

Информационни и комуникационни науки и технологии

Енергийни ресурси и енергийна ефективност

Нанонауки, нови материали и технологии

Биомедицина и качество на живот

Биоразнообразие, биоресурси и екология

Климатични промени, рискове и природни ресурси

Астрономия, космически изследвания и технологии

Културно-историческо наследство и национална идентичност

Човек и общество

Оформлението на Библиотека „Дисертации и автореферати“
на Академично издателство „Проф. Марин Дринов“ отговаря на БДС ISO 7144.

© 2014 г., инж. Андрей Стоянов Марчев
© 2014 г., Академично издателство „Проф. Марин Дринов“

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

инж. Андрей Стоянов Марчев

Биологично активни вещества от редки български видове *Salvia* и техни *in vitro* култури

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Професионално направление: **4.3** „Биологически науки“

Научна специалност: **02.11.11** Технология на биологично
активните вещества

Научни ръководители:

проф. д.т.н. Атанас Иванов Павлов

проф. д.т.н. Албена Стоянова Стоянова

София
2014 г.



Дисертационният труд обхваща 288 страници, съдържа 68 фигури и 43 таблици. Библиографската справка включва 279 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на научния семинар по Приложна микробиология и микробни биотехнологии на 08.05.2014 г. в Институт по микробиология на БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

Дисертантът работи в Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, департамент „Приложна микробиология“, Лаборатория по приложни биотехнологии.

Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в Лабораторията по приложни биотехнологии, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН. Част от изследванията са извършени в Институт по органична химия с Център по фитохимия – БАН; Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и Агробиоинститут – София.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

инж. Андрей Стоянов Марчев

**БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА ОТ РЕДКИ
БЪЛГАРСКИ ВИДОВЕ *Salvia* И ТЕХНИ *in vitro* КУЛТУРИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Професионално направление: **4.3** „Биологически науки“
Научна специалност: **02.11.11** Технология на биологично
активните вещества

Научни ръководители:

проф. д.т.н. Атанас Иванов Павлов

проф. д.т.н. Албена Стоянова Стоянова

Рецензенти:

проф. д-р. Страхил Христов Берков

акад. Атанас Иванов Атанасов, д.с.н.

София

2014 г.



инж. Андрей Стоянов Марчев

**БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА ОТ РЕДКИ
БЪЛГАРСКИ ВИДОВЕ *Salvia* И ТЕХНИ *in vitro* КУЛТУРИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Професионално направление: **4.3** „Биологически науки“
Научна специалност: **02.11.11** Технология на биологично
активните вещества

Научни ръководители:

проф. д.т.н. Атанас Иванов Павлов

проф. д.т.н. Албена Стоянова Стоянова

Рецензенти:

проф. д-р. Страхил Христов Берков

акад. Атанас Иванов Атанасов, д.с.н.

София

2014 г.



ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

2,4-D	2,4-Дихлорфеноксioцетна киселина
ABTS	2,2'-Азино-бис (3-етилбензтиазолин-6-сулфонова) киселина
AChE	Ацетилхолинестераза
ADB	Акумулирана суха биомаса
BAP	6-Бензиламинопурин
BChE	Бутирилхолинестераза инхибираща активност
CUPRAC	Мед редуциращ антиоксидантен капацитет
GC (ГХ)	Газ хроматографски анализ
GC/MS (ГХ/МС)	Газ хроматографски/мас спектрален анализ
GIDW	Растежен индекс по суха биомаса
DPPH	2,2-Дифенил-1-пикрилхидразин
DW	Суха биомаса
FDA	The United States Food and Drug Administration
FRAP	Желязо редуциращата способност на плазма
KIN	Кинетин
LC/MS	Течно хроматографски/Мас спектрален анализ
MRSA	Метицилин устайчив <i>Staphylococcus aureus</i>
NAA	α -Нафтилоцетна киселина
ORAC	Кислород улавящ капацитет
PAK	Серин/треонин-протеин киназа
TAT	Twin-arginine translocation pathway
TLC	Тънкослойна хроматография
VRE	Ванкомицин устойчиви ентерококи
BETX	Високо ефективна течна хроматография
К-на	Киселина
МБК	Минимална бактерицидна концентрация
МФК	Минимална фунгицидна концентрация
МИК	Минимална инхибираща концентрация
ОК	Олеанолова киселина
СЕ	Сух екстракт
УК	Урсолова киселина
ЯМР	Ядрено магнитен резонанс

ВЪВЕДЕНИЕ

Видовете от род *Salvia* имат широко приложение в традиционната медицина при лечение на треска и спазми; имат заздравяващо действие върху раните и кожата; успокояват възпалителни процеси в устната кухина и гърлото. Основните биологични активности, с които се характеризира този род са антимикробна, антиоксидантна, противовъзпалителна, антитуморна активност, както и много други, в това число и предпазване на черния дроб, нервната и сърдечно-съдовата система. Носители на тези активности са съдържащите се в тях фенолни киселини, флавоноиди, ди- и тритерпени, както и етерични масла.

Понастоящем, голямо внимание се отделя на растителните клетъчни култури като алтернативен източник за получаване на ценни вторични метаболити. Използвайки техните предимства, като култивиране в контролирани и асептични условия, е възможно получаването на метаболити за сравнително кратък период от време и независимо от географските и климатичните условия. Разработени са процеси за култивиране на различни недиференцирани и диференцирани растителни *in vitro* системи, но тяхното промишлено приложение може да се реализира само след повишаване добива на вторични метаболити от селектирани и генетично стабилни клетъчни линии.

В настоящата дисертация са изследвани химичния състав на няколко вида от род *Salvia*, характерни за България, а също така и на техни *in vitro* системи като алтернативни продуценти на биологично активни вещества. Успоредно с фитохимичната характеристика са изследвани и основните биологични активности на етеричните масла и растителните екстракти, получени от изходните растения и съответните им *in vitro* култури.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основна цел на дисертацията е анализ на биологично активните вещества (етерично масло, фенолни съединения и тритерпени) в три вида *Salvia*, характерни за България (*S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*) и техни *in vitro* системи и на тази база дефиниране на възможностите за биотехнологичното им получаване. Поставената цел дефинира и основните задачи на разработваната дисертационна работа:

1. Получаване и фитохимична характеристика на състава на етерични масла и растителни екстракти от видовете *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*.
2. Анализ на биологичната активност на получените етерични масла и растителни екстракти.
3. Получаване на калусни и суспензионни култури. Селекция на високо продуктивни линии.
4. Получаване на трансформирани коренови култури. Селекция на високо продуктивни линии.
5. Култивиране в колби и биореактор на селектираната високо продуктивна линия.
6. Изследване акумулирането на тритерпени и фенолни съединения по време на култивиране в колби и биореактор.
7. Анализ на биологичната активност на екстракти получени от културата по време на култивиране в колби и биореактор.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Получаване на екстракти за установяване биологичната активност на изходните растения – лиофилизирани листа или биомаса от клетъчни суспензии на изследваните растителни видове се екстрахират трикратно с ацетон, етанол и вода.

Получаване на етерични масла - свежи листа (100 g) се подлагат на водна дестилация по методика, описана в Чешката фармакопея.

Екстракция на полифенолни съединения - лиофилизирана биомаса (1 g) се екстрахира трикратно по 20 min със 70 % метанол.

Екстракция на тритерпени - лиофилизирана биомаса (0.3 g) се екстрахира трикратно по 30 min в ултразвукова вана при 45 °C с ацетон.

Екстракция на растителен материал за ГХ/МС анализи - към 50 mg лиофилизирана биомаса се добавят 20 µL вътрешен стандарт нонадеканова киселина (C_{19:0}) в концентрация 1 mg/mL и рибитол, добавя се и 1 mL метанол. След центрофугиране към 500 µL от супернатантата се добавят по 500 µL хлороформ и dH₂O. Двете фази се разделят и изпаряват до сухо.

Анализ на фенолни киселини, флавоноиди, тритерпени и розмаринова киселина – използвана е Waters HPLC система и UV-VIS детектор.

Общи феноли – анализирани са по метода на Folin-Ciocalteu.

Анализ на захари – използвана е Shimadzu HPLC система с рефрактометричен детектор RID-10A.

Газхроматографски/мас спектрални анализи – използван е газхроматограф Agilent Technology Hewlett Packard 7890 A+/MSD 5975, с масдетектор Agilent Technology 6975 inert XL EI/CI MSD, работещ при 70 eV и колона HP-5 MS колона.

Ядреномагнитен резонанс – използван е ЯМР апарат BRUKER AVANCE II, при 600 MHz.

Определяне на антиоксидантна активност – определена е по методите L-ORAC, DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC.

Определяне на антимикробна активност – осъществена е съгласно препоръките на CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute):

Получаване и поддържане на калусни култури – калусни култури са получени върху B5 хранителна среда с използване на комбинации от растежни регулатори: ауксини - 2,4-D и NAA и цитокинини - Kinetin и BAP в концентрации от 0 до 4 mg/L. Калусите са поддържани върху твърда B5 хранителна среда със съответната комбинация от растежни регулатори и 30 g/L захароза. Култивирането е на тъмно при 26 °C с период на препосиване от 21 дни.

Култивиране на клетъчни суспензии в колби и биореактор – клетъчните суспензии се култивират в колби от 1L с 200 mL 20 % (v/v) посевен материал в течна LS хранителна среда с 0.2 mg/L 2,4-D и 30 g/L захароза при 26 °C на тъмно, на клатчка (100 об/мин). Използвана е 3 L биореакторна система с механично разбъркване – 100 об/мин; 30% разтворен кислород; 26 °C на тъмно и 20 % (v/v) посевен материал.

Получаване на трансформирани коренови култури – използвани са щамовете *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 и *Agrobacterium rhizogenes* DSMZ 30200. Прилагани са: метода на директна инфекция; метод на съвместно култивиране; генетична трансформация с използване на двуфазно течено култивиране; генетична трансформация с използване на двуфазно култивиране в системи с временно разбъркване. Генетичната трансформация е доказана чрез PCR амплификация на *rolIA* гена.

Софтуер и статистическа обработка на данните - всички представени данни са обобщени стойности от два независими експеримента, извършвани в трикратна повтораемост. Всички анализи са извършвани трикратно. За статистическия анализ е използвана средна стойност от получените резултати. Статистическият анализ и графичното оформление на получените резултати са извършени със Scientific Graph System SigmaPlot® v.11.0 (Systat Software, Inc., USA), TABLE CURVE™ v.1.10 (Jandel Scientific, USA), Microsoft® Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Идентификация на *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*, и събиране на растителен материал от естествените им находища в България

Растенията са събрани през периода април-юни 2010 г. от експериментално поле на Институт по Биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН, край град София (*Salvia tomentosa*), Таушан Тепе, с. Невша, област Варна, намиращо се на 300 m н.в (*Salvia ringens*) и гр. Бяла, област Русе (*Salvia scabiosifolia*). *S. scabiosifolia* е защитен вид, включен в Червената книга на Българската флора, поради което е събирана с изричното разрешение на Министерството на околната среда и водите (разрешително № 266/05.05.2010) и под контрола на инспектор от РИОСВ Русе. Растителният материал е идентифициран чрез сравнителен анализ със стандартни образци от хербариума на Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания.

2. Получаване и фитохимична характеристика на състава на етерични масла и растителни екстракти от видовете *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*

2.1. Изследване химичния състав на етеричните масла

Добивът на етерично масло е 0.03 % за *S. ringens*, 0.05 % за *S. scabiosifolia* и 0.96 % за *S. tomentosa*. Съставът на етеричните масла е представен в Таблица 1.

Таблица 1. Състав на етеричните масла от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*.

№	Съединение, % TIC	RI	<i>S.</i> <i>tomentosa</i>	<i>S.</i> <i>ringens</i>	<i>S.</i> <i>scabiosifolia</i>
1	Трициклен	922	0.2	0.2	0.3
2	Дехидросабинен	927	0.6	0.5	0.6
3	α -Пинен	936	6.0	3.1	3.0
4	Камфен	943	4.0	1.1	7.0
5	(+)-Сабинен	964	0.3	0.2	1.3
6	β -Пинен	970	9.0	6.0	4.0
7	β -Мирцен	979	1.8	1.2	1.1
8	α -Феландрен	997	0.4	0.8	0.3
9	α -Терпинен	1012	0.2	0.2	0.2

№	Съединение, % ТІС	RI	<i>S. tomentosa</i>	<i>S. ringens</i>	<i>S. scabiosifolia</i>
10	о-Цимен	1018	2.7	3.3	3.4
11	Евкалиптол	1028	3.8	3.1	3.3
12	α-Лимонен	1030	3.5	3.3	3.2
13	β-Транс-оцимен	1034	2.0	4.0	1.8
14	β-Цис-оцимен	1042	1.8	2.5	2.9
15	γ-Терпинен	1047	0.5	2.7	3.5
16	β-Цис-терпинеол	1052	0.2	0.2	0.2
17	Цис-линалил оксид	1069	1.5	1.7	2.0
18	β-Линалол	1081	1.4	1.3	1.1
19	(-)-Туйон	1096	0.3	0.4	0.3
20	Транс-2-ментен-1-ол	1112	Следи	Следи	Следи
21	(-)-Транс-пинокарвеол	1131	0.9	0.3	0.6
22	Камфор	1141	7.9	17.2	19.2
23	Пинокамфон	1151	0.3	0.4	0.3
24	Пинокарвон	1158	0.5	0.4	0.4
25	Борнеол	1170	10.3	7.2	7.8
26	Изопинокамфон	1177	0.7	0.6	0.5
27	(-)-Терпинен-4-ол	1187	0.7	0.5	0.4
28	α-Терпинеол	1199	0.8	0.8	0.2
29	(-)-Миртенол	1212	0.4	0.2	0.3
30	(-)-Вербенон	1221	0.7	0.3	0.3
31	Борнилацетат	1277	1.5	1.1	0.2
32	α-Кубебен	1356	0.6	0.5	0.3
33	Нерилацетат	1366	0.2	0.2	0.2
34	α-Иланген	1392	0.4	0.4	0.3
35	α-Копаен	1397	0.8	0.9	0.3
36	Геранилацетат	1402	0.9	0.3	0.4
37	β-Бурбонен	1408	1.1	1.3	1.6
38	Цис-жасмон	1414	0.2	0.2	0.2
39	2-бутанон, 4-(2,2-диметил-6-метиленциклохексил)	1419	0.5	0.8	0.3
40	β-Кариофилен	1424	3.0	1.5	1.2
41	β-Кубебен	1444	0.9	0.8	0.5
42	α-Кариофилен	1456	2.6	2.3	4.2
43	γ-Муролен	1490	2.6	1.3	1.4
44	Гермакрен D	1495	2.8	3.5	2.6
45	β-Еудесмен	1508	0.3	0.6	0.2
46	α-Муролен	1519	0.6	0.8	0.2
47	γ-Кадинен	1535	1.9	2.1	1.8
48	Δ-Кадинен	1544	2.7	2.0	1.2
49	α-Калакорен	1567	0.3	0.5	0.3
50	Кубенол	1577	0.4	0.6	0.5
51	(-)-Цедреанол	1595	0.5	0.9	0.4
52	Гермакрен D-4-ол	1601	0.9	0.9	0.6

№	Съединение, % TIC	RI	<i>S. tomentosa</i>	<i>S. ringens</i>	<i>S. scabiosifolia</i>
53	(-)-Спатуленол	1607	0.8	1.1	0.9
54	Кариофилен оксид	1622	2.0	1.2	0.9
55	β-Гуаиен	1635	0.4	1.9	0.6
56	Ледол	1643	1.1	0.7	0.9
57	τ-Кадинол	1658	1.5	1.6	2.8
58	δ-Кадинол	1666	0.5	2.1	0.9
59	α-Кадинол	1672	1.7	1.4	1.6
60	(+)-Валеранон	1690	0.9	0.7	0.5

При *S. tomentosa* в най-високи концентрации се съдържа борнеол (10.3 %), докато при *S. ringens* и *S. scabiosifolia* е камфор (17.2 % и 19.2 %). Борнеол при *S. ringens* и *S. scabiosifolia* е на второ място в почти еднакви концентрации (7.2 и 7.8 %). Една характерна разлика е също така, че при *S. tomentosa* α-пинен е във високи концентрации (9.0 %), докато при останалите два вида неговото количество е сходно – около 3.0 %. Останалата част от компонентите като β-пинен, 1,8-цинеол и лимонен са представени в сходни количества.

В заключение, за пръв път е изследван състава на етерично масло от *S. ringens* естествено растяща в България, докато анализите на етеричните масла от *S. tomentosa* и *S. scabiosifolia* не само потвърждават постоянството в състава на етеричните масла на тези растителни видове, но и допълват броя на идентифицираните компоненти.

2.1. Изследване химичния състав на растителни екстракти

2.1.1. ГХ/МС и ЯМР анализи

Началното фитохимично охарактеризиране на нискомолекулните биологично активни вещества е осъществено чрез ГХ/МС анализ на метанолен екстракт на надземните органи на изследваните растения (Таблица 2).

Таблица 2. ГХ/МС анализ на метанолен екстракт от надземни органи на *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*.

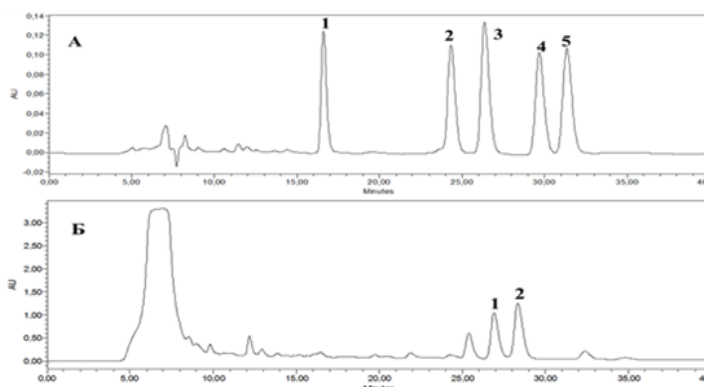
№	Съединение, %	RT, min	RI	<i>S. tomentosa</i>	<i>S. ringens</i>	<i>S. scabiosifolia</i>
Полярна фракция						
1	Валин	6.31	1220	0.15	0.02	0.12
2	Малонова к-на*	6.47	1221	0.12	0.22	2.39
3	Глицерол	6.87	1280	1.69	1.85	0.01
4	Фосфорна к-на	6.90	1280	0.02	0.04	0.05
5	Сукцинова к-на	7.22	1314	0.48	0.59	0.96
6	Глицеринова к-на	7.41	1333	0.05	0.04	0.07
7	Фумарова к-на	7.51	1344	0.18	1.18	1.81
8	Серин	7.70	1364	0.07	0.00	0.02
9	Треонин	7.98	1393	0.07	0.00	0.02
10	Малова к-на	9.06	1493	0.07	0.33	1.10
11	Пролин	10.31	1594	0.00	0.01	0.09
12	Фруктоза	14.02	1833	18.31	31.62	42.77
13	Глюкоза	14.32	1850	0.55	0.63	1.64
14	Маноза	14.66	1869	4.01	10.51	8.97
15	Галактуронова к-на	16.59	1997	0.17	0.20	0.21
16	Палмитинова к-на	18.00	2048	0.03	0.11	0.04
17	Уратна к-на	18.83	2091	14.05	20.28	9.98
18	Кафеена к-на	20.02	2152	19.86	8.45	3.71
19	Стеаринова к-на	21.81	2244	0.02	0.05	0.03
20	Захароза	30.44	2700	20.19	16.29	20.48
21	Розмаринова к-на	43.10	3459	19.93	4.48	1.88
Липофилна фракция						
22	Каприлова к-на	6.75	1265	0.08	0.02	0.14
23	Левцин	6.81	1271	2.57	0.60	11.75
24	Фосфорна к-на	6.91	1281	0.17	0.04	0.73
25	Пеларгонова к-на	7.66	1360	0.20	0.04	0.41
26	Деканоена к-на	8.66	1456	0.06	0.02	0.25
27	Миристилова к-на	14.31	1850	0.12	0.03	0.78
28	Палмитинова к-на	17.99	2048	1.26	0.29	6.78
29	Стеаринова к-на	21.86	2246	0.98	0.19	3.39
30	Сквален	32.55	2833	-	-	1.31
31	Кампестерол	37.61	3181	-	0.35	-
32	β-ситостерол	41.17	3365	-	547	9.05
33	Олеанолова к-на	46.42	3586	30.31	31.05	22.88
34	Урсолова к-на	47.71	3675	40.67	49.30	40.06

№	Съединение, %	RT, min	RI	S. <i>tomentosa</i>	S. <i>ringens</i>	S. <i>scabiosifolia</i>
35	Бетулинова к-на	50.93	3746	-	0.87	-
36	Маслинена к-на	51.96	3819	9.72	4.64	-
37	Коросолева к-на	52.16	3956	12.72	5.86	-

* киселина

2.1.2. Адаптиран HPLC метод за количествено определяне на тритерпени

За целите на настоящата дисертация бе необходимо разработването на подходящ HPLC метод за анализа на тритерпени. Сходството в химичната структура на тритерпените прави тяхното разделяне много трудно. Пълно разделяне от нас е постигнато на C₁₈ колона (5 µm, 25 cm × 4.6 mm), работеща при 26 °C и подвижна фаза метанол : 0.1 % HCOOH = 92 : 8 и скорост на потока от 0.4 mL/min. При тези условия разработеният метод позволява едновременно определяне на ди- и тритерпени от екстракти от различни биологични матрици (Фигура 1).



Фигура 1. Прилагане на подвижна фаза MeOH : 0.1% HCOOH = 92 : 8 за разделянето на: А – терпенови стандарти; Б – екстракт от *S. tomentosa*. (1) – карнозинова киселина; (2) – бетулин; (3) – бетулинова киселина; (4) – олеанолова киселина; (5) – урсолова киселина.

След установяване на метаболитния профил на изходните растения и разработката на подходящ HPLC метод за анализ на тритерпени вниманието е фокусирано върху установяване количественото съдържание на идентифицираните биологично активни вещества. За да се установи разпределението на тези компоненти и подходящия разтворител за тяхната екстракция са направени три вида екстракти с различна полярност – ацетонов, метанолен и воден (Таблица 3).

Резултатите показват, че и в трите растения най-високото съдържание на тритерпени е в ацетоновите екстракти, по-малко в етанолните, а във водните отсъстват. Съдържанието на олеанолова и урсолова киселина е както следва – 4.46 и 8.52 mg/g DW (*S. tomentosa*); 6.27 и 7.21 mg/g DW (*S. ringens*); 1.72 и 3.68 mg/g DW (*S. scabiosifolia*). В *S. tomentosa* и *S. ringens* са доказани и наличие на маслинена и коросолова киселина, само в *S. ringens* присъства бетулинова киселина, докато в *S. scabiosifolia* тези тритерпени отсъстват.

Водният екстракт от трите вида се характеризира с най-високо съдържание на изследваните фенолни киселини. Количеството на розмаринова и кафеена киселина е най-високо в *S. tomentosa* (71.88 и 0.29 mg/g DW), при *S. ringens* (10.23 и 0.44 mg/g DW), а при *S. scabiosifolia* (3.14 и 0.11 mg/g DW).

В заключение на проведените изследвания, както и съпоставката с данните на други изследователски групи, в състава на изследваните от нас видове са доказани наличието на широко разпространените за рода *Salvia* тритерпени – олеанолова и урсолова киселина. Потвърдено е наличието на розмаринова и кафеена киселина в *S. tomentosa*, а за *S. ringens* и *S. scabiosifolia* култивирани в България тяхното присъствие се доказва за пръв път. Освен това са налични макар и в по-малки концентрации още 10 фенолни киселини и осем флавоноида. За пръв път се доказва и наличието на маслинена и коросолова киселина в *S. tomentosa* и *S. ringens*, и бетулинова киселина в *S. ringens*.

Таблица 3. Съдържание на биологично активни вещества в ацетонови, етанолни и водни екстракти на *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*, определени чрез HPLC.

		<i>Salvia tomentosa</i>				<i>Salvia ringens</i>				<i>Salvia scabiosifolia</i>			
	Съединение, mg/g DW	Ацетонов екстракт	Етанолен екстракт	Воден екстракт		Ацетонов екстракт	Етанолен екстракт	Воден екстракт		Ацетонов екстракт	Етанолен екстракт	Воден екстракт	
Тригтерпени													
Олеанов тип	Олеанолова к-на	4.46±0.13	5.80±0.11	0.00±0.00	6.27±0.19	5.79±0.14	0.00±0.00	1.72±0.01	1.94±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00		
Урсанов тип	Урсолова к-на	8.52±0.21	8.91±0.25	0.00±0.00	7.21±0.20	6.87±0.16	0.00±0.00	3.68±0.01	4.46±0.12	0.00±0.00	0.00±0.00		
Фенолни киселини													
Производни на канелената киселина	Розмаринова	9.29±0.25	19.12±0.36	71.88±0.35	0.55±0.01	2.12±0.02	10.23±0.12	0.31±0.01	1.27±0.02	3.14±0.12			
	Кафеена	0.07±0.00	0.13±0.01	0.29±0.02	0.03±0.01	0.01±0.00	0.44±0.02	0.01±0.00	0.00±0.00	0.11±0.01			
	Хлорогенова	0.04±0.01	0.09±0.01	0.26±0.01	0.04±0.01	0.06±0.01	0.52±0.02	0.01±0.00	0.02±0.00	0.13±0.01			
	пара-Кумарова	0.03±0.01	0.08±0.01	0.16±0.01	0.05±0.01	0.20±0.01	2.02±0.02	0.02±0.01	0.01±0.00	0.30±0.01			
	Синапена	0.14±0.01	0.67±0.14	4.22±0.12	0.06±0.01	0.20±0.02	2.71±0.12	0.01±0.00	0.02±0.00	0.55±0.02			
	Ферулова	0.16±0.01	1.46±0.12	5.63±0.15	0.01±0.00	0.12±0.01	0.13±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.22±0.01			
Производни на бензоената киселина	Канелена	0.02±0.00	0.06±0.01	0.16±0.01	0.01±0.00	0.00±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00			
	Галова	0.01±0.00	0.02±0.001	0.07±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00			
	3,4-дихидроксibenзоена	0.01±0.00	0.03±0.01	0.09±0.01	0.00±0.00	0.01±0.00	0.10±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00			
	2-хидроксibenзоена	0.15±0.00	0.33±0.10	1.10±0.11	0.03±0.01	0.02±0.00	0.32±0.01	0.00±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00			
	Ванилинова	0.17±0.00	0.38±0.02	1.27±0.12	0.01±0.00	0.05±0.01	0.28±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.38±0.03			
	Сиринголова	0.04±0.01	0.09±0.01	0.22±0.02	0.01±0.00	0.01±0.00	0.13±0.01	0.00±0.00	0.02±0.00	0.07±0.01			
Флавоноиди													
Флавоноли	Мирцетин	0.05±0.01	0.12±0.01	0.59±0.03	0.02±0.00	0.02±0.01	0.31±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00			
	Камферол	0.03±0.01	0.04±0.01	0.08±0.01	0.05±0.01	0.01±0.00	0.08±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.07±0.01			
	Кверцетин	0.03±0.01	0.05±0.01	0.08±0.01	0.01±0.00	0.02±0.00	0.14±0.01	0.01±0.00	0.00±0.00	0.15±0.01			
Кверцетин гликозиди	Рутин	0.04±0.01	0.07±0.01	0.12±0.01	0.01±0.00	0.02±0.00	0.54±0.03	0.01±0.00	0.01±0.00	0.07±0.01			
	Хиперозид	0.18±0.01	0.70±0.02	1.56±0.02	0.12±0.01	0.98±0.10	0.24±0.05	0.03±0.00	0.28±0.02	0.04±0.01			
Флавои	Хесперидин	0.03±0.01	0.06±0.01	0.63±0.04	0.08±0.01	0.35±0.01	0.14±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00			
	Апигенин	0.01±0.00	0.01±0.00	0.25±0.01	0.1±0.01	0.01±0.00	0.03±0.01	0.04±0.01	0.00±0.00	0.16±0.01			
	Лутеолин	0.3±0.01	0.57±0.11	0.98±0.05	0.16±0.01	0.04±0.01	0.21±0.02	0.01±0.00	0.02±0.00	0.15±0.01			

3. Анализ на биологичната активност на получените етерични масла и растителни екстракти

3.1. Анализ на биологичната активност на етерично масло от *S. tomentosa*

3.1.1. Антимикробна активност

Етеричното масло има средно висока антибактериална и антифунгицидна активност спрямо *Staphylococcus* и *Candida*, но не е активно спрямо *Pseudomonas*. Най-чувствителни към действието на етеричното масло са Грам-положителните *S. epidermidis* и *S. aureus*, докато МБК стойностите спрямо Грам-отрицателните *E. coli* и *S. abony* са два пъти по-високи. Резултатите от това изследване са в съгласие с предишни проучвания, показващи, че етеричното масло от *S. tomentosa* има по-силен антимикробен ефект спрямо Грам-положителните бактерии, отколкото спрямо Грам-отрицателните (Таблица 4).

Таблица 4. Антимикробна активност на етерично масло от *S. tomentosa*

№	Тест микроорганизъм	Произход	МБК, % (w/v)
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Клиничен изолат	0.4
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	0.4
3	<i>Escherichia coli</i>	Хранителен изолат	0.8
4	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	0.8
5	<i>Salmonella abony</i>	Клиничен изолат	0.8
6	<i>Salmonella abony</i>	ATCC 6017	0.8
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хранителен изолат	неактивно*
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9627	неактивно*
9	<i>Candida albicans</i>	Клиничен изолат	0.4
10	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	0.4
* В изследвания концентрационен диапазон от 0.0125 до 1.6 % (w/v) не се установява антимикробна активност			

В заключение, за пръв път в България е изследвана антимикробна активност на етерично масло от *S. tomentosa* спрямо клинични и хранителни изолати. Получените резултати категорично показват, че етеричното масло има потенциал за приложение в широк диапазон от козметични и хранителни продукти, тъй като значителна част от патогенните микроорганизми в храните са устойчиви към традиционно използваните антимикробни добавки.

3.1.1. Антиоксидантна активност

Получените данни показват високи стойности на антиоксидантната активност на етерично масло от *S. tomentosa* растяща в България, оценявана чрез радикал улавящата активност на маслото (1.76 ± 0.36 и 22.09 ± 4.19 mM Тролокс еквиваленти/g масло, по DPPH и ABTS методите, съответно), редуцирането на желязни (1.45 ± 0.21 mM Тролокс еквиваленти/g масло) и медни (26.08 ± 0.21 mM Тролокс еквиваленти/g масло) йони, а също така и неутрализирането на пероксилни радикали (ORAC value of 175.0 ± 0.40 μ M Тролокс еквиваленти/g масло) (Таблица 5).

Таблица 5. Антиоксидантна активност на етерично масло от листа на *S. tomentosa* и някои референтни стандарти.

Проба	DPPH, mM TE/g	ABTS, mM TE/g	FRAP, mM TE/g	CUPRAC, mM TE/g	ORAC, μ M TE/g
Етерично масло	1.76 ± 0.36	22.09 ± 4.19	1.45 ± 0.21	26.08 ± 0.21	175.50 ± 0.40
α -пинен	4.76 ± 0.21	8.06 ± 0.11	6.35 ± 0.05	82.94 ± 0.37	24.8 ± 1.50
β -пинен	4.23 ± 0.32	6.31 ± 0.06	4.48 ± 0.10	35.47 ± 0.55	35.5 ± 2.10
Камфор	4.64 ± 0.26	7.40 ± 0.11	1.12 ± 0.25	44.06 ± 0.55	3.4 ± 0.20
Кариофилен	18.52 ± 0.21	184.18 ± 1.72	59.05 ± 0.35	87.75 ± 0.55	551.8 ± 25.40

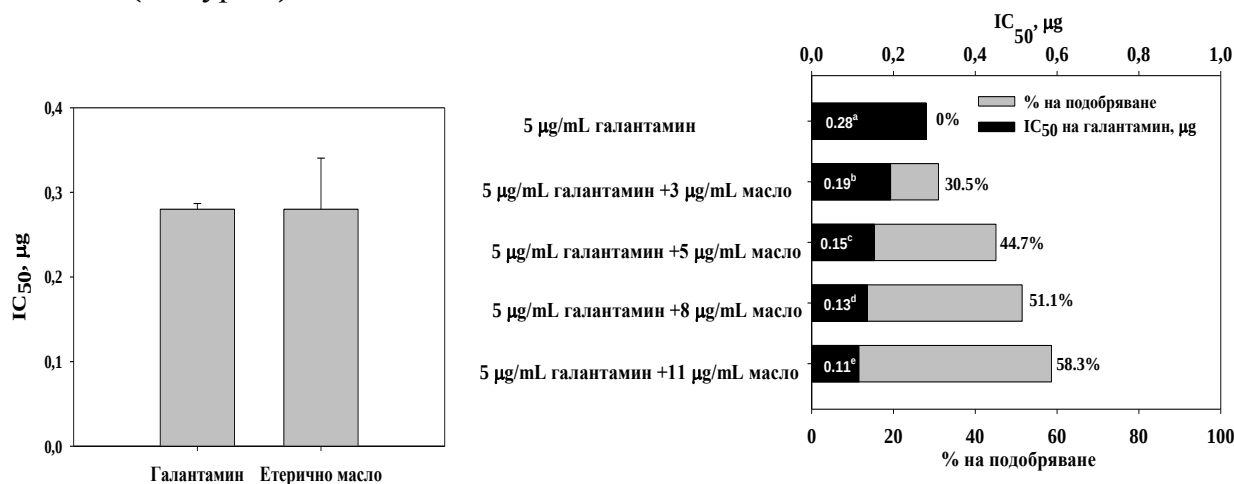
Високите стойности получени по ABTS (протичат при неутрално pH, където основният механизъм е НАТ) и ORAC (където единственият механизъм е НАТ) методите предполагат, че антиоксидантното действие на етеричното масло от *S. tomentosa* се базира основно на преноса на водород (НАТ механизъм).

Антиоксидантната активност на основните компоненти (α - и β -пинен) е значително по-ниска от тази на минорните (кариофилен) (Таблица 5), което предполага, че отчетената антиоксидантна активност на етеричното масло е резултат от синергично взаимодействие между компонентите в него.

3.1.2. Ацетилхолинестераза инхибираща активност

Получената IC₅₀ стойност е напълно сравнима с тази на добре известният инхибитор на ацетилхолинестераза – галантамин (GAL). Статистическите анализи не показват значима разлика ($P < 0.01$) между получените IC₅₀ стойности на изследваното масло (0.28 ± 0.06 μ g) и галантамина (0.28 ± 0.01 μ g) (Фигура 2).

За да се проучи ефекта на етеричното масло от *S. tomentosa* върху ацетилхолинестерза инхибиращата активност на галантамина са използвани различни разтвори съдържащи 5.0 µg/mL галантамин и съответно 3.0, 5.0, 8.0 и 11.0 µg/mL етерично масло. Данните показват, че ефективността на галантамина да инхибира действието на ацетилхолинестеразата се повишава с 51.1% при добавянето на 8.0 µg/mL етерично масло от *S. tomentosa* към реакционната система (Фигура 3).



Фигура 2. Ацетилхолинестераза инхибираща активност на етерично масло от *S. tomentosa*, растяща в България и галантамин.

Фигура 3. Подобряване ефективността на ацетилхолинестераза инхибиращата активност на галантамин от етерично масло на *S. tomentosa*, (IC₅₀ стойности и % на подобряване).

3.2. Изследване биологичната активност на растителни екстракти

3.2.1. Антимикробна активност

Данните показват, че всички изследвани растения имат по-висока антимикробна активност спрямо Грам-положителните, отколкото спрямо Грам-отрицателните микроорганизми. Всеки един екстракт на *S. tomentosa* спрямо Грам-положителните бактерии има минималната бактерицидна концентрация (МБК) от 128 µg/mL, а спрямо Грам-отрицателните МБК е два пъти по-висока (256 µg/mL) без значение дали щам е стандартен или хранителен изолат (Таблицы 6 и 7).

Таблица 6. Антибактериална активност на ацетонови, етанолни и водни екстракти от *S. ringens*, *S. scabiosifolia* и *S. tomentosa*, МБК ($\mu\text{g/mL}$)

Тест микроорганизъм	Източник на изолиране	Растение											
		<i>Salvia ringens</i>			<i>Salvia tomentosa</i>			<i>Salvia scabiosifolia</i>			Воден	Воден	Воден
		Ацетонов	Етанолен	Воден	Ацетонов	Етанолен	Воден	Ацетонов	Етанолен	Воден			
<i>B. cereus</i>	ATCC 1778	-	-	-	128	128	128	-	1024	512			
<i>Br.thermosphacta</i>	Охладено свинско филе	-	-	-	128	128	128	-	1024	512			
<i>S. aureus</i>	Охладена кайма	-	-	-	128	128	128	-	1024	512			
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	-	-	-	128	128	128	-	1024	512			
<i>C.diversus</i>	Клиничен изолат	-	-	-	256	256	256	-	-	1024			
<i>E.coli</i>	Сурова наденица	-	-	-	256	256	256	-	-	1024			
<i>E.coli</i>	ATCC 8739	-	-	-	256	256	256	-	-	1024			
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	-	-	-	256	256	256	-	-	1024			
<i>S.abony</i>	ATCC 6017	-	-	-	256	256	256	-	-	1024			
<i>S.abony</i>	Клиничен изолат	-	-	-	256	256	256	-	-	1024			
<i>S.abony</i>	Охладена кайма	-	-	-	256	256	256	-	-	1024			
<i>P.aeruginosa</i>	ATCC 9627	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>P.aeruginosa</i>	Клиничен изолат	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>P.fluorescens</i>	Охладена кайма	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Таблица 7. Противогъбна активност на ацетонови, етанолни и водни екстракти от *S. ringens*, *S. scabiosifolia* и *S. tomentosa*, МФК ($\mu\text{g/mL}$)

Тест микроорганизъм	Източник на изолиране	Растение											
		<i>Salvia ringens</i>				<i>Salvia tomentosa</i>				<i>Salvia scabiosifolia</i>			
		Ацетонов	Етанолен	Воден		Ацетонов	Етанолен	Воден		Ацетонов	Етанолен	Воден	
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	-	-	-		128	128	128		-	1024	512	
<i>C. albicans</i>	Клиничен изолат	-	-	-		128	128	128		-	1024	512	
<i>C. albicans</i>	Клиничен изолат	-	-	-		128	128	128		-	1024	512	
<i>C. albicans</i>	Клиничен изолат	-	-	-		128	128	128		-	1024	512	
<i>C. krusei</i>	Клиничен изолат	-	-	-		128	128	128		-	-	512	
<i>C. glabrata</i>	Клиничен изолат	-	-	-		128	128	128		-	-	512	
<i>C. parapsilosis</i>	Клиничен изолат	-	-	-		128	128	128		-	-	512	

При *S. scabiosifolia* антимикробната активност се увеличава с увеличаване на полярността на екстракта. Така например ацетоновият екстракт не притежава антимикробна активност, докато етанолният има активност само към Грам-положителните микроорганизми (МБК=1024 µg/mL) и е неактивен спрямо Грам-отрицателните. В същото време водният екстракт има два пъти по-висока активност по отношение на Грам-положителните (МБК=512 µg/mL), докато спрямо Грам-отрицателните *C. diversus* (клиничен изолат), *E. coli* (2 стандартни щам, 1 хранителен и 1 клиничен изолат) и *S. abony* (хранителен, клиничен и стандартен щам) МБК=1024 µg/mL. По-високата антимикробна активност на *S. tomentosa* в сравнение с тази на *S. scabiosifolia* най-вероятно се дължи на по-високото съдържание на фенолни съединения в нея.

3.2.2. Антиоксидантна активност

С най-висока активност, измерена по ORAC метода, са екстрактите на *S. tomentosa* и варира от 3276.30 µМ Тролокс екв/g CE (ацетонов екстракт), 3810.21 µМ Тролокс екв/g CE (етанолен екстракт) до 6780.13 µМ Тролокс екв/g CE при воден екстракт. При *S. ringens* и *S. scabiosifolia* водните екстракти са също с най-висока активност (4478.26 и 4845.82 µМ Тролокс екв/g CE) в сравнение с ацетоновите и етанолните. Активността на всички екстракти е по-висока, отколкото тази на използваните стандарти (ВНТ, розмаринова и аскорбинова киселина) (Таблицы 8 и 9).

С увеличаване полярността на екстрактите се увеличава и антиоксидантната активност като най-високи стойности тя има при водните екстракти на съответните видове: *S. tomentosa* (3303.67 mM Тролокс екв/g CE) > *S. ringens* (3088.11 mM Тролокс екв/g CE) > *S. scabiosifolia* (2672.38 mM Тролокс екв/g CE) измерена по DPPH метода. Водните екстракти от трите вида имат дори по-висока активност от ВНТ (1550.68 mM Тролокс екв/g CE) и сравнима с тази на аскорбиновата киселина (3508.17 mM Тролокс екв/g CE).

Таблица 8. Общи феноли и антиоксидантна активност на ацетоновите, етанолни и водни екстракти от *S. ringens*, *S. scabiosifolia* и *S. tomentosa*, определена по FRAP, CUPRAC и ORAC методите.

Тип екстракт	Анализирана матрица	ORAC	FRAP	CUPRAC	Общи феноли
		µM Тролокс екв/g CE	mM Тролокс екв/g CE	mM Тролокс екв/g CE	mg/g CE
Растение					
Ацетонов	<i>S. tomentosa</i>	3276.30±189.12	1262.44±23.44	3921.13±218.97	116.12±1.10
Етанолен	<i>S. tomentosa</i>	3810.21±247.93	1431.95±20.45	4802.94±272.91	233.39±4.29
Воден	<i>S. tomentosa</i>	6780.13±408.04	3312.72±114.29	9851.15±114.44	444.83±2.44
Ацетонов	<i>S. ringens</i>	328.54±15.64	135.07±2.14	499.24±23.82	42.49±0.10
Етанолен	<i>S. ringens</i>	1758.58±110.21	475.82±4.93	1715.29±91.13	75.84±1.12
Воден	<i>S. ringens</i>	4845.82±342.00	2851.71±95.82	8449.60±114.44	388.64±17.85
Ацетонов	<i>S. scabiosifolia</i>	797.74±36.44	242.16±4.51	967.79±50.24	30.14±0.93
Етанолен	<i>S. scabiosifolia</i>	788.07±58.29	282.82±4.93	1142.99±77.14	48.53±2.63
Воден	<i>S. scabiosifolia</i>	4478.26±277.85	2351.18±49.32	7211.55±16.52	344.50±10.61
Стандарт					
ВНТ		0.72±0.1	912.90±25.63	792.84±78.63	
Розмаринова киселина		21.1±0.82	7196.89±112.36	792.84±85.98	
Аскорбинова киселина		0.93±0.30	4100.48±145.96	3121.82±112.36	

Таблица 9. Антиоксидантна активност на ацетоновите, етанолни и водни екстракти от *S. ringens*, *S. scabiosifolia* и *S. tomentosa*, определена по DPPH и ABTS методите

Тип екстракт	Анализирана матрица	DPPH			ABTS		
		mM Тролокс екв/g CE	IC ₅₀ , mg/g DPPH	Инхибиране, %	mM Тролокс екв/g CE	IC ₅₀ , mg/g ABTS	Инхибиране, %
Растение							
Ацетонов	<i>S. tomentosa</i>	1004.91±24.68	0.42±0.02	47.13±2.46	957.75±2.42	0.26±0.02	38.66±0.13
Етанолен	<i>S. tomentosa</i>	1211.49±19.77	0.34±0.01	58.65±0.79	1042.55±45.72	0.25±0.01	40.71±1.97
Воден	<i>S. tomentosa</i>	3303.67±52.34	0.14±0.01	36.52±0.95	2089.05±10.06	0.12±0.01	41.50±0.07
Ацетонов	<i>S. ringens</i>	307.54±3.14	3.02±0.01	6.63±0.32	71.52±0.89	3.02±0.03	31.04±0.39
Етанолен	<i>S. ringens</i>	601.37±3.27	0.85±0.01	23.65±0.08	293.98±1.21	0.85±0.01	27.04±0.13
Воден	<i>S. ringens</i>	3088.11±56.69	0.15±0.01	33.71±1.43	1834.63±16.97	0.15±0.01	37.41±0.46
Ацетонов	<i>S. scabiosifolia</i>	349.89±11.86	2.32±0.10	8.65±0.48	151.10±10.59	1.78±0.01	56.04±0.26
Етанолен	<i>S. scabiosifolia</i>	436.50±21.14	1.36±0.10	14.78±1.51	172.10±17.37	1.50±0.00	66.50±0.20
Воден	<i>S. scabiosifolia</i>	2672.38±59.41	0.18±0.01	27.87±1.43	1430.33±12.78	0.16±0.48	30.99±0.33
Стандарт							
ВНТ		1550.68±89.36			4460.44±145.78		
Розмаринова киселина		6056.41±256.78			4547.62±145.74		
Аскорбинова киселина		3508.17±112.89			3398.34±114.56		

Анализите показват много близки стойности на антиоксидантната активност измерена по FRAP и ABTS метода. Активността и по двата метода варира в близки граници – 1262.44 (при FRAP) и 957.75 (при ABTS) mM Тролокс екв/g CE при ацетонов екстракт; 1431.95 (при FRAP) и 1042.55 (при ABTS) mM Тролокс екв/g CE при етанолен екстракт; 3312.72 (при FRAP) и 2089.05 (при ABTS) mM Тролокс екв/g CE при воден екстракт.

При CUPRAC метода са отчетени най-високите стойности на антиоксидантна активност по всички използвани методи. Водните екстракти на всичките растения имат по-висока активност, отколкото останалите. Техните стойности са както следва: 9851.15 mM Тролокс екв/g CE (*S. tomentosa*) > 8449.60 mM Тролокс екв/g CE (*S. ringens*) > 7211.55 mM Тролокс екв/g CE (*S. scabiosifolia*). Ацетонов, етанолен и воден екстракт от *S. tomentosa* надвишават неколkokратно активността на ВНТ, розмаринова киселина (между 5 и 12 пъти) и аскорбинова киселина (между 2 и 3 пъти). Етанолните екстракти от *S. scabiosifolia* и *S. ringens* са два пъти по-активни от ВНТ и розмаринова киселина, а съответните им водни екстракти са между 8 и 10 пъти по-активни от ВНТ и розмаринова киселина и между два и три пъти по-активни от аскорбинова киселина.

Количеството на общите феноли е най-високо при водните екстракти на анализирания растения: *S. tomentosa* (444.83 mg/g CE) > *S. ringens* (388.64 mg/g CE) > *S. scabiosifolia* (344.50 mg/g CE). При *S. tomentosa* съдържанието на общи феноли е най-ниско в ацетоновия екстракт (116.12 mg/g CE) < етанолен (233.39 mg/g CE) < воден (444.83 mg/g CE) екстракт. Получените от нас стойности на общи феноли са значително по-високи от тези в предишни изследвания на тези растителни видове, култивирани в България.

Доказана е значима линейна корелация между стойностите на антиоксидантната активност измерена по всеки един метод и съдържанието на общи феноли. Тази зависимост се наблюдава не само между екстрактите на отделните видове, но и между екстрактите от един и същи вид. Получените

зависимости са с високи стойности на корелационните коефициенти – между 0.9169 и 0.9999.

Голямата разлика в стойностите на антиоксидантната активност между изследваните екстракти и стандартите, анализирани по ORAC метода показва, че антиоксидантна активност протича основно по механизма на водороден трансфер и в по-малка степен по трансфер на единичен електрон (данните от FRAP и CUPRAC метода).

В заключение, най-висока антиоксидантна активност показват водните екстракти. И трите типа екстракти от *S. tomentosa* показват по-силно антиоксидантно действие в сравнение с екстрактите от *S. ringens* и *S. scabiosifolia*.

Трите типа екстракти от изследваните растения показват силна антиоксидантна активност, доближаваща се до тази на широко използвания синтетичен антиоксидант ВНТ като в много от случаите дори е по-висока от него. При някои от методите, особено CUPRAC стойностите на антиоксидантния ефект са дори по-високи и от тези на аскорбиновата и розмариновата киселина. Всички екстракти показват много по-високи ORAC стойности, отколкото активността на използваните стандарти, което предполага, че основният механизъм на антиоксидантна активност протича по пътя на водороден трансфер.

3.2.3. Ацетилхолинестераза инхибираща активност

Екстракти от трите изследвани растения притежават висока ацетилхолинестераза инхибираща активност. Най-висока е ацетилхолинестераза инхибиращата активност при водните екстракти: *S. tomentosa* ($IC_{50}=0.15\text{mg}$) > *S. ringens* ($IC_{50}=0.21\text{mg}$) > *S. scabiosifolia* ($IC_{50}=0.28\text{mg}$), а инхибирането на ензима варира между 53.46 и 77.65 %. Получените стойности на инхибиране са по-високи от ацетилхолинестераза инхибиращата активност на много други видове *Salvia* (Таблица 10).

Таблица 10. Ацетилхолинестераза инхибираща активност на ацетонови, етанолни и водни екстракти от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*.

Растение	Екстракт	Инхибиране на ацетилхолинестеразата, %	IC ₅₀ , mg екстракт
<i>S. tomentosa</i>	Ацетонов	30.87±2.19	0.38±0.03
	Етанолен	31.82±2.53	0.35±0.03
	Воден	77.65±0.42	0.15±0.00
<i>S. ringens</i>	Ацетонов	22.65±3.03	0.48±0.06
	Етанолен	19.55±2.87	0.52±0.08
	Воден	57.99±0.42	0.21±0.00
<i>S. scabiosifolia</i>	Ацетонов	37.84±0.93	0.52±0.04
	Етанолен	24.67±2.02	0.47±0.02
	Воден	53.46±1.26	0.28±0.01

С увеличаване полярността на екстрактите се увеличава и активността, което показва, че тя зависи от съдържанието на фенолните вещества. Това е потвърдено чрез извеждане на регресионни уравнения между ацетилхолинестераза инхибиращата активност и общите феноли (R^2 варира между 0.8281 до 0.9871). Един от основните компоненти, розмаринова киселина има по-малко значение за тази активност в сравнение с общото съдържание на феноли. Олеаноловата и урсоловата киселина могат да повлияят тази активност само в ацетоновите и етанолните екстракти, тъй като не се съдържат във водните.

Комплексната антиоксидантна и ацетилхолинестераза инхибираща активност имат положително влияние при лечението на болестта на Алцхаймер. Това може да е от съществено значение, тъй като използваните инхибитори на ацетилхолинестеразата (ривастигмин, донепезил и галантамин) могат да бъдат ефективни само в начални етапи на заболяването, а лечението е придружено с множество нежелани странични ефекти.

Изследванията на биосинтетичния потенциал на *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia* показват, че и трите растителни вида притежават генетичен потенциал за биосинтез на стопанско значими количества тритерпенови киселини и/или кафеена и розмаринова киселини. Състоянието на техните

естествени находища, обаче не позволява използването им в качеството на технологични матрици в бъдещи производства. Ето защо изследванията ни, насочени към получаване и следваща оценка на биосинтетичния потенциал на растителните *in vitro* системи са извършвани успоредно и с трите растителни вида.

4. Получаване на калусни и суспензионни култури. Селекция на високо продуктивни линии

4.1. Получаване на калусни култури

4.1.1. Получаване на калусни култури от *S. tomentosa*

Появата на първите калуси се наблюдава след първата седмица от култивирането върху 52 % от използваните варианти с растежни регулатори. Калусите имат слаб растеж, но след пет седмици от началото на инициация са готови за отделяне от растителните експланتي за самостоятелно култивиране.

Изолирани са общо 63 калусни линии за самостоятелно култивиране от *S. tomentosa*. Комбинацията от растежни регулатори 2.4-D/Kin или BAP води до много слаб калусогенез в резултат, на което са изолирани само две линии. За този растителен вид като цяло е по-успешна комбинацията от NAA/Kin или BAP и в частност NAA/BAP. Хранителните среди с тези растежни регулатори (NAA/BAP) водят до формирането на интензивно растящ калус с въздушна структура.

4.1.2. Получаване на калусни култури от *S. ringens*

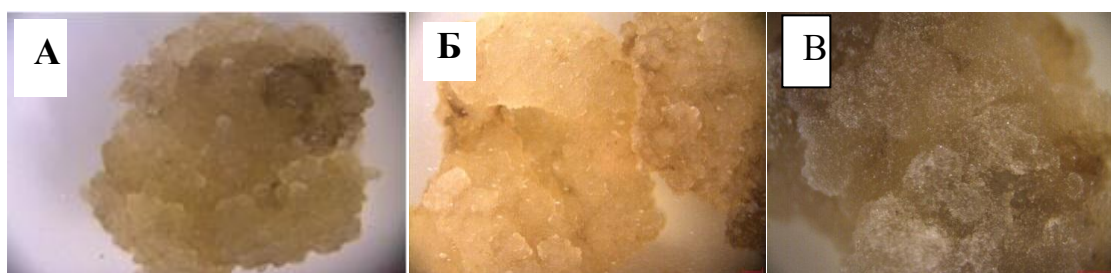
Само 22 % от всички експланتي на *S. ringens* водят до формиране на калус. Калусите имат слаб растеж и са отделени 27 линии за самостоятелно култивиране. Най-подходящите комбинации от растежни регулатори за образуване на калус от този растителен вид са при концентрации 0.2-1.0 mg/L на ауксините 2.4-D и NAA и цитокинина BAP (0.5 mg/L).

4.1.3. Получаване на калусни култури от *S. scabiosifolia*

Експлантите от *S. scabiosifolia* се запазват жизнени при всички използвани варианти растежни регулатори. Много висок процент (73 до 90 %) от използваните варианти водят до образуване на калус от експлантите след

първата седмица от култивирането, независимо от използваните ауксини и цитокинини. Калусите нарастват интензивно и на четвъртата седмица от началото на култивирането са готови за отделяне от експлантите. След пет седмици от иницирането са отделени 88 калусни линии за самостоятелно култивиране. Най-подходящите комбинации от растежни регулатори за образуване на калус от този растителен вид са при концентрации NAA (0.2-4.0 mg/L)/Kin (0.2-2.0 mg/L).

На Фигура 4 е представена характерната морфология на калусите индуцирани от всеки растителен вид.



Фигура 4. Калуси, индуцирани от: А – *S. tomentosa*, Б – *S. ringens*, В – *S. scabiosifolia*

4.2. Получаване на суспензионни култури. Селекция на високо продуктивни линии

4.2.1. Получаване и селекция на суспензионни култури от *S. tomentosa*

След три до четири пасажа на самостоятелно развитие върху твърда хранителна среда голяма част от изолираните калусни линии не показват растеж или калуса потъмнява и загива. Такива калусни линии, които се характеризират със слаб растеж, компактна или гранулирана структура, малки по размер и кафеникав цвят постепенно се отстраняват при селекцията. След третия пасаж на субкултивиране от получените 63 калуса само 17 линии показват потенциал за самостоятелно култивиране.

Селекцията на линиите е резултат от комплексно решение, при което се взима под внимание морфологичната характеристика на калуса (въздушна структура), а също така и количеството на продуцираните тритерпени (Таблица 11).

Таблица 11. Профил на тритерпенови киселини в анализираните калусни линии в зависимост от комбинацията от растежни регулатори.

№ калус	ОК, $\mu\text{g/g}$	УК, $\mu\text{g/g}$	Растежни регулатори					
			NAA, mg/L	Kin, mg/L	NAA, mg/L	BAP, mg/L	2,4-D, mg/L	Kin, mg/L
5	278.29	399.91	2.0	0.0				
6	52.59	766.01	4.0	0.0				
8	106.34	0.00	0.2	0.2				
9	0.00	530.11	0.5	0.2				
10	675.97	472.15	1.0	0.2				
11	39.24	727.64	2.0	0.2				
16	202.15	1277.17	1.0	0.5				
17	84.97	210.68	2.0	0.5				
24	0.00	537.57	4.0	1.0				
29	337.44	405.23	2.0	2.0				
36	34.46	1576.97	4.0	4.0				
38	0.00	2878.88			0.2	0.2		
41	25.20	257.57			2.0	0.2		
42	340.85	515.27			4.0	0.2		
45	991.57	641.85			0.5	0.5		
72	0.00	1033.62					0.2	0.2
74	1744.72	724.50					1.0	0.2

Най-добри резултати при формирането на въздушен калус са постигнати при еквимоларна концентрация на ауксин и цитокинин (0.5 mg/L NAA и 0.5 mg/L BAP). Разпределението на получените калуси по отношение съдържанието на олеанолова и урсолова киселина показва, че само 6 % от тях натрупват повече от 1000 $\mu\text{g/g}$ DW олеанолова киселина, докато по-голямата част (53 %) натрупват олеанолова киселина в границите между 0-100 $\mu\text{g/g}$ DW. Обратно на това, 26 % от калусите продуцират урсолова киселина над 1000 $\mu\text{g/g}$ DW, 42 % натрупват урсолова киселина в границите 501–1000 $\mu\text{g/g}$ DW и само 6 % продуцират този метаболит в ниските концентрации до 100 $\mu\text{g/g}$ DW. Тези резултати ни дават възможност за избор на перспективна калусна линия с високо съдържание на урсолова киселина или общо съдържание на тритерпени.

След проведената комбинирана селекция за инициране на суспензии от тези калусни линии са избрани: 8,10,24,38,41,42, 45 и 72. За получаването на суспензии са изпробвани три варианта течни хранителни среди - B5 с добавка на

0.2 mg/L NAA и LS с добавка на 0.2 mg/L 2.4-D, а също така и B5 с оригиналните комбинации на растежни регулатори. Най-благоприятна среда за инициране на клетъчни суспензионни култури от *S. tomentosa* се оказва течната LS среда с добавка на 0.2 mg/L 2.4-D. При тази хранителна среда всички линии показват интензивен растеж, както по време на дълбочинното култивиране, така и след връщането си върху агаризирана среда. Въпреки интензивния си растеж при пресяване от течна в течна LS среда повечето линии не успяват да формират хомогенна суспензия. Такава е получена чрез последователно пресяване от твърда в течна хранителна среда.

Прилагането на този подход значително подобрява въздушната структура на калуса и води до по-лесната му адаптация към условията на дълбочинно култивиране. Характерно за всички суспензии е формирането на агрегати успоредно е получаването на единични клетки по време на култивирането им в колби.

Получените суспензии от всички селектирани калусни линии са подложени на селекция за избор на продуцент на тритерпени (Таблица 12).

Таблица 12. Растежни характеристики и съдържание на целеви метаболити от анализирани суспензии на *S. tomentosa* при тяхната селекция.

Суспензионна линия	ADB, g/L	GIDW	OK, mg/g DW	YK, mg/g DW	OK, mg/L	YK, mg/L
ST 8	5.60±0.23	2.32±0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
ST 10	8.90±0.56	4.23±0.09	1.17±0.15	0.70±0.02	12.76±0.01	7.62±0.01
ST 24	8.45±0.69	2.49±0.12	0.07±0.00	0.04±0.00	0.88±0.01	0.45±0.01
ST 38	7.72±0.14	2.48±0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
ST 41	9.61±0.34	3.49±0.14	0.12±0.01	0.10±0.01	1.53±0.01	2.27±0.01
ST 42	10.25±0.67	5.03±0.15	0.14±0.01	0.10±0.01	1.78±0.01	1.23±0.01
ST 45	5.31±0.13	2.06±0.11	9.06±0.12	1.61±0.01	71.44±0.47	12.77±0.18
ST 72	4.01±0.11	1.53±0.09	0.17±0.01	0.06±0.01	1.13±0.01	0.38±0.01

Въз основа на растежните характеристики и биосинтеза на тритерпени е селектирана линия ST45, която продуцира 71.44 mg/L олеанолова и 12.77 mg/L урсолова киселина.

4.2.2. Получаване и селекция на суспензионни култури от *S. ringens*

След отделяне на образуваните калуси от растителните експланти за самостоятелно култивиране, голяма част от тях имат много бавен растеж, потъмняват и загиват след третия цикъл на субкултивиране. В резултат на това оцеляват само седем калусни линии (варианти 10, 18, 59, 69, 78, 97, 109) и от всички тях са получени клетъчни суспензии. След 10 дни на култивиране са определени растежните характеристики (акумулирана суха биомаса и растежен индекс), както и натрупаните количества урсолова и олеанолова киселини (Таблица 13).

Таблица 13. Растежни характеристики и съдържание на целеви метаболити от анализираниите суспензии на *S. ringens* при тяхната селекция.

Суспензионна линия	ADB, g/L	GIDW	OK, mg/g DW	YK, mg/g DW	OK, mg/L	YK, mg/L
SR10	6.32 ±0.53	1.76±0.15	0.64 ±0.06	0.30±0.01	6.33±0.37	2.96±0.06
SR18	12.79 ±0.25	3.04 ±0.06	0.03±0.00	0.10±0.01	0.35±0.03	1.78±0.22
SR59	6.61 ±0.29	5.20 ±0.23	0.17 ±0.01	0.25±0.01	1.30±0.06	1.87±0.12
SR69	6.40±1.29	1.50 ±0.30	0.13±0.01	0.26±0.00	2.13±0.50	4.12±0.66
SR78	5.18±0.51	1.48 ±0.14	0.04±0.01	0.09±0.01	0.38±0.01	0.75±0.15
SR97	4.65±0.26	2.47 ±0.14	0.04±0.01	0.08±0.02	0.29±0.06	0.62±0.13
SR109	8.68±0.16	2.36 ±0.04	0.19±0.03	0.56±0.02	2.29±0.29	6.96±0.37

Селектирана е линия SR109, която има най-добри растежни характеристики и общото количество на тритерпени е най-високо – 2.29 mg/L олеанолова киселина и 6.96 mg/L урсолова киселина.

4.2.3. Получаване и селекция на суспензионни култури от *S. scabiosifolia*

След изолирането на 28 добре растящи калусни линии е направена комплексна селекция на тези линии включваща анализ на тяхната морфология чрез микроскопско наблюдение и анализ за съдържание на тритерпени (Таблица 14).

Таблица 14. Растежни характеристики и съдържание на тритерпенови киселини от анализираниите суспензии на *S. scabiosifolia* при тяхната селекция.

№ калус	ОК, $\mu\text{g/g}$	УК, $\mu\text{g/g}$	Растежни регулатори							
			NAA, mg/L	Kinetin mg/L	NAA, mg/L	BAP, mg/L	2,4-D, mg/L	KIN, mg/L	2,4-D, mg/L	BAP, mg/L
5	1351.42	656.56	2.00	0.00						
6	253.15	458.21	4.00	0.00						
8	275.92	488.27	0.20	0.20						
10	332.02	391.43	1.00	0.20						
15	180.99	395.48	0.50	0.50						
18	1679.93	869.71	4.00	0.50						
21	1854.46	1547.66	0.50	1.00						
23	140.68	374.18	2.00	1.00						
24	800.28	873.29	4.00	1.00						
29	946.99	1058.91	2.00	2.00						
30	218.67	463.20	4.00	2.00						
36	595.46	711.70	4.00	4.00						
39	184.91	437.27			0.50	0.20				
41	1079.68	897.83			2.00	0.20				
42	451.54	493.68			4.00	0.20				
45	157.27	324.41			0.50	0.50				
47	477.80	353.94			2.00	0.50				
48	213.87	394.52			4.00	0.50				
52	321.46	584.25			1.00	1.00				
53	258.25	474.48			2.00	1.00				
54	858.29	686.83			4.00	1.00				
59	931.47	623.27			2.00	2.00				
60	310.24	545.82			4.00	2.00				
66	503.31	469.28			4.00	4.00				
68	1449.59	1089.95					0.50	0.00		
97	1152.99	613.83							0.20	0.20
99	2049.69	896.88							1.00	0.20
104	340.20	503.54							1.00	0.50
109	1621.48	1080.40							1.00	1.00

Голям процент (29.0 %) от получените калуси натрупват повече от 1000 $\mu\text{g/g}$ DW олеанолова киселина и също толкова калусни линии синтезират между 101-300 $\mu\text{g/g}$ DW. От друга страна 43.0 % от линиите синтезират урсолова киселина в границите между 101-300 и 301-500 $\mu\text{g/g}$ DW, и по-малка част (14.0 %) продуцират този метаболит в количества над 1000 $\mu\text{g/g}$ DW. Калусните линии се характеризират с това, че не продуцират тритерпени в ниските концентрации от 0-100 $\mu\text{g/g}$ DW за олеанолова киселина и от 0-300 $\mu\text{g/g}$ DW за урсолова. Тези

результати ни дават възможност за избор на перспективна калусна линия с високо съдържание на урсолова киселина или общо съдържание на тритерпени.

Единадесет линии, показали най-добър биосинтетичен потенциал и най-добра въздушна структура са селектирани за следващо инициране на клетъчни суспензии. Определени са растежните характеристики, както и съдържанието на урсолова и олеанолова киселина (Таблица 15).

Таблица 15. Растежни характеристики и съдържание на целеви метаболити от анализираниите суспензии на *S. scabiosifolia* при тяхната селекция.

Суспензионна линия	ADB, g/L	GIDW	OK, mg/g DW	YK, mg/g DW	OK, mg/L	YK, mg/L
SS5	5.66±0.52	3.61±0.33	1.99±0.30	1.51±0.09	14.44±2.81	10.93±1.04
SS6	5.49±0.31	2.40±0.14	0.30±0.13	0.56±0.02	2.37±1.00	4.35±0.25
SS8	8.01±0.15	4.23±0.08	0.55±0.14	0.59±0.05	5.47±1.26	5.88±0.52
SS21	7.93±0.42	2.89±0.15	2.37±0.45	0.78±0.32	25.20±3.82	12.71±3.00
SS24	4.86±1.26	2.31±0.60	1.09±0.10	0.64±0.31	7.62±1.82	4.71±0.31
SS29	3.66±0.88	1.06±0.26	0.62±0.00	1.40±0.05	4.59±0.58	10.40±0.93
SS54	7.30±0.84	1.86±0.21	1.25±0.12	0.00±0.00	14.10±2.40	0.00±0.00
SS59	10.37±0.30	3.98±0.12	0.75±0.01	0.73±0.09	9.81±0.37	9.44±1.39
SS60	8.28±0.58	3.37±0.23	0.16±0.03	0.13±0.03	1.76±0.24	1.42±0.24
SS68	7.72±0.84	1.90±0.21	1.07±0.09	1.46±0.21	9.30±0.35	10.04±1.73
SS99	8.28±0.53	3.32±0.21	0.44±0.06	0.40±0.05	4.69±0.97	4.31±0.86

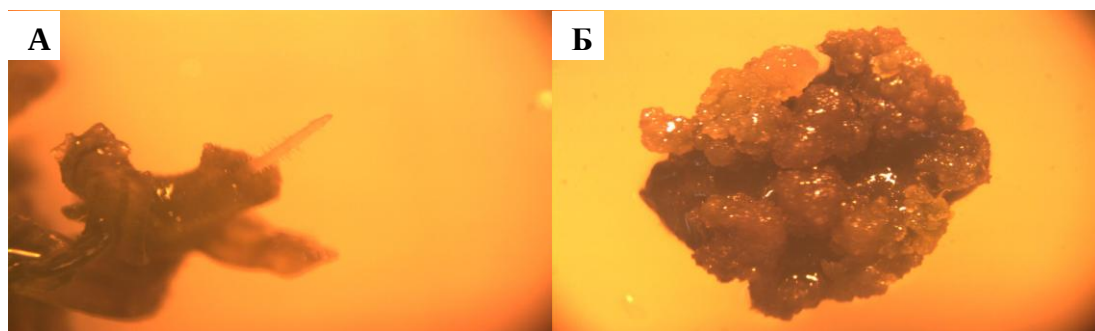
В заключение, на база сравнителната характеристика на селектираните суспензии от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia* за следваща работа е избрана линията ST45 получена от *S. tomentosa*, тъй като тя продуцира в най-големи количества олеанолова и урсолова киселина. Суспензионната линия ST45 въпреки, че има най-ниските растежни характеристики между трите суспензии се отличава с най-високите добиви на тритерпени: олеанолова киселина – 71.44 mg/L и урсолова киселина – 12.77 mg/L.

5. Получаване на трансформирани коренови култури. Селекция на високо продуктивни линии

5.1. Получаване на трансформирани коренови култури

За получаването на трансформирани корени са използвани два щама *Agrobacterium rhizogenes*: ATCC 15834 и DSMZ 30200 в различни концентрации (OD_{600nm} 0.5; 0.75 и 1.0).

Генетичната трансформация е осъществена по метода на директната инфекция. Концентрацията на използваната бактериална суспензия е $OD_{600nm}=1.0$. Четири седмици след прехвърлянето на хранителна среда с антибиотик са получени първите резултати за влиянието на щама върху процеса на индуциране на корени (Фигура 5).



Фигура 5. Растителни експлант от *S. tomentosa*, 14 дни след генетична трансформация с *A. rhizogenes* ATCC 15834 (А); *A. rhizogenes* DSMZ 30200 (Б).

В резултат на проведените от нас предварителни опити е установено, че щамът *A. rhizogenes* ATCC 15834 е по-подходящ за получаване на трансформирани коренови култури. Ето защо следващите експерименти са насочени към оптимизиране концентрацията на бактериалната суспензия.

5.1.1.2. Оптимизиране концентрацията на бактериалната суспензия от щам *A. rhizogenes* ATCC 15834

За постигане на поставената цел са използвани три концентрации на *A. rhizogenes* ATCC 15834 - $OD_{600nm}=0.5$; 0.75 и 1.0. Отново е използван метода на директната инфекция.

Около 10 дни след трансфера на среда с антибиотик се наблюдава формирането на калусоподобни образувания, от които в последствие прорастват трансформираните корени. Микроскопски снимки на тези образувания са показани на фигура 6.



Фигура 6. Микроскопски снимки, показващи началото на коренообразуване при растителни експлант от *S. ringens*. А – при концентрация на бактерията 0.5 при OD_{600 nm}; Б - при концентрация на бактерията 0.75 при OD_{600 nm}; В - при концентрация на бактерията 1.0 при OD_{600 nm}.

Прави впечатление, че най-интензивно коренообразуването е при концентрация на *A. rhizogenes* OD₆₀₀=1.0. След още 10 дни трансформираните корени са значително нараснали (около 10 mm) и се формират множество латерални разклонения.

В процеса на нарастването на корените се наблюдават некроза на растителния експлант; потъмняване на кореновите връхчета; забавяне и спиране растежа на корените, а в последствие и тяхното загиване фигура 7.



Фигура 7. Микроскопски снимки на трансформирани коренови култури върху растителни експлант от *S. ringens*. А – при концентрация на бактерията 0.5 при OD_{600 nm}; Б - при концентрация на бактерията 0.75 при OD_{600 nm}; В - при концентрация на бактерията 1.0 при OD_{600 nm}.

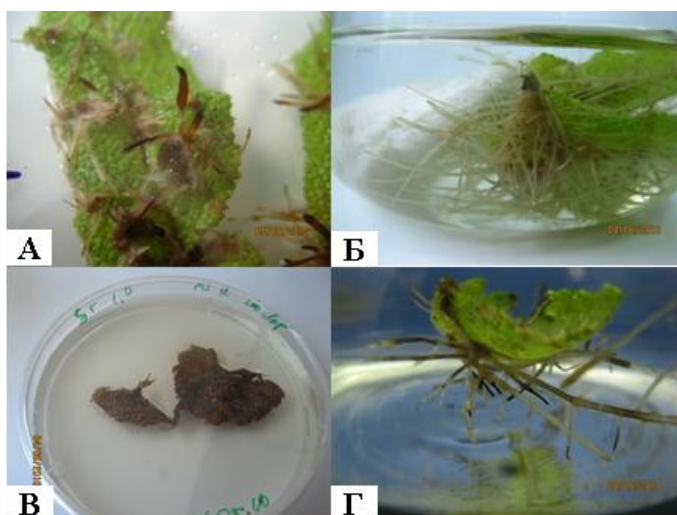
Некрозирането на растителните експлантите не е свързано с концентрацията на бактерията, тъй като се наблюдава и при трите концентрации. Вероятно това се дължи на повишената синтеза на фенолни вещества в областта на третиране на експлантите с бактериите.

В заключение, процеса на получаване на трансформирани коренови култури от *S. ringens* е затруднен, заради повишената продукция на фенолни съединения, което води до некроза както на растителната тъкан, така и на образуваните млади коренови връхчета.

За преодоляването на този проблем се наложи разработването на нов подход, целящ предпазването на новообразуваните коренчета от вредното въздействие на секретирани от растителния експлант цитостатични съединения.

5.1.1.3. Генетична трансформация с използване на двуфазно дълбочинно култивиране в колби

За отстраняване на секретирани от растителната тъкан фитотоксини е използвана адсорбционна смола Amberlite XAD-4, която има свойствата да адсорбира нискомолекулни полярни вещества. Използвани са отново три различни концентрации на бактерията – 0.5; 0.75 и 1.0. За целта след началото на появяване на корени, растителните експлантите от *S. ringens* са култивирани дълбочинно в присъствие на адсорбционната смола. Култивирането е извършено в колби от 300 mL, в 60 mL течна MS хранителна среда в присъствието на Amberlite XAD-4 (1.0 g/100 mL) и 200 mg/L cefotaxim, на тъмно, при 26 °C, на клатчка (100 об/min). При тези условия, трансформирани корени значително увеличават своята дължина като некроза на кореновата тъкан не се наблюдава (Фигура 8 Б). При контролни култивирания в течна MS хранителна среда при същите условия, но без добавяне на Amberlite XAD-4 като втора фаза, не се наблюдава растеж на трансформирани корени (Фигура 8 Г). Когато експлантите с иницираните корени се култивират на твърда среда с времето те некрозират, а трансформирани корени загиват (Фигура 8 В).



Фигура 8. Състояние на растителните експлант и инициирани корени при различните подходи на култивиране. А – експлант в начална фаза на некроза три седмици след провеждането на метода на директна инфекция; Б – състояние на експлант и трансформирани коренови култури иницирани от него две седмици след култивиране в течна MS хранителна среда с

адсорбираща смола Amberlite XAD-4 и 0.2 g/L cefotaxim; В – състояние на експлант, култивиран на твърда MS среда и 0.2 g/L cefotaxim Г - състояние на експлант и трансформирани коренови култури иницирани от него две седмици след култивиране в течна MS хранителна среда с 0.2 g/L cefotaxim и отсъствие на адсорбираща смола amberlite XAD-4.

За да се докаже, че негативният ефект върху образуването на корените се дължи на фенолните съединения са определени количеството на общи феноли, индивидуалното разпределение на фенолни киселини и флавоноиди в пробите с и без Amberlite XAD4.

Анализът на общите феноли, секретирани в културалната течност показва 72 % намаление в концентрацията им при двуфазното култивиране, което вероятно е основната причина за наблюдавания растеж на трансформирани корени.

Разработеният метод на генетична трансформация с използване на двуфазно течно култивиране в колби в присъствие на Amberlite XAD-4 като втора фаза позволи да се получат и изолират 126 линии трансформирани коренови култури от *S. ringens*.

Резултатите ясно показват, че оптималната концентрация на *A. rhizogenes* необходима за провеждането на генетичната трансформация е 0.75 при OD_{600 nm}. При тази концентрация са изолирани най-много на брой коренови линии, въпреки че при OD_{600nm}=1.0 началното коренообразуване е най-интензивно (Таблица 16). При експлантите, където не е добавена смола, броят на изолираните коренови линии е малък.

Таблица 16. Изолирани коренови линии от *S. ringens*

Концентрация на <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Култивиране в течна среда и смола XAD-4	Култивиране в течна среда без смола XAD-4
0.5	30	9
0.75	51	19
1.0	17	0

Получените култури са поддържани при 26 °C, на тъмно, с период на субкултивиране от 21 дни като при всяко субкултивиране се провежда и селекция на линиите, показващи най-стабилни растежни и морфологични характеристики. Трябва да се отбележи, че още при първите 1-2 субкултивирания на корените получени от течна среда, в която е нямало смола се наблюдава подтиснат растеж, отсъстват и характерните латерални разклонения за трансформирани коренови култури.

След проведената селекция на трансформирани коренови култури от *S. ringens*, както на твърда, така и на течна среда са избрани девет добре растящи линии, показващи стабилни растежни и морфологични характеристики. Всички селектирани линии са силно разклонени.

В заключение, разработен е оригинален подход за получаване на трансформирани коренови култури, който съчетава метода на съвместното култивиране и следващо дълбочинно култивиране на инфектираните с *A. rhizogenes* експланти в присъствие на Amberlite XAD-4. Този подход значително улеснява генетичната трансформация на видовете от род *Salvia* при използването на *in vivo* експланти. Използваната смола адсорбира секретирани полифеноли по време на трансформацията като по този начин предпазва растителните експланти живи от некроза. В следствие на това са получени 126 коренови линии от *S. ringens*.

5.1.2. Получаване на трансформирани коренови култури от *S. tomentosa*

Прилагането на методите на директната инфекция и на съвместното култивиране не довеждат до получаване на трансформирани коренови култури от *S. tomentosa*. И при двата метода се наблюдава поява на млади коренчета след 10-ия ден от началото на култивиране на експланта, но успоредно с това се отчита и интензивното им покафеняване, водещо до бърза некроза на растителна тъкан. Некрозата и загиването на експлантите от *S. tomentosa* се случва още по-бързо, отколкото при *S. ringens*, вероятно вследствие на по-високото съдържание на фенолни съединения в този растителен вид.

Тези резултати са основание за прилагане на новоразработения подход, съчетаващ метода на съвместно култивиране и следващо дълбочинно двуфазно култивиране на експланти в присъствието на адсорбционна смола Amberlite XAD-4. За целта след съвместно култивиране експлантите са прехвърлени в течна среда и адсорбционна смола XAD-4. Основен недостатък на метода на генетична трансформация с използване на двуфазно течено култивиране в колби, приложен при *S. tomentosa*, се оказва механичното въздействие на смолата върху получените трансформирани корени. Голяма част от тях се накъсват и начупват преди да са достигнали необходимите размери за самостоятелно развитие.

За преодоляването на този проблем е извършена модификация на двуфазния метод на култивиране. За запазване целостта на експлантите и елиминиране на механичния стрес, след инфектирането на експлантите с *A. rhizogenes* ATCC 15834 те са трансферирани в системи с временно разбъркване RITA.

5.1.2.1. Култивиране в течна среда в системи с временно разбъркване (RITA системи)

При този подход експлантите се подготвят както при съвместното култивиране и след съвместното култивиране се прехвърлят в култивационни системи RITA в присъствието на адсорбираща смола XAD-4 (Фигура 9).

Предимствата на тези системи са не само осигурената фиксация на експлантите, което ги предпазва от механичен стрес, но и в резултат на

временния контакт на хранителната среда с експлантите се намалява силно хиперхидратацията. В резервоара на RITA системите се намира адсорбционната смола, а периодичния контакт на течната среда с експлантите ги снабдява с хранителни вещества от една страна и в същото време се насища и отнема полифенолните вещества от него, които след това се адсорбират от смолата.



Фигура 9. Генетична трансформация на листа *S. tomentosa* с *A. rhizogenes* ATCC 15834 и използване на двуфазно култивиране в системи с временно разбъркване тип RITA и адсорбционна смола Amberlite XAD4: Култивиране в RITA култивационни системи (А); Поява на трансформирани корени (Б); успешно изолирани линии (В).

Прилагането на този иновативен подход доведе до положителни резултати като най-интензивно коренообразуване (при 100 % от експлантите) се регистрира при режим на култивиране с 15 min. разбъркване и 12 h покой, в сравнение с останалите – 4 и 8 часа на покой.

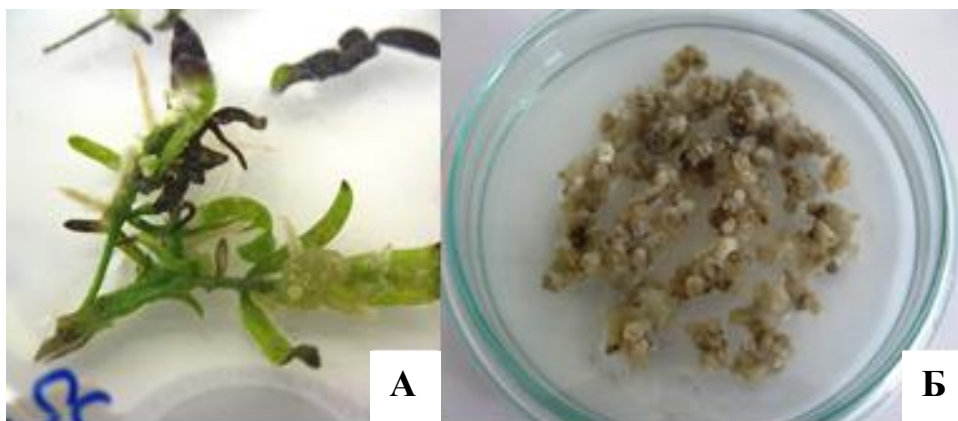
Разработеният метод на генетична трансформация с използване на двуфазно култивиране в системи с временно разбъркване тип RITA и присъствие на Amberlite XAD-4 като втора фаза позволи получаването и изолирането 111 линии трансформирани коренови култури от *S. tomentosa*. След отделяне за самостоятелно култивиране 38 линии показват потенциал за самостоятелно развитие и стабилни морфологични характеристики. Тези линии са обект на следващи анализи и селекция за високопродуктивна линия, продуцираща тритерпени.

В заключение, разработен е нов подход за генетична трансформация с *A. rhizogenes* на растителни тъкани, синтезиращи високи количества вторични метаболити с антимикробно и цитостатично действие. Методът е базиран на технологията на култивиране с временно разбъркване и *in situ* екстракцията на

секретираните в културалната течност полифенолни вещества. В резултат на приложените подходи (култивиране в течна среда и адсорбционна смола в колби и култивиране в течна среда в RITA системи и адсорбционна смола) са изолирани 142 индивидуални линии. От тях в рамките на няколко субкултивирания на твърда и течна среда са селектирани 10 добре растящи линии.

5.1.3. Получаване на трансформирани коренови култури от *S. scabiosifolia*

В сравнение с предните две растения, за получаването на трансформирани корени от *S. scabiosifolia* е достатъчно прилагането на класическия метод на съвместно култивиране. Една седмица след инфектирането на растителните експланти се наблюдава началното коренообразуване като корените нарастват интензивно и след още две седмици са готови за самостоятелно култивиране. Получени и изолирани са над 90 линии като след няколко цикъла на субкултивиране 15 от тях показват способност за самостоятелен растеж. Следва да се отбележи, че заедно с трансформираните корени при този растителен вид се наблюдава и интензивно формиране на ризогенен калус в зоните на инфекция, който има способността да расте на хранителна среда без растежни регулатори (фигура 10).



Фигура 10. Образуване на ризогенен калус от експланти на *S. scabiosifolia* по време на коренова индукция с *A. rhizogenes* ATCC 15834. А – Начално формиране на ризогенен калус върху MS хранителна среда без растежни регулатори; Б – Изолиране на ризогенна калусна линия растяща върху MS хранителна среда без растежни регулатори.

В заключение, за получаването на трансформирани коренови култури от *Salvia* е разработен иновативен подход на двуфазно култивиране в колби и системи с временно разбъркване, използвайки адсорбционна смола Amberlite XAD 4 за отстраняване на фенолните вещества, които възпрепятстват преживяемостта на експлантите и формирането на трансформирани коренови култури. Направената подробна литературна справка показва, че това са първите доклади за получаването на трансформирани коренови култури от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*. Също така за пръв път се докладва и формирането на ризогенен калус от *S. scabiosifolia*.

Осъществяването на стабилна генетична трансформация при получените и изолирани трансформирани коренови линии от трите растения *S. ringens*, *S. scabiosifolia* и *S. tomentosa* е потвърдено с PCR амплификация на *rolA* генът, трансфериран в растителния геном от бактериалния плазмид.

5.2. Селекция на високо продуктивни трансформирани коренови линии

5.2.1. Селекция на високо продуктивни трансформирани коренови линии от *S. tomentosa*

В продължение на няколко субкултивирания на селектираните 10 линии трансформирани коренови култури от *S. tomentosa* само 5 (STXAD1, STXAD2, STXAD3, STXAD6, и STXAD14) от тях показаха стабилни растежни характеристики по време на тяхното препосояване и поддържане. Тези линии са адаптирани към условията на дълбочинно култивиране в 1/2 MS хранителна среда без растежни регулатори.

Наши предварителни анализи показват, че трансформираните коренови култури от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia* не продуцират тритерпени, а само фенолни съединения. За това селекцията на тези кореновите линии е осъществена на база техните растежни характеристики и съдържание на фенолни вещества в тях (Таблица 17).

Таблица 17. Растежни характеристики и съдържание на кафеена и розмаринова киселина на трансформирани коренови култури от *S. tomentosa*, получени при провеждане на селекция върху течна хранителна среда.

Трансформирана коренова линия	ADB, g/L	GIDW	Кафеена киселина, µg/g DW	Розмаринова киселина, µg/g DW	Кафеена киселина, µg/L	Розмаринова киселина, µg/L
STXAD1	1.79±0.32	0.49±0.14	8.90±1.15	8.50±2.90	49.40±6.17	45.80±5.73
STXAD2	3.85±0.06	2.42±0.22	6.20±0.00	190.10±22.36	33.80±4.23	1048.80±117.10
STXAD3	0.90±0.37	0.74±0.17	16.50±7.61	69.90±0.00	31.20±0.51	280.10±4.59
STXAD6	1.59±0.20	0.82±0.05	8.90±1.47	9.90±2.47	44.80±0.73	48.60±0.8
STXAD14	2.44±0.52	0.99±0.45	6.80±0.79	21.90±1.60	50.40±0.83	164.80±2.7

Културите се адаптират бързо към условията на дълбочинно култивиране като в края на процеса запълват значителна част от култивационния обем в колбите. Линия STXAD2 натрупва най-голямо количество биомаса (3.85 g/L при растежен индекс 2.42). Получените резултати показват, че единствено линия STXAD2 продуцира високи количества от фармакологично ценената розмаринова киселина (1.05 mg/L).

В заключение, на база проведената селекция в бъдеще ще се продължи работа с трансформирана коренова линия STXAD2, поради нейните добри растежни характеристики и високо съдържание розмаринова киселина.

5.2.2. Селекция на високо продуктивни трансформирани коренови линии от *S. ringens*

От деветте добре растящи линии, селектирани в началните етапи са запазени пет линии, показващи стабилни растежни и морфологични характеристики в продължение на няколко субкултивирания. Тези пет линии трансформирани коренови култури са адаптирани към условията на дълбочинно култивиране в 1/2 MS хранителна среда.

Селектирана коренова линия от *S. ringens* е линия 83, която натрупва 2.78 g/L суха биомаса и продуцира в най-големи количества розмаринова киселина (17.40 µg/g DW; 133.10 µg/L) (Таблица 18).

Таблица 18. Растежни характеристики и съдържание на фенолни съединения на трансформирани коренови култури от *S. ringens*, получени при провеждане на селекция върху течна хранителна среда.

Трансформирана коренова линия	ADB, g/L	GIDW	Кафеена киселина, $\mu\text{g/g DW}$	Розмаринова киселина, $\mu\text{g/g DW}$	Кафеена киселина, $\mu\text{g/L}$	Розмаринова киселина, $\mu\text{g/L}$
SR83	2.78 $\pm$ 0.83	1.08 $\pm$ 0.21	2.10 $\pm$ 0.00	17.40 $\pm$ 3.84	14.30 $\pm$ 0.11	133.10 $\pm$ 2.18
SR84	4.52 $\pm$ 1.00	1.36 $\pm$ 0.39	5.30 $\pm$ 1.89	18.50 $\pm$ 4.98	35.20 $\pm$ 3.98	96.10 $\pm$ 12.00
SR85	4.27 $\pm$ 0.92	1.51 $\pm$ 0.45	7.10 $\pm$ 2.21	0.90 $\pm$ 0.07	54.00 $\pm$ 6.75	4.60 $\pm$ 1.19
SR90	2.33 $\pm$ 0.57	0.57 $\pm$ 0.24	8.70 $\pm$ 3.66	20.30 $\pm$ 9.32	56.10 $\pm$ 7.00	130.90 $\pm$ 2.05
SR97	3.52 $\pm$ 0.24	0.24 $\pm$ 0.12	3.50 $\pm$ 0.40	9.70 $\pm$ 0.00	20.20 $\pm$ 2.15	30.30 $\pm$ 3.75

В заключение, проведена е селекция на трансформирани коренови култури от *S. tomentosa* и *S. ringens*. Селектирана е по една линия от всеки вид – STXAD2 и SR83 съответно. Установено е, че трансформираните корени не продуцират тритерпени, а само фенолни киселини, които обаче са в ниски концентрации. Работата с трансформираните коренови култури следва да продължи с метаболитно профилиране и оптимизиране на хранителната среда и условията на култивиране за следваща експериментална матрица.

Тъй като основен обект на нашите изследвания са тритерпените, фокусът ни се насочи към използването на клетъчните суспензии. От селектираните три суспензии: линии ST45, SR109 и SS21, най-добър продуцент на олеанолова и урсолова киселина е линията ST45, получена от *S. tomentosa*. Ето защо тя е избрана за осъществяване на следващите стъпки свързани с култивиране в колби и биореактор.

6. Култивиране в колби и биореактор на селектираната високо продуктивна линия

6.1. Изследване химичния състав на екстракти от суспензионна култура на *S. tomentosa* линия 45

Фитохимичната характеристика на нискомолекулните биологично активни вещества е осъществено чрез ГХ/МС анализ на метанолен екстракт от биомасата на култивираната на клатачка суспензия. За тази целта метанолният екстракт е фракциониран на полярна и неполярна фракция (Таблица 19).

Таблица 19. ГХ/МС анализ на метанолен екстракт от биомаса на клетъчна суспензия *S. tomentosa* линия 45.

№	Съединение, % ТІС	RT, min	RI	<i>S. tomentosa</i> линия 45
Полярна фракция				
1	Валин	6.31	1220	0.09
2	Малонова киселина	6.47	1221	0.07
3	Глицерол	6.87	1280	0.28
4	Фосфорна киселина	6.89	1280	0.18
5	Сукцинова киселина	7.22	1314	0.72
6	Глицеринова киселина	7.41	1333	0.20
7	Фумарова киселина	7.51	1344	0.06
8	Серин	7.69	1364	0.08
9	Треонин	7.98	1393	0.04
10	Аланин	8.03	1399	0.14
11	Ябълчна киселина	9.06	1493	1.04
12	Еритриол	9.30	1510	0.03
13	Пироглутаминова киселина	9.56	1532	1.42
14	Пролин	10.31	1594	0.03
15	2-кетоглутарова киселина	10.49	1606	0.18
16	Ксилитол	12.15	1720	0.16
17	Глутамин	13.18	1784	1.02
18	Фруктоза	14.02	1833	32.32
19	Глюкоза	14.32	1850	2.36
20	Маноза	14.66	1869	12.73
21	Галактуронова киселина	16.59	1997	0.01
22	Палмитинова киселина	18.00	2048	0.21
23	Уратна киселина	18.83	2091	1.23
24	Кафеена киселина	20.02	2152	2.19
25	Стеаринова киселина	21.81	2244	0.29
26	Аденозин	29.74	2667	0.05
27	Захароза	30.44	2700	34.20
28	Трехалоза	31.72	2784	0.38
29	Розмаринова киселина	43.10	3459	8.28
Липофилна фракция				
30	Каприлова киселина	6.75	1265	0.05
31	Левцин	6.81	1271	0.91
32	Фосфорна киселина	6.91	1281	0.83
33	Пеларгонова киселина	7.66	1360	0.06
34	Деканоена киселина	8.66	1456	0.03
35	Миристилова киселина	14.31	1850	0.28
36	Палмитинова киселина	17.99	2048	2.86
37	Стеаринова киселина	21.86	2246	4.85
38	Сквален	32.55	2833	0.23
39	Кампектерол	37.61	3181	0.46
40	бета-ситостерол	41.17	3365	24.55
41	Олеанолова киселина	46.42	3586	8.45

№	Съединение, % TIC	RT, min	RI	<i>S. tomentosa</i> линия 45
42	Урсолова киселина	47.71	3675	14.17
43	Маслинена киселина	51.96	3819	16.91
44	Коросолова киселина	52.16	3956	25.36

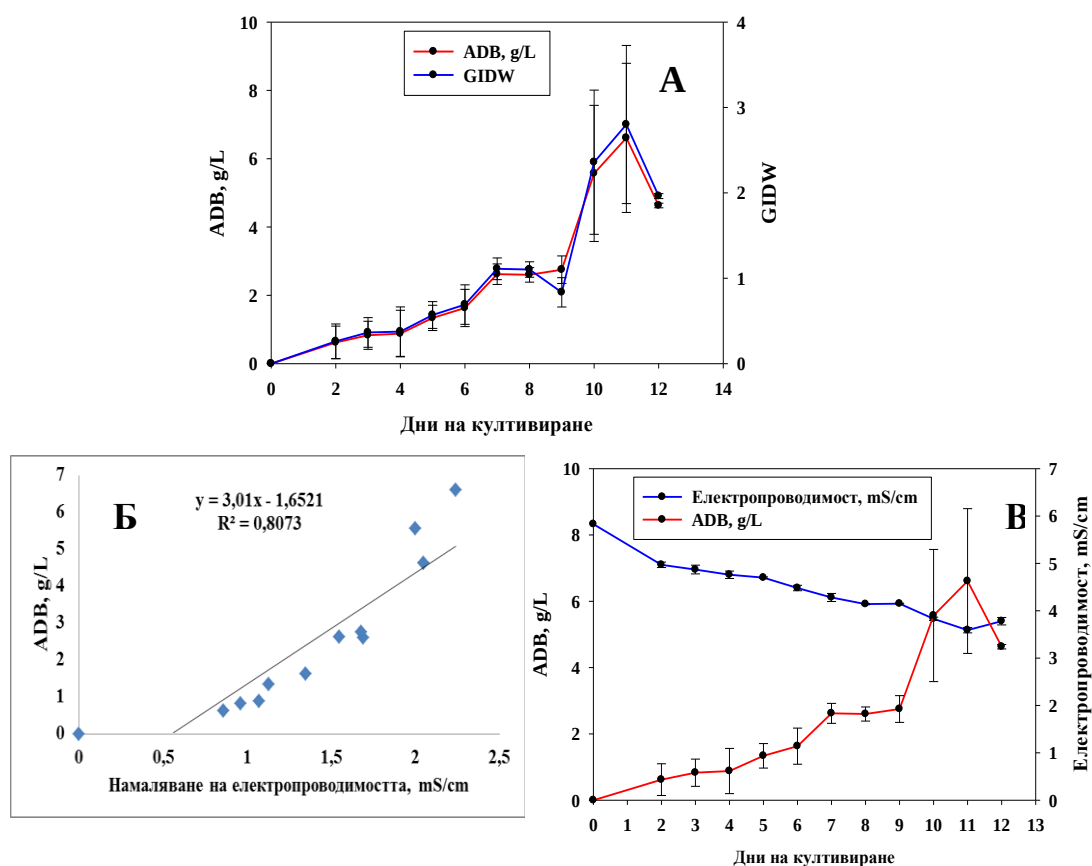
Проведените изследвания показват наличието на 44 компонента, анализирани посредством ГХ/МС техники. Двадесет и девет от компонентите са в полярната фракция като от тях с важна биологична активност са кафеена и розмаринова киселина. В неполярната фракция са идентифицирани 15 съединения, от които с високо съдържание са олеанолова, урсолова, маслинена и коросолова киселина.

В заключение, това са първите данни за метаболитния профил на суспензионна култура от *S. tomentosa*. Подобно на изходното растение, суспензията също продуцира олеанолова, урсолова, маслинена и коросолова киселина.

6.2. Определяне развитието на клетъчна суспензия от *S. tomentosa* линия 45 в колби и биореактор с механично разбъркване

Максимумът на натрупване на биомаса е отчетен на 11 ден от култивирането на суспензията, като натрупаната суха биомаса (ADB) е 6.61 g/L, а растежният индекс по сухо тегло (GIDW) е 2.80. В рамките на тези 11 дни биомасата е увеличена 2.28 пъти по влажна биомаса и 3.80 пъти по суха биомаса (Фигура 11 А).

Линейната зависимост, която е установена между намаляването на електропроводимостта и увеличаването на биомасата е показана на Фигура 11 Б. Тази зависимост се характеризира с корелационен коефициент $R^2=0.8073$, позволяващ да бъде използвана за проследяване растежа на културата. Началната стойност на електропроводимостта е 5.83 mS/cm, която по време на лаг-фазата на културата има слабо изменение (Фигура 11 В), а минималната отчетена стойност (3.59 mS/cm) е в деня на максимално натрупване на биомаса.

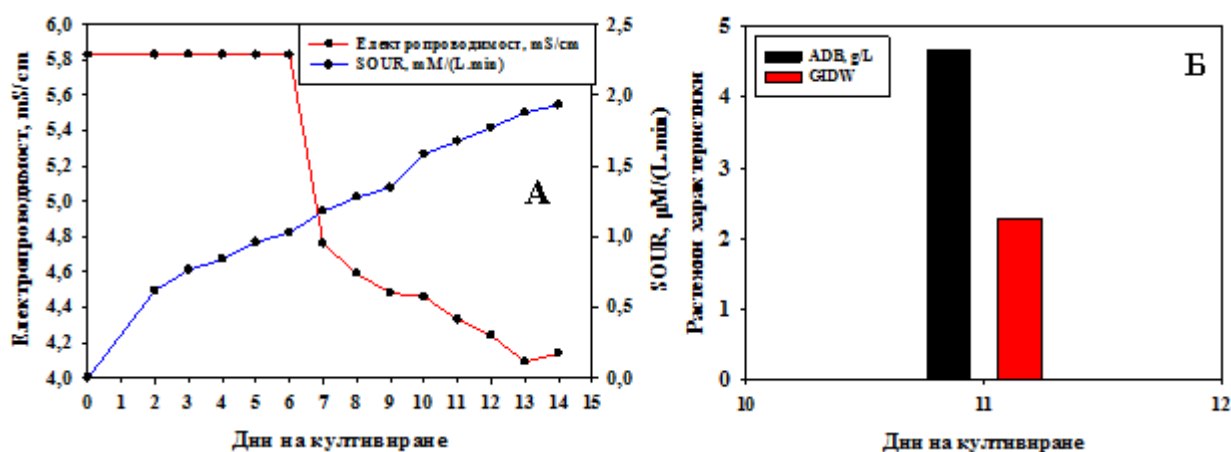


Фигура 11. Динамика на развитие на суспензионна линия ST45 в колби. А – определяне на акумулирана суха биомаса (ADB) и растежен индекс по сухо тегло (GIDW); Б – корелация между намаляване на електропроводимостта и натрупаната биомаса; В – изменение на електропроводимостта и акумулираната биомаса.

Формирането на агрегати с големи размери не е желан процес по време на култивирането на клетъчни суспензии. Контролът върху размера на частиците все още не е изяснен, но се счита, че клетъчният контакт при формираните агрегати повлиява отрицателно биосинтетичния потенциал на суспензията. Най-вероятна причина за това са лимитираният масообмен във вътрешността на агрегатите. Заедно с това агрегатите създават хетерогенност в култивационните обеми, което води до различни реологични условия, а и не на последно място запушват щуцерите на биореакторите и възпрепятстват взимането на проби. По тази причина по време на биореакторното култивиране на ST45 ежедневното взимане на средна проба за оценка на клетъчния растеж е възпрепятствано. Ето защо за определяне растежа на културата е използван друг параметър –

специфична степен на усвояване на кислород [specific oxygen uptake rate (SOUR)].

Използвайки данните от този показател при култивирането в биореактор на суспензионна линия ST45, а също така и чрез измерване електропроводимостта на културалната течност (Фигура 12 А) е определено, че максималното количество на акумулирана суха биомаса ($ADB=4.68 \text{ g/L}$) и растежен индекс ($GIDW=2.29$) е също на 11-я ден Фигура 12 Б.



Фигура 12. Динамика на развитие на суспензионна линия ST45 в биореактор с механично разбъркване. А – изменение на електропроводимостта и специфична потребност от кислород (SOUR); Б – определяне на акумулирана суха биомаса (ADB) и растежен индекс по сухо тегло (GIDW) в края на процеса на култивиране.

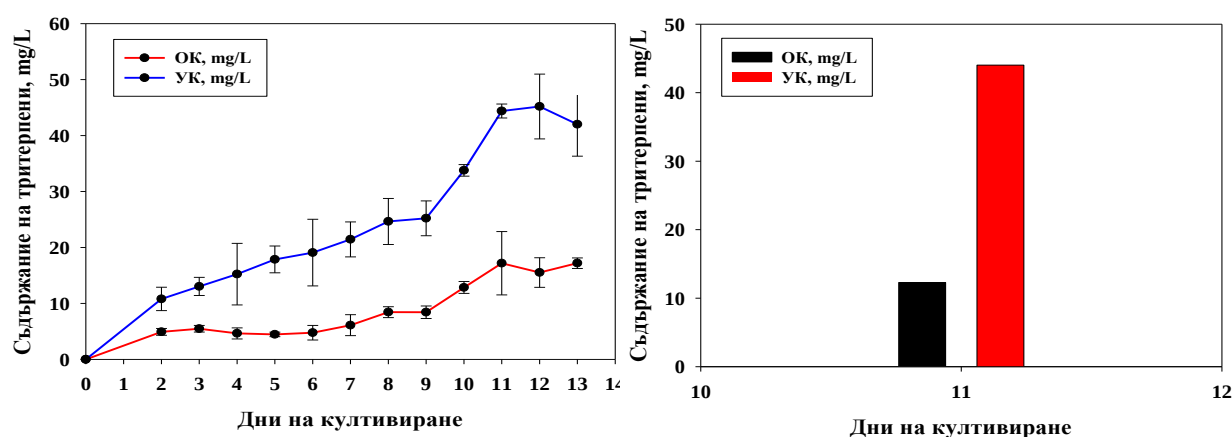
В заключение, установен е максимумът на акумулиране на биомаса от клетъчна суспензия на *S. tomentosa* в колби и биореактор. Изведена е корелационна зависимост между натрупването на биомаса и намалението на специфичната електропроводимост на културалната среда при култивиране в колби. Поради спецификата на растеж на културата при култивирането в биореактор определянето на максимума на растеж на културата е осъществено на база специфичната електропроводимост на средата и специфичната степен на усвояване на кислород от културата. Получените данни от този параметър са от важно значение, тъй като информацията за потребността от кислород на културата могат да послужат за бъдещо оптимизиране условията на културата в

този тип конструкция биореактори, решавайки проблема със снабдяването на културата с кислород.

7. Изследване акумулирането на тритерпени и фенолни съединения по време на култивиране в колби и биореактор

7.1. Изследване акумулирането на тритерпени

По време на лаг-фазата (до 4-и ден) се осъществява слаб биосинтез на олеанолова (4.64 ± 0.99 mg/L) и урсолова (15.23 ± 0.50 mg/L) киселина (Фигура 13 А). По време на експоненциалната фаза тези добиви се запазват сравнително постоянни с леко повишаване количеството на двете киселини като максимумите на техният биосинтез са отчетени на 11-ия ден от култивирането на суспензията: съдържание на олеанолова – 17.18 ± 1.56 mg/L и урсолова киселина – 44.39 ± 1.25 mg/L (Фигура 13 А). Това показва, че добивът на тези метаболити е свързан с развитието на културата. При култивирането в биореактор количеството на олеаноловата (12.29 mg/L) и урсоловата (44.02 mg/L) киселина е сходно с добивите на тези метаболити по време на култивирането в колби (Фигура 13 Б). Следователно конструкцията на използвания биореактор е подходяща за култивиране на клетъчна суспензия от *S. tomentosa*, а постигнатите резултати са добра основа за оптимизиране условията на биореакторно култивиране.



Фигура 13. Определяне съдържанието на олеанолова (OA) и урсолова (UA) киселина по време на: А – култивиране в колби; Б – култивиране в биореактор с механично разбъркване.

Докладваните добиви на тритерпени са пет до шест пъти по-високи от тези в научната литературата по отношение на клетъчна суспензия от *Salvia*.

Изследвано е съдържанието на вторичните метаболити, както и техните биологични активности в екстракти с различна полярност. В Таблица 20 са представени данните за съдържание на фенолни съединения и тритерпени в ацетонов, етанол и воден екстракт от суспензия на линия ST45.

Данните показват, че съдържанието на олеанолова и урсолова киселина в суспензията е сходно при култивирането в колби и биореактор. С увеличаване полярността на разтворителя, намалява количеството на тритерпените, което показва, че ацетонът е най-подходящият разтворител за екстракция на тритерпени. Съдържанието на тритерпените в суспензиите се различава от това в калусите. Докато при калуса съдържанието на олеанолова киселина е 9.06 mg/g DW, а урсоловата 1.61 mg/g DW, то при суспензията са 4.31 и 2.06 mg/g DW, съответно. Намаленото съдържание на тритерпени в суспензията най-вероятно се дължи на механичния стрес по време на култивиране в колби и биореактор.

8. Анализ на биологичната активност на екстракти получени от културата по време на култивиране в колби и биореактор

Изследвана е антиоксидантната, антимикробната и ацетилхолинестераза инхибиращата активност на ацетонов, етанол и воден екстракт от клетъчна суспензия ST45, култивирана в колби и биореактор. Като цяло активността на екстрактите при култивиране в колбите е по-висока, отколкото при култивиране в биореактор. Причина за това е по-високото съдържание на биологично активни вещества. С увеличаване на полярността на екстрактите се увеличава и тяхната активност, което зависи от съдържанието на фенолни съединения. Тези корелации са потвърдени, чрез извеждането на регресионни уравнения и съответните коефициенти на корелация.

Таблица 20. Съдържание на биологично активни вещества в екстракти от суспензионна линия ST45.

Тип структура	Съединение, mg/g DW	Екстракти от суспензия <i>Salvia tomentosa</i> 45 култивирана в колби				Екстракти от суспензия <i>Salvia tomentosa</i> 45 култивирана в биореактор			
		Ацетонов	Етанолен	Воден		Ацетонов	Етанолен	Воден	
		Тритерпени							
Олеанов тип	Олеанолова киселина	4.31±0.11	3.83±0.10	0.00±0.00		4.11±0.11	3.47±0.12		0.00±0.00
Урсанов тип	Урсолова киселина	2.06±0.11	2.83±0.21	0.00±0.00		1.98±0.09	2.16±0.08		0.00±0.00
Фенолни киселини									
Производни на канелената киселина	Розмаринова к-на	1.35±0.21	7.44±0.29	12.37±0.39		1.12±0.12	6.97±0.25		11.13±0.27
	Кафеена к-на	0.02±0.00	0.08±0.01	0.08±0.02		0.02±0.00	0.06±0.01		0.06±0.02
	Хлорогенова к-на	0.01±0.01	0.08±0.01	0.13±0.01		0.01±0.01	0.08±0.01		0.13±0.01
	пара-Кумарова к-на	0.01±0.01	0.08±0.01	0.05±0.01		0.01±0.01	0.08±0.01		0.05±0.01
	синапена к-на	0.10±0.01	0.39±0.14	0.28±0.12		0.11±0.01	0.35±0.14		0.21±0.12
	ферулова к-на	0.01±0.01	0.10±0.12	0.07±0.10		0.01±0.01	0.16±0.12		0.08±0.10
Производни на бензоената киселина	канелена к-на	0.04±0.00	0.06±0.01	0.01±0.01		0.01±0.00	0.03±0.01		0.01±0.01
	галова к-на	0.00±0.00	0.24±0.01	1.39±0.01		0.00±0.00	0.19±0.01		1.59±0.01
	3,4-дихидроксibenзоена к-на	0.06±0.00	0.75±0.01	0.89±0.01		0.08±0.00	0.61±0.01		0.73±0.01
	2-хидроксibenзоена к-на	0.10±0.01	0.09±0.01	0.15±0.01		0.08±0.01	0.06±0.01		0.11±0.01
	Ванилинова к-на	0.11±0.00	0.76±0.02	1.31±0.12		0.05±0.00	0.65±0.02		1.17±0.12
	Сиринголова к-на	0.02±0.01	0.09±0.01	0.11±0.02		0.01±0.01	0.04±0.01		0.09±0.02
Флавоноиди									
Флавоноли	Мирцетин	0.03±0.01	0.07±0.01	0.06±0.03		0.05±0.01	0.08±0.01		0.04±0.03
	Каемферол	0.01±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01		0.01±0.00	0.01±0.01		0.01±0.01
	Кверцетин	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00		0.00±0.00	0.00±0.00		0.00±0.00
Кверцетин гликозиди	Рутин	0.07±0.01	1.82±0.01	0.00±0.00		0.05±0.01	1.32±0.01		0.00±0.00
	Хиперозид	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00		0.00±0.00	0.00±0.00		0.00±0.00
Флавои гликозиди	Хесперидин	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00		0.00±0.00	0.00±0.00		0.00±0.00
	Апигенин	0.05±0.00	0.00±0.00	0.05±0.01		0.03±0.00	0.00±0.00		0.03±0.01
Флавои	Лутеолин	0.09±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00		0.06±0.01	0.01±0.01		0.01±0.00

ИЗВОДИ

1. Проведена е фитохимична характеристика на етерични масла и растителни екстракти, получени от идентифицираните *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia* растящи в техните естествени местообитания в България:
 - 1.1. Идентифицирани са по 60 компонента в състава на етеричното масло от всеки растителен вид. Получени са за пръв път данни за състава на маслото от *S. ringens* растяща в България. При *S. scabiosifolia* са идентифицирани за пръв път β -пинен, γ -терпинен, лимонен и α -пинен, които са част от основните компоненти в състава на маслото.
 - 1.2. Мултиметаболитният профил на екстракти от тези растения доказват наличието на характерните за рода *Salvia* олеанолова и урсолова киселина. Идентифицирани са нови за видовете *S. tomentosa* и *S. ringens* съединения маслиненна и коросолова киселина, и бетулинова киселина за *S. ringens*. С най-високо съдържание на олеанолова и урсолова киселина се характеризира *S. tomentosa* (4.46 и 8.52 mg/g DW). Потвърдено е наличието на розмаринова и кафеена киселина в *S. tomentosa*. За *S. ringens* и *S. scabiosifolia*, култивирани в България те са доказани за пръв път. В най-високи концентрации розмариновата киселина е в *S. tomentosa* (71.88 mg/g DW).
2. Анализирана е биологичната активност на получените етерични масла и растителни екстракти:
 - 2.1. За пръв път е изследвана антиоксидантна, антимикробна и ацетилхолинестераза инхибираща активност на етерично масло от *S. tomentosa*. Най-високите стойности са измерени по ORAC (175.50 μ M Тролокс екв./g) и CUPRAC (26.08 mM Тролокс екв./g) метода. Етеричното масло има добра антимикробна активност спрямо редица хранителни и клинични изолати. По-висока чувствителност имат Грам-положителните (0.4 %), отколкото Грам-отрицателните микроорганизми (0.8 %). За пръв път е изследвана

ацетилхолинестераза инхибиращата активност на етеричното масло, която е сравнима с тази на галантамина (0.28 μg). Добавянето на 8 $\mu\text{g/mL}$ етерично масло повишава с 51 % ефективността на галантамина.

2.2. За пръв път е изследвана антиоксидантна, антимикробната и ацетилхолинестераза инхибиращата активност на ацетонови, етанолни и водни екстракти от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*. Най-висока антиоксидантна активност има водните екстракти на *S. tomentosa* измерена по CUPRAC метода: 9851.15 mM Тролокс екв/g CE (*S. tomentosa*). Също така с най-висока ацетилхолинестераза инхибираща активност е водният екстракт на *S. tomentosa* ($\text{IC}_{50}=0.15\text{mg}$). Този вид има и най-висока антимикробна активност (128 $\mu\text{g/mL}$) спрямо редица стандартни щамове, клинични и хранителни изолати.

3. Получени са калусни и суспензионни култури. Проведена е селекция на високо продуктивни линии:

3.1. За пръв път са получени калусни култури от изследваните видове *Salvia*. Установени са оптималните съотношения на ауксини и цитокинини за получаването на калуси от всеки вид. За получаване на калусни култури от *S. tomentosa* подходящи са комбинацията от NAA (0.2-4.0 mg/L)/BAP (0.2-0.5 mg/L); при *S. ringens* – 2,4-D или NAA (0.2-1.0 mg/L) в комбинация с BAP (0.5 mg/L); при *S. scabiosifolia* NAA (0.2-4.0 mg/L)/Kin (0.2-2.0 mg/L). Изведена е зависимост между концентрацията на ауксини/цитокинини и морфологията на получените калуси.

3.2. За пръв път са получени суспензии от селектираните калусни линии. Най-високо продуктивна е суспензията от *S. tomentosa* – линия ST45, която продуцира 71.44 mg/L и 12.77 mg/L олеанолова и урсолова киселина съответно, в резултат на което за следваща работа е селектирана линия ST45, получена от *S. tomentosa*.

4. Получени са трансформирани коренови култури. Проведена е селекция на високо продуктивни линии:
 - 4.1. За пръв път са получени трансформирани коренови култури от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*. Класическите методи на директна инфекция и съвместно култивиране са неуспешни. Получаване и изолиране на трансформирани корени при *S. ringens* е постигната при култивиране на инфектираните експланти в условията на дълбочинно култивиране и адсорбционна смола Amberlite XAD4. За получаване на корени от *S. tomentosa* е използвано култивиране на експлантите в системи с временно разбъркване (RITA).
 - 4.2. За пръв път е получен ризогенен калус в резултат на генетичната трансформация на *S. scabiosifolia* с *A. rhizigenes*.
 - 4.3. Проведена е селекция на получените трансформирани корени от съответните растителни видове. Линията STXAD2 продуцира в най-високи количества розмаринова киселина (1048.81 µg/L) и има най-добър растеж (3.85 g/L ADB).
5. Проведено е култивиране в колби и биореактор на суспензионна линия ST45 получена от *S. tomentosa*. За пръв път са получени данни за метаболитния профил на тази суспензия. Доказани са наличието на олеанолова, урсолова, маслинена и коросолова киселина, а също така розмаринова и кафеена.
6. Максималните добиви по време на култивирането в колби и биореактор на суспензионна линия ST45 са: 17.18 mg/L и 12.29 mg/L олеанолова киселина; 44.39 mg/L и 44.02 mg/L урсолова киселина; 10.93 mg/L и 9.86 mg/L розмаринова киселина.
7. Определена е антимикробна, антиоксидантна и ацетилхолинестераза инхибираща активност на ацетонов, етанол и воден екстракт от суспензията култивирана в колби и биореактор. Доказано е, че активностите зависят от съдържанието на фенолните съединения в тях.

ПРИНОСИ

1. Научни приноси.

- За пръв път е доказан биосинтезът на маслинена и коросолова киселина в *S. tomentosa* и *S. ringens*, и бетулинова киселина в *S. ringens*.
- За пръв път са получени калусни, суспензионни и трансформирани коренови култури от споменатите видове.
- За пръв път е получен ризогенен калус от *S. scabiosifolia*.

2. Методични приноси.

- Разработени са два иновативни подхода за генетична трансформация с *A. rhizogenes* на тъкани от растения – свръхпродуценти на полифеноли на база култивиране в течна среда и адсорбционната смола Amberlite XAD4 при условия на временно разбъркване.
- Адаптиран е метод за разделяне и количествено определяне на ди-, и тритерпени от екстракти на *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia* базиран на високоефективна течна хроматография.

3. Приложни приноси.

- Разработена е експериментална матрица за получаване на недиференцирани *in vitro* системи от *Salvia*.
- За пръв път е изследван биосинтетичния потенциал на клетъчна суспензия от *S. tomentosa* по отношение на олеанолова и урсолова киселина. Получените резултати са основа за развитието на бъдеща технология за получаването им.

ПУБЛИКУВАНИ МАТЕРИАЛИ

СТАТИИ:

1. **Marchev A.**, Haas C., Schulz S., Georgiev V., Steingroewer J., Bley T., Pavlov A. Sage in vitro cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances. **Biotechnology Letters**, 36(2), 211-221, 2014. **IF=1.853**
2. **Marchev A.**, Ivanov I, Georgiev V, Pavlov A. Determination of di-and triterpenes in *Salvia tomentosa* Mill. cell suspension culture by high-performance liquid chromatography. **Scientific works – University of Food Technologies, LIX**, 229-233, 2012.
3. **Marchev A.**, Georgiev V., Nikolova M., Gochev V., Stoyanova A., Pavlov A. Chemical composition of essential oil of *Salvia scabiosifolia* Lam. from Bulgaria. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 15(6): 908-914, 2012. **IF=0.29**
4. Georgiev V., **Marchev A.**, Haas, C., Weber, J., Nikolova, M., Bley, T., Pavlov, A. Production of oleanolic and ursolic acids by callus cultures of *Salvia tomentosa* Mill. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 25(4), 34-38, 2011. **IF=0.760**
5. **Marchev A.**, Georgiev V., Ivanov I., Badjakov I., Pavlov A. Two-phase temporary immersion system for *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation of *Salvia tomentosa* Mill. **Biotechnology Letters**, 33: 1873-1878, 2011. **IF=1.683**

УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ:

Презентации:

1. **Marchev A.**, Georgiev V., Ivanov I., Kostova N., Bankova V., Pavlov A. Antioxidant activity and GC/MS profiles of *Salvia tomentosa* Mill. cell suspension culture. **Trends in Natural Products Research: a Young Scientist**

Meeting of PSE and ÖPhG, University Centre Obergurgl/Tyrol, Austria, 21 – 25 July, 2013.

2. **Marchev A.**, Ivanov I, Georgiev V, Pavlov A. Determination of di- and triterpenes in *Salvia tomentosa* Mill. cell suspension culture by high-performance liquid chromatography. **Food Science, Engineering and Technologies**, Plovdiv, 19-20 October, 2012.
3. **Marchev A.**, Georgiev V, Haas C, Weber J, Nikolova M, Ivanov I, Bley Th, Pavlov A. Phytochemical and Flowcytometrical Investigations of *Salvia ringens* grown in Bulgaria, **Fifth National Pharmaceutical Congress with International Participation**, Hysarya, Bulgaria, 1-3 April, 2011.

Постери:

1. **Marchev A.**, Ivanov I., Kostova N., Dimitrova R., Lazarova I., Trusheva B., Bankova V., Pavlov A. Biosynthesis of triterpenoids and phenolic compounds from *Salvia scabiosifolia* Lam. cell suspension cultivated in flasks and bioreactor. **International Conference on Natural Products Utilization, From Plants to Pharmacy Shelf, ICNPU 2013**, 3-6 November, Bansko, Bulgaria.
2. **Marchev A.**, Georgiev V., Ivanov I., Schulz S., Steingroewer J., Bley Th., Pavlov A. Biosynthesis of oleanolic and ursolic acids by *Salvia tomentosa* Mill. plant cell suspension in shaking flasks and stirred tank bioreactor. **International congress Natural Anticancer Drugs**, June 30 – July 4, 2012, Olomouc, Czech Republic.
3. Georgiev V., **Marchev A.**, Nikolova M., Stoyanova A., Ivanov I., Pavlov A. – Bioactive substances from Bulgarian rare and threatened *Salvia* plants and their *in vitro* culture. **Phytochemical Society of Europe (PSE) International Symposium on “Terpenes- Application, Activity and Analysis”**. – 2010, 26-29 October, Istanbul, Turkey.
4. **Marchev A.**, Georgiev V., Ivanov I., Pavlov A. New approaches for agrobacterium-mediated genetic transformation of plants cells, **Twelfth Congress of the Bulgarian Microbiologists** – 2010, 11-14 October, Yundola, Bulgaria.

НАГРАДИ

1. Най-добър постер на млад учен.

Marchev A., Georgiev V., Ivanov I., Pavlov A. New approaches for agrobacterium-mediated genetic transformation of plants cells, **Twelfth Congress of the Bulgarian Microbiologists** – 2010, 11-14 October, Yundola, Bulgaria.

2. Финансиране за участие в международна конференция.

Marchev A., Georgiev V., Ivanov I., Kostova N., Bankova V., Pavlov A. Antioxidant activity and GC/MS profiles of *Salvia tomentosa* Mill. cell suspension culture. **Trends in Natural Products Research: a Young Scientist Meeting of PSE and ÖPhG**, University Centre Obergurgl/Tyrol, Austria, 21 – 25 July, 2013.

ЦИТАТИ

ОТКРИТИ ЦИТАТИ В ДОСТЪПНАТА ЛИТЕРАТУРА

Marchev A., Georgiev V., Ivanov I., Badjakov I., Pavlov A. Two-phase temporary immersion system for *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation of *Salvia tomentosa* Mill. **Biotechnology Letters**, 33: 1873-1878, 2011.

Цитирана в:

1. R. Mallón, A. M. Vieitez, N. Vidal. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation in *Quercus robur*: selection by use of a temporary immersion system and assessment by quantitative PCR. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 114 (2): 171-185, 2013.

2. Dasha Mihaylova, Mirena Ivanova, Slava Bahchevanska, Albert Krastanov. Chemical composition and antioxidant activity of ultrasound-assisted extract of the endemic plant *Haberlea rhodopensis* Friv. **Journal of Food Science and Technology**, 2013, in press.