.17	102
	MF2 ₄	5.73	113
	MF2 ₅	6.12	121
0.5 mM MFP	MF3 ₁	6.12	121
	MF3 ₂	6.69	132
	MF3 ₃	5.95	117
	MF3 ₄	5.47	108
0.6 mM MFP	MF4 ₁	8.94	176
	MF4 ₂	7.11	140
	MF4 ₃	6.40	126
0.8 mM MFP	MF5 ₁	9.90	195
	MF5 ₂	8.21	162
	MF5 ₃	8.81	173

* средна стойност от 5 определени линии

От резултатите представените на табл. 5 се вижда, че изолираните линии при по-високите концентрации на MFP се отличават с по-високо съдържание на розмаринова киселина. Най-високо съдържание на розмаринова киселина (9.9 mg/g суха биомаса или 1.95 пъти повече в сравнение с контролата) показва линия *Lavandula vera* MM MF5₁.

В резултат на селекцията с PFP са изолирани 14 линии (табл. 6), които показват различно съдържание на розмаринова киселина, но се наблюдава тенденция за понижаване на количеството на биосинтезираната розмаринова киселина с повишаване на концентрацията на PFP, като при концентрация на селекционния агент 0.6 mM, определеното количество розмариновата киселина в линиите е с около 38 % по-ниско спрямо контролния вариант. От изолираните линии най-високо съдържание на розмаринова киселина (8.68 mg/g суха биомаса или 1.71 пъти повишение спрямо контролата) показва линия *Lavandula vera* MM PF1₃.

Таблица 6. Съдържание на розмаринова киселина в получените калусни линии на *Lavandula vera* MM след въздействие с p-F-D,L-фенилаланин

Концентрация на PFP, (mM)	Линия	Розмаринова киселина, (mg/g суха биомаса)	% спрямо контролата
–	контрола *	5.08	100
0.2 mM PFP	PF1 ₁	8.16	161
	PF1 ₂	7.95	156
	PF1 ₃	8.68	171
	PF1 ₄	6.56	129
0.4 mM PFP	PF2 ₁	7.16	141
	PF2 ₂	5.47	108
	PF2 ₃	5.43	107
	PF2 ₄	7.82	154
0.5 mM PFP	PF3 ₁	5.25	103
	PF3 ₂	3.65	72
	PF3 ₃	4.43	87
0.6 mM PFP	PF4 ₁	3.82	75
	PF4 ₂	3.08	61
	PF4 ₃	2.47	49

* средна стойност от 5 определени линии

На базата на получените резултати две линии [*Lavandula vera* MM MF5₁ (*L. vera* MF) и *Lavandula vera* MM PF1₆ (*L. vera* PF)] са избрани за следващите експерименти по адаптация към условията на дълбочинно култивиране в течна хранителна среда.

От съществено значение, за да бъде успешен един етап на селекция е запазването на постигнатите добиви на целевите метаболити. С оглед на това след 5 пасажа (препосоявания) и след 10 пасажа (препосоявания) съдържанието на розмаринова киселина в селектираните *L. vera* MF и *L. vera* PF калусни линии е проверено отново (табл. 7).

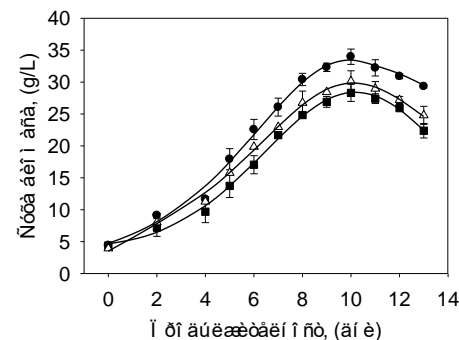
Таблица 7. Съдържание на розмаринова киселина в *L. vera* MM (контрола), *L. vera* MF и *L. vera* PF след 5 и 10 пасажа

	Първоначално определено количество РК ^а , (mg/g СБ) ^б	РК след 5 пасажа, (mg/g СБ)	Отклонение, (%) ^в	РК след 10 пасажа, (mg/g СБ)	Отклонение, (%) ^в
Контрола	5.08	4.91 ± 0.14	3.3	4.95 ± 0.10	2.6
<i>L. vera</i> MF	9.90	10.07 ± 0.20	1.7	9.55 ± 0.13	3.5
<i>L. vera</i> PF	8.68	8.38 ± 0.10	3.5	8.25 ± 0.11	5.0

^а РК – розмаринова киселина; ^б СБ – суха биомаса; ^в относителни, преизчислени спрямо средните стойности

Резултатите показват, че след 5 и 10 пасажа селектираните линии, а също и контролата показват стабилно съдържание на розмаринова киселина, като отклоненията са в рамките на допустимата грешка (между 1.7 и 5 %). Това ни дава основание да твърдим, че селектираните линии са със стабилни биосинтетични характеристики.

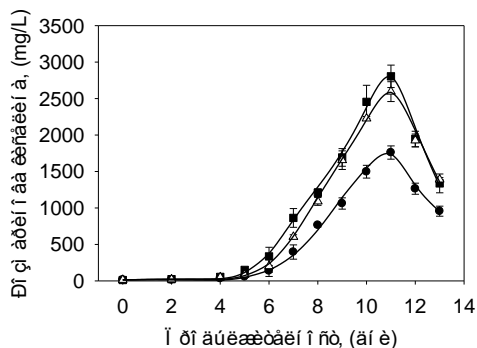
След двумесечна адаптация в течна LS хранителна среда (период на препосояване 7 дни) избраните линии са култивирани в LS оптимизирана среда. От данните показани на фиг. 11 се вижда, че профилът на развитие на селектираните линии като цяло следва динамиката на развитие на контролния вариант. Селектираните линии *L. vera* MF и *L. vera* PF обаче акумулират с 18 % (28.3 g/L) и 12 % (30.1 g/L) по-ниско количество биомаса, съответно. Това е и причината за *L. vera* MF и *L. vera* PF да бъдат калкулирани по-ниска специфична скорост на растеж и по-продължително време за удвояване (табл. 8).



Фиг. 11. Динамики на развитие на растителни клетъчни суспензии *L. vera* MF (■), *L. vera* PF (Δ) и *L. vera* MM (●) на оптимизирана LS хранителна среда

Динамиките на биосинтез на розмаринова киселина от изолираните клетъчни линии са представени на фиг. 12. Интензивният биосинтез на розмаринова киселина при изследваните линии започва на 6-тия ден от началото на култивиране, като максимумът се достига на 11-тия. *L. vera* MF и *L. vera* PF биосинтезират 2804.4 mg/L (около 159 % повече розмаринова киселина в сравнение с контролата) и 2594.6 mg/L (около 147 % повече

розмаринова киселина в сравнение с контролата), съответно. Количествата на биосинтезираната розмаринова киселина, представени като mg/g суха биомаса са 102.4 mg/g суха биомаса (1.88 пъти по-висок в сравнение с контролата) при *L. vera* MF и 89.5 mg/g суха биомаса (1.64 пъти по-висок в сравнение с контролата) при *L. vera* PF.



Фиг. 12. Динамики на биосинтез на розмаринова киселина от растителни клетъчни суспензии *L. vera* MF (■), *L. vera* PF (Δ) и *L. vera* MM (●) на оптимизирана LS хранителна среда

Сравнението между добивите на биомаса и розмаринова киселина спрямо вложен субстрат (захароза) (табл. 8) показва, че селекцията влияе в по-голяма степен върху добива на розмаринова киселина, отколкото върху добива на биомаса.

Таблица 8. Специфична скорост на растеж (μ), време за удвояване (t_d), добив на биомаса ($Y_{b/s}$) и добив на розмаринова киселина ($Y_{p/s}$) от клетъчни суспензии *L. vera* MM (контрола), *L. vera* MF и *L. vera* PF

	Контрола	<i>L. vera</i> MF	<i>L. vera</i> PF
μ , (1/h)	0.0069	0.0056	0.0051
t_d , (h)	100	124	136
$Y_{b/s}$, (g/g захароза)	0.6291	0.4993	0.5456
$Y_{p/s}$, (mg/g захароза)	36.3674	58.1831	53.7705

В обобщение на резултатите от този раздел трябва да се подчертае, че след селекцията с m-F-D,L-фенилаланин и p-F-D,L-фенилаланин са изолирани две линии със стабилни растежни характеристики и повишено съдържание на розмаринова киселина. Това показва, че селекцията с F-производни на аминокиселините е една ефективна стратегия за получаване на клетъчни линии, биосинтезиращи повишени количества розмаринова киселина.

4. ЕЛИСИТИРАНЕ НА *LAVANDULA VERA* MM

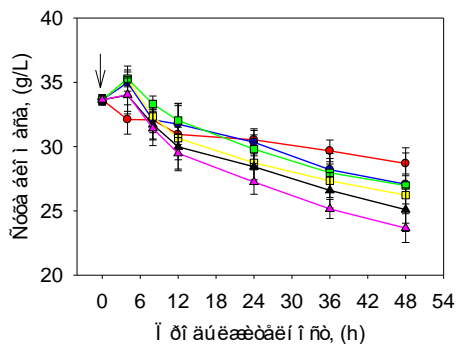
Розмариновата киселина с разнообразните си биологични активности (антимикробна, антивирусна, антиоксидантна) участва в защитата на растителната клетка срещу микроорганизми, вируси, тревопасни животни, други растителни видове и различни стресови фактори (Bourgau et al., 2001). Елиситирането е доказало своята ефективност за повишаване добива на вторични метаболити, участващи със своята биологична активност в защитата на растителната клетка (Singh, 1999), поради което може да се прилага успешно и за повишаване добива на розмаринова киселина от *L. vera* MM.

Изследвани са абиотичните елиситори: метилжасмонат, бензотиадиазол и ванадилсулфат. В резултат на предварителни експерименти е установено, че най-подходящото време за добавяне на тези елиситори към клетъчната суспензия *L. vera* MM е 11-тия ден от началото на култивирането, като на този ден клетъчната култура е достигнала максимума в развитието си. Добавянето им в по-ранен етап (5-тия, 7-мия и 9-тия ден от началото на култивирането) оказва отрицателно влияние, както върху развитието на клетъчната култура, така и върху биосинтеза на розмаринова киселина.

4.1. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЛИЯНИЕТО НА МЕТИЛЖАСМОНАТ

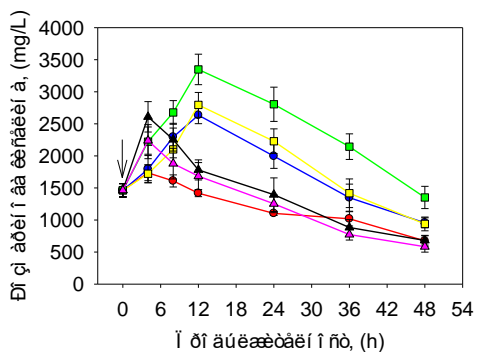
Изследвано е влиянието на различни концентрации на метилжасмонат (12.5 – 150 μ M/L) върху развитието на клетъчна култура *L. vera* MM и биосинтеза на розмаринова киселина.

Изменението на биомасата на клетъчна суспензия *L. vera* MM под влияние на изследваните концентрации на метилжасмонат е представено на фиг. 13. Прибавянето на елиситора повишава количеството на акумулираната биомаса още в самото начало на процеса (четвъртия час от елиситирането) при всички използвани концентрации. То е най-силно изразено при концентрация на елиситора 50 μ M/L, където добивът на биомаса достига 35.3 g/L (10 % увеличение в сравнение с контролата). Подобна е и степента на повишаване на биомасата и при двете по-ниски концентрации на елиситора – 12.5 μ M/L и 25 μ M/L (9 и 9.7 %, съответно). При 100 μ M/L и 150 μ M/L метилжасмонат се акумулира около 6 % повече биомаса. От осмия час след прибавяне на елиситора до края на процеса се наблюдава понижаване на количеството биомаса при всички използвани концентрации, което се дължи на отмиране и постепенен лизис на клетките. Динамиката на развитие на културата при елиситиране следва тази на контролното култивиране, като намалението на акумулираната биомаса е правопрпорционално на концентрацията на добавения метилжасмонат.



Фиг. 13. Динамика на развитие на суспензионна култура *Lavandula vera* MM след третиране с различни концентрации на метилжасмонат при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 12.5 µM/L; (■) 25 µM/L; (■) 50 µM/L; (▲) 100 µM/L; (▲) 150 µM/L

Изследвано е и влиянието на метилжасмоната върху биосинтеза на розмаринова киселина от суспензионна култура *L. vera* MM (фиг. 14 и 15). Количеството на биосинтезираната розмаринова киселина в клетките се повишава при всички изследвани концентрации на метилжасмонат (фиг. 14). Следва да се отбележи, че в зависимост от използваните концентрации на елиситора, максимален биосинтез се достига за различен период от време след добавянето му, като при по-високите концентрации, максимумът в биосинтеза на розмаринова киселина се постига за по-кратко време. Най-подходяща концентрация на метилжасмонат е 50 µM/L, като количеството на биосинтезираната розмаринова киселина е 3348 mg/L (на 12-тия час от началото на елиситирането), което е с около 2.4 пъти повече в сравнение с контролното култивиране.

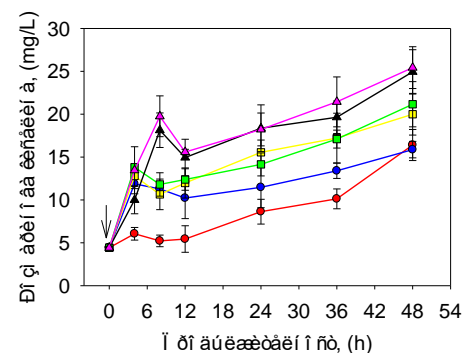


Фиг. 14. Съдържание на розмаринова киселина в биомасата на суспензионна култура *Lavandula vera* MM след третиране с различни концентрации на метилжасмонат при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 12.5 µM/L; (■) 25 µM/L; (■) 50 µM/L; (▲) 100 µM/L; (▲) 150 µM/L

По-високите концентрации на метилжасмонат (100 µM/L и 150 µM/L) оказват по-слабо елиситиращо въздействие върху синтеза на розмаринова киселина от клетъчна суспензия *L. vera* MM, като добивите на четвъртия час са съответно 2609 mg/L и 2238.5 mg/L (увеличение с 15 % и

13 % спрямо контролата), независимо от това, че други автори съобщават, че максимален биосинтез на розмаринова киселина от някои клетъчни продуценти се достига при влагане на елиситора в по-високи концентрации (Szabo et al., 1999; Li et al., 2005; Matsuno et al., 2002).

Проследени са и промените в съдържанието на външноклетъчна розмаринова киселина под въздействие на елиситора (фиг. 15). Някои автори съобщават, че елиситорите не влияят върху секрецията на розмаринова киселина (Szabo et al., 1999), но получените резултатите представени на фиг. 15 показват, че се наблюдава повишено съдържание на розмаринова киселина в културалната течност на *L. vera* MM вследствие на елиситирането.



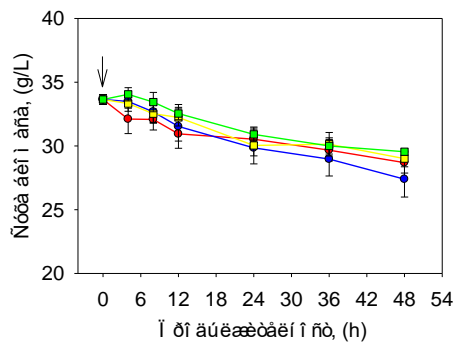
Фиг. 15. Съдържание на розмаринова киселина в културалната среда на суспензионна култура *Lavandula vera* MM след третиране с различни концентрации на метилжасмонат при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 12.5 µM/L; (■) 25 µM/L; (■) 50 µM/L; (▲) 100 µM/L; (▲) 150 µM/L

Количеството ѝ между четвъртия и осмия час от началото на процеса е между 11.9 и 19.8 mg/L, като при по-ниските концентрации на метилжасмонат, максимумът на розмаринова киселина се постига по-рано (4-тия час), а при по-високите – на 8-мия час. При 12.5, 25 и 50 µM/L се установява около 2 пъти повече розмаринова киселина, като количеството ѝ се повишава с увеличаване концентрацията на елиситора. При влагането на 100 µM/L метилжасмонат се достигат 18.1 mg/L розмаринова киселина в културалната среда, което е 3.5 пъти повече в сравнение с контролното култивиране. Най-силно въздействие върху секрецията оказва концентрация на метилжасмонат 150 µM/L, при която 19.8 mg/L розмаринова киселина се откриват в културалната среда. След дванадесетия час от добавяне на елиситора секрецията на розмаринова киселина се увеличава значително до края на процеса, като динамиките са аналогични на тази на контролата.

В заключение трябва да се отбележи, че биосинтезът на розмаринова киселина от клетъчна култура *L. vera* MM се стимулира под действието на метилжасмонат, като най-голям ефект оказва концентрация 50 µM/L, при която добивът на розмаринова киселина се увеличава 2.4 пъти.

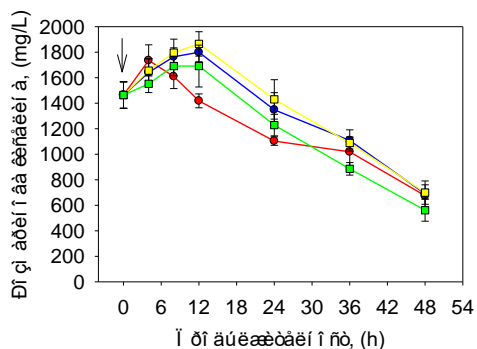
4.2. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЛИЯНИЕТО НА БЕНЗОТИАДИАЗОЛ

На фиг. 16 е представено развитието на клетъчната суспензия след прибавяне на бензотиадиазол. Установено е, че той не оказва влияние върху акумулирането на биомаса. При всички използвани концентрации на елиситора динамиките на развитие на клетъчната култура следват тази на контролата. До дванадесетия час на елиситирането се акумулира по-голямо количество биомаса (около 4 – 6 % в сравнение с контролата), а от този момент до края на процеса количествата ѝ са съизмерими с контролния вариант.



Фиг. 16. Динамика на развитие на суспензионна култура *Lavandula vera* MM след третиране с различни концентрации на бензотиадиазол при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 25 µM/L; (■) 50 µM/L; (■) 100 µM/L

Елиситиращото действие на бензотиадиазолът върху биосинтеза на розмаринова киселина в клетките на *L. vera* MM е по-слабо (фиг. 17) в сравнение с метилжасмоната.

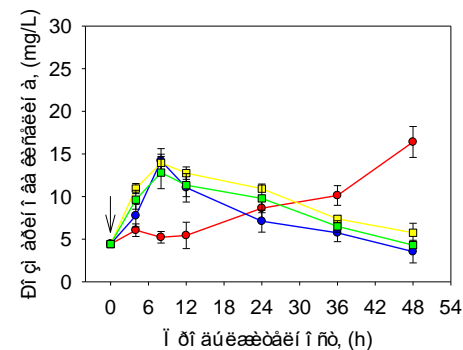


Фиг. 17. Съдържание на розмаринова киселина в биомасата на суспензионна култура *Lavandula vera* MM след третиране с различни концентрации на бензотиадиазол при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 25 µM/L; (■) 50 µM/L; (■) 100 µM/L

При всички използвани концентрации на елиситора максимален биосинтез се достига на 12-тия час от елиситирането, като получените добиви са с 20 – 30 % по-високи спрямо контролното култивиране на този час. Трябва да се отбележи обаче, че тези добиви са съизмерими с

максимума на биосинтезирана розмаринова киселина в контролата на четвъртия час след прибавянето на елиситора. След достигане на максимума се наблюдава постепенно намаляване на концентрацията на розмаринова киселина в клетките на суспензионната култура, като динамиката е аналогична на тази при контролното култивиране, а количествата ѝ са съизмерими с него.

Количествата на външноклетъчната розмаринова киселина при контролния вариант са около 6 mg/L до 12-тия час след добавянето на елиситора, след което количеството ѝ се повишава до 17 mg/L (фиг. 18). Максимумът в количеството на външноклетъчната розмаринова киселина се наблюдава на осмия час след третиране с елиситора, като и при трите концентрации на бензотиадиазол количествата на розмариновата киселина в културалната среда са с около 2.5 – 2.7 пъти повече в сравнение с контролата. От 12-тия до 48-мия час на елиситирането, в резултат на лизисните процеси в клетките, количеството на розмариновата киселина в културалната среда при контролното култивиране се повишава и достига 16.4 mg/L, докато при елиситирането с бензотиадиазол се наблюдава обратен ефект, като след достигане на максимума количеството ѝ в средата намалява с 3 – 5 пъти спрямо контролата (фиг. 18). Този ефект е свързан с въздействието на елиситора бензотиадиазол, който влияе не само на секрецията на розмаринова киселина, но активира и ензимите, отговорни за нейното разграждане до нивото на контролния вариант.



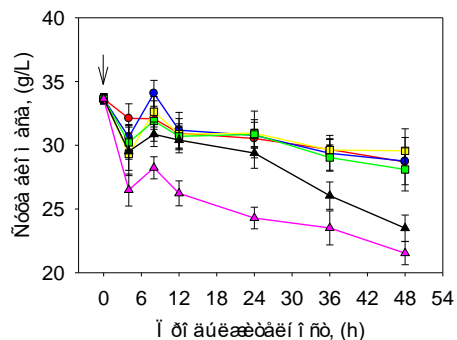
Фиг. 18. Съдържание на розмаринова киселина в културалната среда на суспензионна култура *Lavandula vera* MM след третиране с различни концентрации на бензотиадиазол при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 25 µM/L; (■) 50 µM/L; (■) 100 µM/L

В резултат на проведените експерименти може да се заключи, че бензотиадиазолът не оказва ефективно въздействие върху биосинтеза на розмаринова киселина и развитието на клетъчната суспензия.

4.3. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЛИЯНИЕТО НА ВАНАДИЛСУЛФАТ

Изследвано е влиянието на ванадилсулфата, прибавен в различни концентрации, върху развитието на клетъчна култура *L. vera* MM и

биосинтеза на розмаринова киселина по схемата, описана в материали и методи.



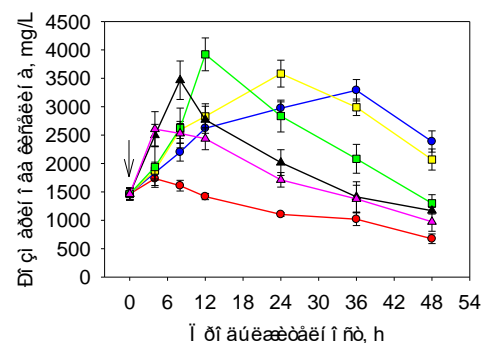
Фиг. 19. Динамика на развитие на суспензионна култура *Lavandula vera* MM след третиране с различни концентрации на ванадилсулфат при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 6.25 mg/L; (■) 12.5 mg/L; (■) 25 mg/L; (▲) 50 mg/L; (▲) 75 mg/L)

Резултатите, представени на фиг. 19 показват, че при всички използвани концентрации на ванадилсулфат, количеството на синтезираната клетъчна маса се понижава на 4-тия час след прибавянето му. Това намаляване вероятно се дължи на променения пермеабилитет на клетъчната стена под въздействие на елиситора, при което в културалната среда се секретира част от клетъчното съдържание (Chen and Chen, 2000). Този негативен ефект се преодолява до 8-мия час след добавянето на елиситора, като при концентрации от 6.25 mg/L до 25 mg/L количеството на акумулираната биомаса е малко по-високо или съизмеримо с контролата, докато при по-високите концентрации на елиситора (50 mg/L и 75 mg/L) количеството ѝ, независимо че се повишава е значително по-ниско в сравнение с контролното култивиране (фиг. 19). От 8-мия час на елиситирането до края на процеса, при концентрации от 6.25 до 25 mg/L биомасата намалява, като динамиката следва тази на контролата и количествата са съизмерими с нея. Изключение правят концентрации 50 mg/L и 75 mg/L, при които намалението на клетъчна маса е по-драстично в сравнение с контролата (фиг. 19).

Влиянието на ванадилсулфатът върху биосинтеза на розмаринова киселина в клетките на *L. vera* MM се изразява в увеличение на биосинтеза ѝ при всички използвани концентрации на елиситора, но е различно времето, за което се постига максимален ефект (фиг. 20). Следва да се отбележи, че колкото по-ниска е концентрацията на ванадилсулфата, толкова по-продължително въздействие върху клетките на *L. vera* MM е необходимо за да се постигне максимумът в биосинтеза на розмаринова киселина. При концентрация на елиситора 6.25 mg/L количеството ѝ достига 3290 mg/L на 36-тия час от елиситирането, а при 12.5 mg/L се синтезират 3582.8 mg/L розмаринова киселина на 24-тия час, а при 50 mg/L

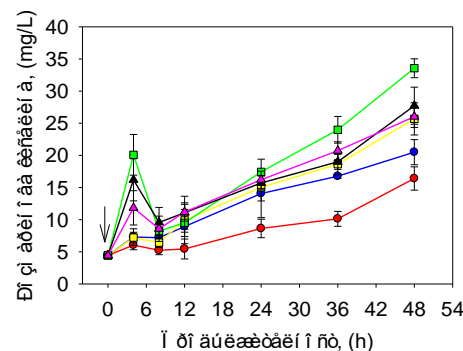
се синтезират 3466.5 mg/L розмаринова киселина на 8-мия час след елиситирането.

Най-високо съдържание на киселината в клетъчната биомаса се постига при концентрация на ванадилсулфат 25 mg/L, при която количеството на розмаринова киселина достига своя максимум на 12-тия час от началото на елиситирането (3922.1 mg/L). В сравнение с неелиситираните клетки този добив на розмаринова киселина е с около 2.8 пъти по-висок, като това е един от най-високите постигнати добиви на розмаринова киселина от растителни клетъчни култури, съобщени до сега. По-високите концентрации на ванадилсулфат също водят до повишаване на биосинтеза на розмаринова киселина, но получените количества са по-ниски в сравнение с останалите използвани концентрации (фиг. 20).



Фиг. 20. Съдържание на розмаринова киселина в биомасата на суспензионна култура *L. vera* MM след третиране с различни концентрации на ванадилсулфат при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 6.25 mg/L; (■) 12.5 mg/L; (■) 25 mg/L; (▲) 50 mg/L; (▲) 75 mg/L)

Максимално количество розмаринова киселина в културалната среда е установено четири часа след третиране с елиситора (между 7.3 mg/L и 20.1 mg/L). Този максимум съвпада с понижението в клетъчната биомаса на четвъртия час след третиране с елиситора (фиг. 19), което потвърждава факта, че елиситорът повишава пермеабилитета на клетките.



Фиг. 21. Съдържание на розмаринова киселина в културалната среда на суспензионна култура *L. vera* MM след третиране с различни концентрации на ванадилсулфат при култивиране в колби на клатачка. (↓) Време на добавяне на елиситора; (●) контрола; (●) 6.25 mg/L; (■) 12.5 mg/L; (■) 25 mg/L; (▲) 50 mg/L; (▲) 75 mg/L)

Най-голямо количество розмаринова киселина (4.6 пъти повече в сравнение с контролата) се установява при третиране с 25 mg/L ванадилсулфат (фиг. 21). При прибавянето 50 и 75 mg/L ванадилсулфат в културалната среда с определят 16 mg/L и 12 mg/L розмаринова киселина, съответно. От четвъртия до осмия час след внасянето на ванадилсулфата съдържанието на розмаринова киселина рязко намалява, което най-вероятно се дължи на факта, че повишените ѝ концентрации активират разграждащите я пероксидази (Szabo et al., 1999). От 12-тия час на елиситирането до края на процеса при всички концентрации на елиситора се наблюдава увеличение на количеството на розмаринова киселина във външноклетъчното пространство, като динамиката на увеличаване следва тази на контролата. На 48-мия час след добавянето на елиситора тя достига 20.5 – 33.6 mg/L. Това най-вероятно се дължи както на лизисните процеси, които се развият в клетките и на интензифициране на секрецията ѝ в културалната среда, под въздействие на елиситора.

Трябва да се отбележи, че биосинтезът на розмаринова киселина от клетъчна суспензия *L. vera* MM значително се увеличава при елиситиране с ванадилсулфат, като най-подходяща е концентрация на елиситора 25 mg/L. Полученият добив от 3922.1 mg/L е един от най-високите добиви на розмаринова киселина от растителни клетъчни култури, съобщавани до сега.

В заключение, сравнението на получените в настоящия раздел резултати и някои от най-високите добиви на розмаринова киселина, съобщени в литературата (табл. 9) показва, че вследствие на елиситирането с ванадилсулфат и метилжасмонат, постигнатите добиви на киселината от клетъчна култура *L. vera* MM са едни от най-високите, съобщавани досега, като продуктивността (mg/L.day) значително надвишава тези от *Anchusa officinalis* и *Salvia officinalis*. Съществено е да се отбележи и това, че съобщаваните по-високи добиви и продуктивност от *Coleus blumei* (Ulbrich et al., 1985) се постигат чрез двустепенно култивиране, което от своя страна води до допълнително оскъпяване на биотехнологичния процес.

Таблица 9. Сравнение на постигнатите добиви на розмаринова киселина и продуктивност от различните ѝ клетъчни продуценти

Параметър	<i>Anchusa officinalis</i> ^а	<i>Coleus blumei</i> ^б	<i>Salvia officinalis</i> ^в	<i>Lavandula vera</i> MM ^г	<i>Lavandula vera</i> MM ^д
Добив, (mg PK/L)	3700	5500	6500	3922	3348
Продължителност, (дни)	14	14	25	11.5	11.5
Продуктивност, (mg/L.day)	264	393	260	339	291

^а Su et al., 1995; ^б Ulbrich et al., 1985 (двустепенен процес); ^в Hippolyte et al., 1992; ^г Елиситиране с 25 mg/L ванадилсулфат; ^д Елиситиране с 50 µM/L метилжасмонат

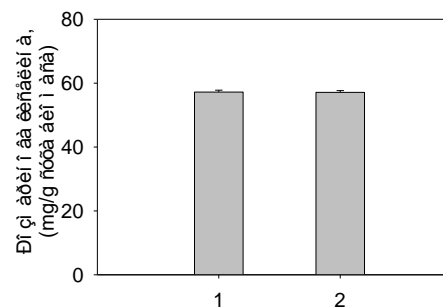
Получените резултати показват, че елиситирането с ванадилсулфат и метилжасмонат може да се използва като ефективна стратегия за повишаване на добивите на розмаринова киселина от клетъчен продуцент *Lavandula vera* MM с цел създаването на икономически ефективна биотехнология за получаването ѝ.

5. ИЗОЛИРАНЕ И ПРЕЧИСТВАНЕ НА РОЗМАРИНОВАТА КИСЕЛИНА

Важен етап за получаване на розмаринова киселина чрез клетъчна биотехнология е разработването на подходящи методи за екстракцията ѝ от клетъчната биомаса на *Lavandula vera* MM и следващото ѝ пречистване.

5.1. Екстракция на розмариновата киселина от клетките на продуцента

Изследвани са възможностите на вода, водно-алкохолни смеси и оцетна киселина като екстрагенти, за които има съобщения, че са подходящи за екстракция на фенолни киселини, в това число и розмаринова киселина от различни източници (Petersen, 1994; Kovacheva et al., 1996; Caniova and Brandsteterova, 2001).



Фиг. 22. Съдържание на розмаринова киселина в биомаса от клетъчна култура *Lavandula vera* MM преди лиофилизация (1) и след лиофилизация (2)

При анализ на розмариновата киселина в екстракти от клетъчната биомаса преди и след лиофилизация, е установено, че процесът на лиофилизация не води до промяна в съдържанието ѝ (фиг. 22). Следователно, технологичното решение кой материал е за предпочитане при изолирането на розмариновата киселина от биомасата е свързано с намиране на най-подходящи условия за екстракция на киселината.

На таблици 10 – 12 са показани резултатите от екстракцията на розмаринова киселина от влажна клетъчна биомаса с използване на вода и водно-алкохолни смеси.

Таблица 10. Розмаринова киселина във водно-алкохолни екстракти от влажна клетъчна биомаса *Lavandula vera* MM

Вид на екстрагента	Розмаринова киселина, (mg/g суха биомаса)	% спрямо контролата **
70 % етанол	19.25 ± 0.67	102
50 % етанол	19.45 ± 0.60	103
40 % етанол	23.36 ± 0.19	124
30 % етанол	21.48 ± 0.76	114
70 % метанол *	18.83 ± 0.79	100
50 % метанол	22.85 ± 0.63	121
40 % метанол	29.64 ± 0.56	157
30 % метанол	25.31 ± 0.45	134

* контрола; ** относителни, преизчислени спрямо средните стойности

Данните от табл. 10 показват, че и при двата варианта на водно-алкохолни екстрагенти, най-добра степен на екстракция се постига с 40 % алкохолни разтвори, при което количествата на екстрахираната розмаринова киселина с 40 % метанол и 40 % етанол са съответно 157 % и 124 % спрямо контролата. Като се има предвид обаче високата токсичност на метанола и приложимостта на розмариновата киселина главно като хранителна добавка, 40 % етанол е за предпочитане при получаване на екстракти и препарати от розмаринова киселина, независимо от по-слабата (с около 30 %) му екстракционна способност. Поради тази причина е изследвана екстракцията на розмариновата киселина с 40 % етанол при по-мек условия: при стайна температура и без механично стриване. За постигане на по-голям екстракционен ефект са проведени и екстракции при по-голяма продължителност на процеса (3 x 40 min). Резултатите показват (табл. 11), че при екстракция при стайна температура, както и без предварително стриване на биомасата се постигат резултати близки до максимално екстрахираното количество на розмаринова киселина с 40 % етанол (съответно 93 % и 96 %). По-голямата продължителност на процеса не води до по-ефективна екстракция на розмариновата киселина (табл. 11).

Таблица 11. Розмаринова киселина в екстракти от влажна биомаса от клетъчна култура *Lavandula vera* MM, екстрахирана с 40 % разтвор на етилов алкохол при различни условия

Вид на екстрагента	Розмаринова киселина, (mg/g суха биомаса)	% спрямо контролата **
40 % етанол *	23.36 ± 0.19	100
40 % етанол а	21.72 ± 0.17	93
40 % етанол б	22.49 ± 0.30	96
40 % етанол в	21.44 ± 0.26	92

* контрола; ** относителни, преизчислени спрямо средните стойности; а стайна температура (около 25°C); б без механично стриване с кварцов пясък; в продължителност на екстракцията 3 x 40 min

От гледна точка безопасност на процеса, както и на икономическата му ефективност, при производството на концентрати и препарати на розмаринова киселина, интерес представлява да се изучи възможността за екстракцията ѝ с вода (Ulbrich et al., 1985) и различни концентрации на оцетна киселина (Tanaka et al., 2001). Получените резултати показват, че екстракционната способност на водата и на 10 и 15 % разтвори на оцетната киселина е по-ниска от тази на водно-алкохолните смеси (табл. 19). Най-високата степен на екстракция (89 %) се постига с използване на подкислена с оцетна киселина вода (pH 3) при 80°C. Това е резултатът, който след съответен икономически анализ, може да окаже ефективен вариант за един технологичен процес.

Таблица 12. Розмаринова киселина във водни екстракти от влажна клетъчна биомаса на *Lavandula vera* MM

Вид на екстрагента	Розмаринова киселина, (mg/g суха биомаса)	% спрямо контролата **
70 % метанол *	18.83 ± 0.79	100
вода 70°C	10.68 ± 0.48	57
вода 70°C а	12.86 ± 0.89	68
вода 80°C	13.67 ± 0.95	73
вода 80°C а	16.78 ± 0.63	89
10 % оцетна киселина	2.73 ± 0.50	14.5
15 % оцетна киселина	9.21 ± 0.14	49

* контрола; ** относителни, преизчислени спрямо средните стойности; а pH на водната фаза е равна на 3

На база получените резултати от екстракцията на розмариновата киселина от влажната биомаса, опитите за екстракцията ѝ от лиофилизиран материал са проведени с 40 % разтвори на метанол и етанол, както и с вода (pH 3, температура 80°C) при различни хидромодули (табл. 13). И в този случай, най-добри резултати се получават с 40 % метанол и 40 % етанол при хидромодул 1 : 30 (съответно 153 % и 124 % в сравнение с контролата). Екстракцията с подкислена вода при 80°C дава идентичен резултат с този при влажната биомаса.

Таблица 13. Розмаринова киселина във водни и водно-алкохолни екстракти от лиофилизирана биомаса на *Lavandula vera* MM

Вид на екстрагента	Розмаринова киселина, (mg/g суха биомаса)	% спрямо контролата **
70 % метанол *	35.38 ± 0.72	100
40 % етанол а	40.29 ± 0.10	114
40 % етанол б	43.83 ± 0.33	124
40 % етанол в	40.81 ± 0.69	115
40 % метанол а	51.63 ± 0.68	146
40 % метанол б	54.13 ± 0.41	153
40 % метанол в	52.50 ± 0.45	148
вода а	29.34 ± 0.69	83
вода б	31.38 ± 0.44	89
вода в	30.43 ± 0.57	86

* контрола; ** относителни, преизчислени спрямо средните стойности; хидромодул : а 1 : 20; б 1 : 30; в 1 : 40

В литературата се съобщава (Tada et al., 1996), че смесването на сухата биомаса с екстрагента и престояването на сместа за определен период от време води до подобряване на степента на екстракция на розмаринова киселина. Нашите опити с престояване на екстракционната смес показват обаче по-ниска степен на извличане на киселината (табл. 14).

Таблица 14. Екстракция * на розмаринова киселина от лиофилизирана биомаса от *Lavandula vera* MM с предварително смесване със съответния екстрагент

Вид на екстрагента	Розмаринова киселина, (mg/g суха биомаса)	% спрямо контролата ***
70 % метанол **	35.38 ± 0.72	100
40 % етанол а	25.85 ± 0.23	73
40 % етанол б	24.54 ± 0.33	69
40 % метанол а	26.46 ± 0.51	75
40 % метанол б	22.87 ± 0.68	65
вода а	15.15 ± 0.30	43
вода б	12.51 ± 0.25	35

* хидромодул 1 : 30, температура 70°C за етанол и метанол и 80°C за вода, продължителност – престояване на екстракционната смес при стайна температура за а – 8 h и б – 16 h и след това трикратна екстракция по 20 min; ** контрола; *** относителни, преизчислени спрямо средните стойности

В заключение, най-подходящ екстрагент, както от влажна биомаса, така и от лиофилизирана, е 40 % етанол. При екстракция на розмариновата киселина с подкислена вода (рН 3) е постигнат добив от 89 % спрямо контролата, което също е добра възможност за използването на водата като екстрагент при един технологичен процес.

5.2. Пречистване на розмариновата киселина от първичния екстракт

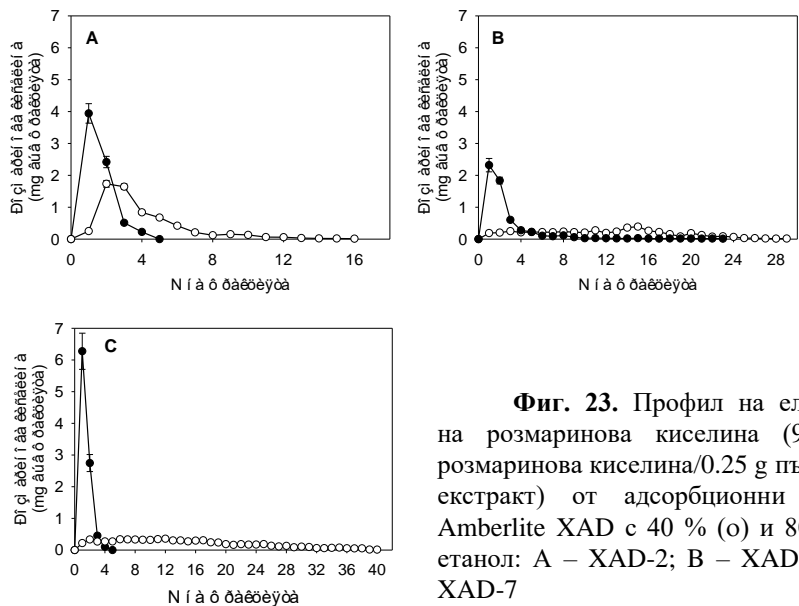
На следващия етап са изследвани възможностите за пречистване на розмаринова киселина от първичния екстракт.

5.2.1. Пречистване на розмариновата киселина чрез колонна хроматография на Amberlite XAD смоли

За получаване на обогатени екстракти на розмаринова киселина от първичните й екстракти от клетъчната култура *L. vera* MM са изпитани възможностите на колонната хроматография, с използване на различни адсорбционни смоли Amberlite XAD-2, 4 и 7.

Като първи етап от изследването са проведени опити по изучаване на адсорбцията на розмаринова киселина от първичните екстракти от клетъчната биомаса върху смолите Amberlite XAD-2, 4 и 7. Адсорбцията на розмариновата киселина върху смолите се осъществява от водни разтвори с концентрация 0.5 mg/mL при рН 3. Процесът на адсорбция на розмариновата киселина се контролира чрез тънкослойна хроматография (ТСХ) на преминаващите през колоните фракции. Резултатите показват, че от пропуснатите през трите смоли разтвори, розмариновата киселина се задържа количествено при рН 3 и съотношение първичен екстракт : смола = 25 mg екстракт (съдържащ 1 mg розмаринова киселина) : 1 mL смола.

Процесът на елуиране се осъществява с водно-етанолни разтвори (40 % и 80 %) и се контролира, аналогично на адсорбцията, чрез ТСХ на отделните фракции. Количественото определяне на розмариновата киселина във фракциите, в които е установено наличието ѝ се осъществява спектрофотометрично, като получените резултати под формата на елуентни криви са представени на фиг. 23. Както се вижда от фигурата по-висока степен на елуиране и в по-малък брой фракции се постига с използване на елуент 80 % етанол и от трите смоли (например от XAD-4 с 80 % етанол добивът е 64 %, а с 40 % етанол е 56 %, по отношение на розмариновата киселина). С по-висока ефективност се оказва пречистването на розмариновата киселина от първичните екстракти при използването на смолите Amberlite XAD-2 и 7. Добивът при XAD-7 е 98 %, при XAD-2 – 73 % при елуиране с 80 % етанол, докато при Amberlite XAD-4 той е 64 % (фиг. 23).



Фиг. 23. Профил на елиране на розмаринова киселина (9.7 mg розмаринова киселина/0.25 g първичен екстракт) от адсорбционни смоли Amberlite XAD с 40 % (o) и 80 % (•) етанол: А – XAD-2; В – XAD-4; С – XAD-7

При хроматографското разделяне на първичните екстракти върху смолите Amberlite XAD-2 и 7 се получават обогатени препарати на розмаринова киселина (със съдържание на розмаринова киселина съответно 27.94 % и 29.80 %) с висок добив (73.20 % и 98.81 %, съответно) (табл. 15).

Таблица 15. Добив и съдържание на розмаринова киселина в екстракти от *Lavandula vera* MM

	Добив, (%)	Съдържание на розмаринова киселина в препарата, (%)
Първичен екстракт а	100	3.88
Адсорбция на Amberlite XAD		
XAD-2 елуат б	73.20 ± 4.80	27.94 ± 1.59
XAD-4 елуат б	61.04 ± 3.59	18.93 ± 1.48
XAD-7 елуат б	98.81 ± 0.34	29.80 ± 1.59
Екстракция с етилацетат	74.87 ± 5.16	72.56 ± 2.03

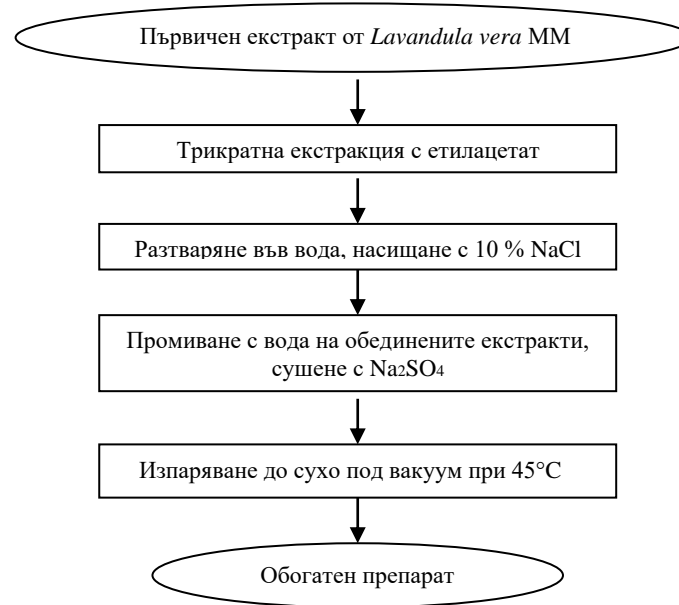
а Първичният екстракт съдържа 38.80 mg розмаринова киселина за грам сухо тегло; б Елирането е осъществено с 80 % етанол

5.2.2. Екстракция с етилацетат

Известно е, че фенолните киселини, респективно розмариновата киселина могат да бъдат екстрахирани с естери на алифатните карбоксилони киселини като етилацетат (Kovacheva et al., 1996; Psotova et

al., 2003). Схемата, по която е извършено пречистването с етилацетат, е представена на фиг. 24.

Получените резултати (табл. 15) показват, че добивът на розмаринова киселина е 74.87 % спрямо изходното ѝ количество. Съдържанието на розмариновата киселина се повишава 18.7 пъти, в сравнение с първичния екстракт (72.56 % съдържание на розмаринова киселина в получения препарат).



Фиг. 24. Схема за получаване на обогатен на розмаринова киселина препарат от първичен екстракт на *Lavandula vera* MM, чрез екстракция с етилацетат

5.2.3. Утаяване с калциев хидроксид

В някои ранни публикации (Scarpati and Oriente, 1958; Ellis and Towers, 1970; Razzaque and Ellis, 1977) се съобщава за изолиране на розмариновата киселина чрез утаяване с оловни соли. Тази процедура обаче не е подходяща, за получаването на продукти за хранителни цели, поради токсичността на оловото. Напоследък Тапака и сътр. (2001) използват калциев хидроксид, като утаяват розмариновата киселина под формата на Са- розмаринат. Този метод използвахме и в нашите експерименти. Резултатите, представени на табл. 16 показват, че в резултат на трикратно утаяване само 34 % от розмариновата киселина в разтвора пада като утайка под формата на калциев розмаринат. В резултат на това може да се заключи, че калциев хидроксид не предлага ефективна възможност за получаване на препарати, съдържащи розмаринова киселина.

Таблица 16. Утаяване на розмаринова киселина с калциева основа

Стъпка	Розмаринова киселина, (mg в разтвора)	Утаена розмаринова киселина, (mg)
Първичен екстракт	19.40	0
Първо утаяване	17.49 ± 0.18	1.91 ± 0.18
Второ утаяване	13.38 ± 0.29	4.11 ± 0.29
Трето утаяване	12.82 ± 0.05	0.56 ± 0.05

В заключение трябва да се отбележи, че най-висока степен на пречистване на розмариновата киселина се постига чрез прилагане на екстракция с етилацетат, като съдържанието ѝ в получения препарат достига 72.56 %. При хроматографското пречистване на Amberlite XAD смоли най-добри резултати се постигат при използването на Amberlite XAD-7 и елуиране с 80 % етанол (получените препарати са със съдържание на розмаринова киселина 29.8 %).

ИЗВОДИ

От проведените изследвания са получени следните по-важни резултати:

1. Осъществен е трансфер на процеса на култивиране на *L. vera* MM в 3-литров лабораторен биореактор, както следва:

1.1. В резултат на еднофакторен експеримент за изследване влиянието на условията на култивиране в лабораторен биореактор са определени максималните значения на факторите, влияещи върху развитието на клетъчната култура *L. vera* MM и биосинтеза на розмаринова киселина.

1.2. На база получените данни, с помощта на математическото моделиране са оптимизирани условията на култивиране в лабораторен биореактор (dO_2 – 50 %, скорост на разбъркване – 400 min⁻¹ и температура – 29.9 °C), в резултат на което е постигнат добив на розмаринова киселина от 3489.4 mg/L (около 2 пъти по-висок в сравнение с добива при култивиране в колби).

1.3. Изследвана е физиологичната характеристика на клетъчна култура *L. vera* MM при установените оптимални условия в лабораторен биореактор.

1.4. Установена е обратнопропорционалната корелационна зависимост между специфичната електропроводимост на средата и развитието на културата. Това разкрива възможност за по-добър контрол и управление на биосинтетичния процес, при култивиране на *L. vera* MM в биореактори с по-големи обеми.

2. Чрез използване на селекционните агенти m- и p-F-D,L-фенилаланин са получени високопродуктивните клетъчни линии *L. vera* MF и *L. vera* PF, които са със стабилни растежни и биосинтетични

характеристики. Проведени са опити по адаптация на получените линии към дълбочинно култивиране и са изследвани динамиките на развитие и биосинтез на розмаринова киселина. Установено е, че постигнатите добиви на розмаринова киселина са с 1.95 пъти и 1.71 пъти по-високи в сравнение с изходния клетъчен щам.

3. Изследвани са възможностите на различни абиотични елиситори (метилжасмонат, бензотиадиазол и ванадилсулфат) за повишаване добива на розмаринова киселина и е установено, че:

3.1. Биосинтезът на розмаринова киселина от клетъчна култура *L. vera* MM се стимулира под действието на метилжасмонат, като при концентрация на елиситора 50 µM/L полученият добив на розмаринова киселина е 2.4 пъти по-висок в сравнение с неелиситираните клетки.

3.2. За първи път е изследвано влиянието на ванадилсулфат, като елиситор за повишаване на добива на розмаринова киселина. Най-ефективно е елиситирането с 25 mg/L ванадилсулфат, като полученият добив е около 2.8 пъти по-висок в сравнение с неелиситираните клетки.

3.3. Бензотиадиазолът на оказва ефективно въздействие както върху биосинтеза на розмаринова киселина, така и върху развитието на клетъчната суспензия *L. vera* MM.

4. Изследван е процесът на изолиране и пречистване на розмариновата киселина от клетките на продуцента, при което е установено, че:

4.1. Най-подходящ екстрагент, както от влажна, така и от лиофилизирана биомаса е 40 % етанол. Екстракцията с подкислена вода (pH 3) е добра възможност за изолиране на розмариновата киселина при един технологичен процес.

4.2. Чрез пречистване на първичния екстракт с етилацетат, са получени препарати със съдържание на розмаринова киселина 72.56 %, а при прилагане на хроматографско пречистване с Amberlite XAD-7 получените препарати съдържат 29.8 % розмаринова киселина.

ПУБЛИКУВАНИ МАТЕРИАЛИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

СТАТИИ В МЕЖДУНАРОДНИ СПИСАНИЯ И СБОРНИЦИ

1. A. Pavlov, **M. Georgiev**, M. Burrus and M. Ilieva (2003) Cultivation of plant cell suspension cultures in 3L lab bioreactor. 1. Relationship between dissolved oxygen, growth and rosmarinic acid biosynthesis by *Lavandula vera* MM cell suspension, *Proceedings of First International Congress on Bioreactor Technology in Cell, Tissue Cultures and Biomedical Applications*, Tampere, Finland, pp. 243-249.
2. **M. Georgiev**, A. Pavlov and M. Ilieva (2004) Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: Temperature effect, *Biotechnology Letters*, 26(10): 855-856. **IF 0.778/03**
3. A. Pavlov, **M. Georgiev**, I. Panchev and M. Ilieva (2005) Optimisation of rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM plant cell suspension in a laboratory bioreactor, *Biotechnology Progress*, 21: 394-396. **IF 1.488/03**
4. **M. Georgiev**, E. Kovacheva, N. Marcheva and M. Ilieva (2005) Purification of rosmarinic acid extracts from *Lavandula vera* MM cell biomass, *Food Chemistry*, in press. **IF 1.204/03**
5. A. Pavlov, **M. Georgiev** and M. Ilieva (2005) Production of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in bioreactor: effect of dissolved oxygen concentration and agitation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, in press. **IF 0.516/03**

СТАТИИ В БЪЛГАРСКИ СПИСАНИЯ

6. **М. Георгиев**, Е. Ковачева, А. Павлов и М. Илиева (2003) Екстракция на розмаринова киселина от клетъчна биомаса на *Lavandula vera* MM, *Юбилейна Научна конференция "50 години ВИХВП"*, Том L, св. 3, 182-187.