KULTURY BIOREAKTOROWE *VERBENA OFFICINALIS* JAKO BOGATE ŹRÓDŁO POZYSKIWANIA CENNYCH SUBSTANCJI LECZNICZYCH



Paweł Kubica[1], Adam Kokotkiewicz[2], Maria Łuczkiewicz[2], Agnieszka Szopa[1], Halina Ekiert[1]

1. *Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum*
2. *Katedra i Zakład Farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny*

Verbena officinalis L. (werbena lekarska) jest rośliną leczniczą o właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych, przeciwdrobnoustrojowych i sekretolitycznych. Za te aktywności odpowiedzialne są związki polifenolowe zawarte w zielu tego gatunku, takie jak m.in. glikozydy fenylopropanoidowe i irydoidy [1].

Celem pracy było porównanie produkcji glikozydów fenylopropanoidowych - werbaskozydu i izowerbaskozydu oraz irydoidów – hastatozydu i werbenaliny w ekstraktach z kultur *in vitro* (kalusowych oraz pędowych) rosnących w bioreaktorach oraz z ziela *V. officinalis* - rośliny rosnącej w warunkach gruntowych. Ocenie poddano ekstrakty z kultur zawiesinowych prowadzonych w dwóch typach bioreaktorów: balonowym (BB) i mieszająco-napowietrzającym (STB) oraz z kultur pędowych prowadzonych w bioreaktorach okresowo zalewowych Rita®. Zawartość metabolitów w ekstraktach metanolowych z ziela oraz z biomasy kultur *in vitro* oznaczono metodą HPLC-DAD [2].

TYP KULTUR:

- Kalusowe w bioreaktorze balonowym i mieszająco-napowietrzającym
- Pędowe w bioreaktorze Rita

POŻYWKA:

- Kultury kalusowe –Murashige i Skoog
- Kultury pędowe – Schenk i Hildebrandt

REGULATORY WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN: BAP; IBA, 2iP, TDZ; NAA, siarczan adeniny

EKSTRAKCJA

- Ekstrakty ze zliofilizowanej biomasy z kultur *in vitro* i wysuszonego ziela rośliny gruntowej
- Rozpuszczalnik: metanol
- Rodzaj ekstrakcji: ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej

ANALIZA HPLC-DAD [2]:

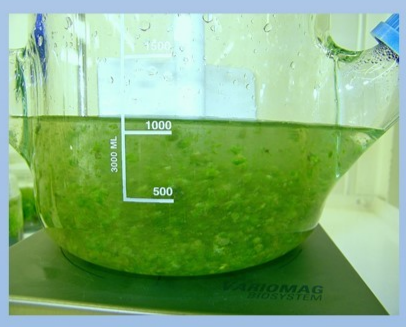
- kolumna: KINETEX™ C18 (150 x 4.6 mm, 2.6 µM)
- układ rozwijający: A - woda + 0.1% kwas trifluorooctowy (1:4 v/v), B – acetonitryl (elucja gradientowa)
- przepływ 1 mL/min
- Detektor DAD, długość fali: λ=330 nm

BADANE ZWIĄZKI:

- Werbaskozyd
- Izowerbaskozyd
- Hastatozyd
- Werbenalina

Tabela 1.
Zawartość oznaczanych związków w ekstraktach metanolowych [mg/100g s.m.]

nw – nie wykryto

	Kultury kalusowe		Kultury pędowe	Ziele rośliny gruntowej
	Bioreaktor balonowy (BB)	Bioreaktor mieszająco-napowietrzający (STB)	Bioreaktor Rita®	
				
Werbaskozyd	7685,0 ± 500,4	9176,9 ± 172,3	4722,2 ± 142,7	1729,0 ± 29,8
Izowerbaskozyd	306,4 ± 25,2	339,9 ± 41,9	266,5 ± 2,3	78,3 ± 3,3
Hastatozyd	nw	nw	173,9 ± 3,7	398,9 ± 9,1
Werbenalina	nw	nw	181,0 ± 17,6	4210,9 ± 106,5

- Ilości akumulowanych w zielu werbeny związków były zależne od czasu zbioru. Średnia zawartość werbaskozydu wynosiła 1729 mg/100g s.m., izowerbaskozydu 78 mg/100g s.m., werbenaliny 4211 mg/100g s.m., a hastatozydu 399 mg/100g s.m. (Tab.1).
- Produkcja obu glikozydów fenylopropanoidowych we wszystkich typach prowadzonych kultur *in vitro* była wyższa niż w zielu rośliny gruntowej (Tab.1).
- W kulturach *in vitro* zawartość werbaskozydu wynosiła od 4722 do 9177 mg/100g s.m., a izowerbaskozydu od 266 do 340 mg/100g s.m. (Tab.1).
- Werbenalina i hastatozyd akumulowane były w kulturach pędowych, odpowiednio w ilości 181 mg/100g s.m. i 174 mg/100g s.m., natomiast w ekstraktach z kultur zawiesinowych nie stwierdzono znaczącej ilości tych irydoidów (Tab.1).
- Ilości werbaskozydu i izowerbaskozydu w ekstraktach z kultur prowadzonych w bioreaktorze STB były odpowiednio 4,05- i 3,27-krotnie wyższe niż ich maksymalna zawartość w zielu.
- Prowadzenie kultur *in vitro* daje możliwość pozyskiwania znacznej ilości wybranych związków bioaktywnych niezależnie od warunków klimatycznych, edaficznych i innych czynników środowiskowych, w tym zanieczyszczeń.

[1] P. Kubica, A. Szopa, J. Dominiak, M. Łuczkiewicz, H. Ekiert, Planta Medica, 86, (2020), 1241-1257

[2] S.A. Schönbichler, L. K.H.Bittner, J.D. Pallua, M. Popp, G. Abel, G.K. Bonn, C.W. Huck, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 84, (2013), 97– 102