

## Биологическая активность экстрактов пчел в зависимости от способа получения

UDC 615.32.451.16 + 638.178

N.YU. ERMAKOVA, N.G. KADNIKOVA, A.D. ROSHAL,  
O.P. SYNCHIKOVA\*, A.V. SHINDER, B.P. SANDOMIRSKY

## Biological Activity of Apian Extracts Depending on the Way of Obtaining

Изучали состав и биологическую активность экстрактов, полученных из пчелиного подмора. Качественный и количественный состав экстрактов определяли спектральным и хроматографическим методами. Антиокислительную активность оценивали хемилуминесцентным методом с использованием эфиров акридинийкарбоновой кислоты. Тест-культурой для определения биологической активности экстрактов служили грибы *Saccharomyces cerevisiae*. Установлено, что в состав экстрактов входят флавоноиды и каротиноиды, обладающие антиоксидантными свойствами. Все изученные экстракты характеризуются биологической активностью, зависящей от способа получения экстракта.

**Ключевые слова:** апиэкстракт, антиоксидантная активность, биологическая активность.

Вивчали склад і біологічну активність екстрактів, які одержали з бджолиного підмору. Якісний і кількісний склад екстрактів визначали спектральним і хроматографічним методами. Антиокислювальну активність оцінювали хемілюмінесцентним методом з використанням ефірів акридинійкарбонової кислоти. Тест-культурою для визначення біологічної активності екстрактів були гриби *Saccharomyces cerevisiae*. Установлено, що до складу екстрактів входять флавоноїди і каротиноїди, які мають антиоксидантні властивості. Усі вивчені екстракти характеризуються біологічною активністю, яка залежить від способу одержання екстракту.

**Ключові слова:** апіекстракт, антиоксидантна активність, біологічна активність.

The composition and biological activity of the extracts derived from dead bees have been studied. Qualitative and quantitative compositions of the extracts were found by spectral and chromatography methods. Antioxidative activity was assessed with chemiluminescent method using ethers of acridine carbon acid. *Saccharomyces cerevisiae* were the test systems to examine biological activity of the extracts. Flavonoids and carotenoids having antioxidant properties were found to be components of the extracts. All studied extracts are characterized with biological activity depending on the way of extract obtaining.

**Key-words:** apiextract, antioxidative activity, biological activity.

На протяжении тысячелетий продукты пчеловодства используются для питания и как лекарственные средства. Мед и пчелиное маточное молочко являются естественным источником углеводов, витаминов и антиокислителей, пчелиный яд и прополис обладают широким спектром фармацевтического действия [4, 7]. Следует отметить, что получение яда сопровождается умерщвлением пчелы. За зимний период жизни пчелиной семьи на дне улья скапливаются особи, погибшие естественной смертью, так называемый подмор [5, 6]. Использование пчелиного подмора как источника биологически активного сырья перспективно: подмор содержит компоненты не только животного, но и растительного происхождения, что обеспечивает как разнообразие химического состава апиэкстрактов, так и их высокую биологическую активность [7].

Within thousand years the apiculture products have been used as the food and medicines. Honey and apian royal jelly are natural sources of carbohydrates, vitamins and antioxidants, bee venom and glue possess versatile pharmaceutical effect [4, 7]. It should be noted that venom obtaining is accompanied with the bee sacrificing. During winter period of bee family life span on the bottom of beehive there are accumulated naturally dead bees [5, 6]. Use of dead bees as the source of biologically active raw material is a perspective one: dead bees comprise the components of not only animal, but also plant origin, that provides both variety of chemical composition of apiextracts and their high biological activity [7].

It is known, that many biologically active compounds render repairing effect on cells after freeze-thawing.

In spite of evident value of dead bees and their extracts as the source of biologically active substances,

Известно, что многие биологически активные соединения оказывают репарирующее действие на клетки после замораживания-оттаивания.

Несмотря на очевидную ценность пчелиного подмора и экстрактов из него как источника важных биологически активных веществ, процедуры подготовки исходного сырья и получения самих экстрактов раньше подробно не изучались. Известно, что каждая из необходимых стадий производства апиэкстракта (промывка, сушка и измельчение подмора, процедуры экстракции и отделения балластных веществ и влаги, концентрирование конечного продукта) влияет на его химический состав и биологическую активность.

Цель работы – разработка способа получения апиэкстрактов, определение их антиоксидантной активности, а также возможности использования для репарации поврежденных клеток после низкотемпературного консервирования.

### Материалы и методы

В работе были исследованы апиэкстракты трех видов, полученные из пчелиного подмора с различной степенью очистки. Экстрагирование производили из измельченного сырья в экстракторе Соклета 96%-м этиловым спиртом. Апиэкстракт 1 получали из неочищенного подмора, получение апиэкстрактов 2 и 3 сопровождалось предварительным промыванием пчелиного подмора проточной водой на протяжении одних (апиэкстракт 2) и трех (апиэкстракт 3) суток с последующим высушиванием при комнатной температуре. Степень экстрагирования контролировали фотометрически. При достижении постоянной величины оптической плотности экстрактов (120-150 циклов экстракции) процедуру экстрагирования прекращали.

После двукратного уменьшения объема апиэкстракта раствор охлаждали в течение суток и фильтрованием отделяли его от балластных веществ (преимущественно восков). Затем фильтрат высушивали на роторном испарителе при пониженном давлении. Степень высушивания контролировали гравиметрически.

Для определения суммы флавоноидов и каротиноидов 25-50 мг сухого апиэкстракта растворяли в 10 мл 96%-го этанола. Для последующих измерений добавлением этанола концентрацию раствора уменьшали в 10 раз. Спектр поглощения полученного раствора измеряли при помощи спектрофотометра Hitachi U3210 (Япония) в интервале длин волн от 300 до 550 нм.

Для выделения из полученного спектра спектров отдельных компонентов – кверцетина (стандарт для определения суммы флавоноидов) и  $\beta$ -каротина (стандарт для анализа суммы каротиноидов)

the procedures to prepare initial raw materials and obtaining of the extracts themselves previously were not studied in details.

It is known that each essential stage of apiextract production: flushing, drying and fragmentation of dead bees, extraction procedures and separation of ballast substances and humidity, concentration of final product affect its chemical composition and biological activity.

Research aim is to develop the obtaining method of apiextracts, examining of their antioxidant activity as well as the possibility to use them to repair cell damages after low temperature preservation.

### Materials and methods

Apiextracts of three types procured from dead bees with different purification rate have been studied in the research. Extraction was performed from fragmented raw material using Soxhlet extractor with 96% ethanol. Apiextract 1 was derived of unpurified dead bees, that for apiextracts 2 and 3 was accompanied with preliminary dead bees flushing with flowing water within 1 (apiextract 2) and 3 (apiextract 3) days with following drying at room temperature. Extraction degree was photometrically controlled. When achieving constant value of optical density for the extracts (120-150 extraction cycles) the extraction procedure was stopped.

After two-fold reduction of the apiextract volume the solution was cooled for 24 hrs and separated from ballast substances (mainly wax) by filtering. Afterwards filtrate was dried with rotor evaporator under lowered pressure. Drying extent was gravimetrically controlled.

To examine the sum of flavonoids and carotenoids dry apiextract weighed portions of 25-50 mg were dissolved in 10 ml 96% ethanol. For following measurements the solution concentration was reduced 10 times by adding ethanol. Absorption spectrum of the obtained solution was measured with Hitachi U3210 spectrophotometer (Japan) within the wave length interval from 300 to 550 nm.

To isolate from the obtained spectrum those for separate components, quercetin, used as the standard to find out the sum of flavonoids and  $\beta$ -carotene, the standard for analysis of carotenoids we used the method of deconvolution. The concentrations of the sums of analyzed compounds in terms of the content of standard substances were calculated according to the equation of Buger-Lambert-Beer law.

Antioxidant activity of the extracts was investigated by chemiluminescent method using ethers of acridine carbone acid [10, 11, 15] as luminescent agents. In this research there was used the system: phenyl ether of N-methyl acridine carbone acid and hydrogen peroxide in the medium of carbonate buffer solution (pH 9.93).

использовали метод деконволюции. По уравнению Ламберта-Бугера-Бэра рассчитывали концентрации сумм анализируемых соединений в пересчете на содержание стандартных веществ.

Антиоксидантную активность экстрактов определяли хемилюминесцентным методом с применением как люминесцирующих агентов эфиров акридинийкарбоновой кислоты [10, 11, 15]. В работе была использована система фениловый эфир N-метилакридинийкарбоновой кислоты и пероксид водорода в среде карбонатного буферного раствора (pH=9,93). К 2 мл раствора, содержащего различные концентрации пчелиного экстракта в карбонатном буфере, добавляли 200 мкл 5%-го водного раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Непосредственно перед измерением в полученные системы вводили 200 мкл раствора люминесцирующего агента.

Скорость гашения хемилюминесценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi F4010 (Япония), работающем в режиме хемилуминометра. Кривую гашения люминесценции логарифмировали, тангенс угла наклона полученной прямой делили на массу исходного апиэкстракта (рассчитанную для каждой аликвоты). Результирующее значение парциальной константы скорости гашения хемилюминесценции K<sub>CL</sub> (показателя антиокислительной активности экстракта) определяли как среднее значений констант, полученных для каждой аликвоты.

Сравнение антиокислительной активности апиэкстрактов проводили с использованием 10%-го раствора аскорбиновой кислоты (Дарница, Киев) и фармацевтического препарата "Аскорутин" (Борщаговская фармацевтическая фабрика, Киев)

Тест-культурой для определения биологической активности апиэкстрактов служили грибы *Saccharomyces cerevisiae*. Микроорганизм выбирали по спиртоустойчивости данной культуры [13] для исключения действия спирта, содержащегося в апиэкстракте, на показатели роста культуры. Грибы предварительно выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 48 ч при 30°C, смывали с поверхности косяка 8%-м раствором сусла и полученную суспензию переносили на жидкую полноценную среду, содержащую пептон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л) и глюкозу (20 г/л).

Для получения культуры в стационарной фазе развития накапливали биомассу на жидких средах в течение 24 ч при 30°C с непрерывным аэрированием. Влияние апиэкстрактов на динамику роста *S. cerevisiae* определяли после накопления биомассы в течение 6 ч с добавлением или без добавления апиэкстрактов.

Клеточную суспензию (1 мл) замораживали (от 25 до -40°C со скоростью 1°C/мин с последующим погружением в жидкий азот) в криоампулах

To the solution volume of 2ml by adding carbonate buffer solution to the obtained mixtures there were added 200 µl of 5% aqueous solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Directly prior to the measurement into obtained systems 200 µl of luminescent agent solution were added.

The measurements of the rate of chemiluminescence quenching was performed with spectrofluorimeter Hitachi F4010 (Japan) functioning in the regimen of chemiluminometer. There was taken a logarithm of luminescence quenching curve, angle tangent of the slope of the obtained line was divided into mass of initial apiextract (calculated for each aliquot). Resulting value of partial constant of chemiluminescence quenching (K<sub>CL</sub>): index of anti-oxidative activity of the extract, it was determined as the mean of values of the constant obtained for each aliquot.

Antioxidative activities of apiextracts were compared using 10% solution of ascorbic acid (Darnitsa, Ukraine) and pharmaceutical agent "Ascorutin" (ascorbic acid and rutin) (Borschagovsky Pharmaceutical Plant, Ukraine).

*Saccharomyces cerevisiae* fungi served as test-culture to examine biological activity of apiextracts. The choice of microorganism was determined by alcohol-resistance of this culture [13] to exclude the alcohol effect, being in apiextract on the indices of culture growth. Fungi were preliminarily grown on slope wort-agar for 48 hrs at 30°C, they were washed-out from the surface of culturing with 8% wort solution and resulted suspension was transferred on liquid complete medium containing peptone (10g/l), yeast extract (5g/l and glucose (20g/l).

To obtain the culture in stationary development phase there was performed an accumulation of biomass on liquid media for 24 hrs at 30°C with constant aeration. The effect of apiextracts on growth dynamics of *S. cerevisiae* was examined after accumulation of biomass for 6 hrs with adding or with no apiextracts.

Cell suspension (1 ml) was frozen in 1.8 ml "Nunc" cryovials with programmable freezer of biological objects ZP-10 (Special Designing and Constructive Unit, IPC&C, Ukraine). Freezing was performed from 25 down to -40°C with 1°C/min rate and following immersion into liquid nitrogen.

Thawing of samples was performed on water bath at 37°C up to disappearance of solid phase. Afterwards to every sample a certain additive was introduced and it was equilibrated for 20 min at 30°C. Either different aliquots of apiextract under concentrations providing maximum biological effect or ethyl alcohol (under final concentrations of 1; 5; 10; 20%) served as additives. The choice of alcohol concentrations was determined by its content in apiextract as a solvent.

Viability parameter for cryopreserved (frozen-thawed) culture was the number of macrocolonies (colony-forming units – CFU), grown on agarized media [2, 3].

“Nunc” объемом 1,8 мл на программном замораживателе биообъектов ЗП-10 (производство СКТБ ИПКиК).

Культуру отогревали на водяной бане при 37°C до исчезновения твердой фазы. Затем в каждую пробу вносили определенную добавку и эквилибировали 20 мин при температуре 30°C. Добавкой являлись различные аликвоты апиэкстракта в концентрациях, обеспечивающих максимальный биологический эффект, либо этиловый спирт (конечная концентрация 1; 5; 10; 20%). Выбор концентраций спирта определялся его содержанием в апиэкстракте как растворителя.

Показателем жизнеспособности криоконсервированной (замороженной-отогретой) культуры являлось количество макроколоний (колониеобразующих единиц – КОЕ), выросших на плотных питательных средах [2, 3].

### Результаты и обсуждение

Одной из важнейших стадий получения апиэкстракта является промывание пчелиного подмора перед высушиванием и измельчением. Интенсивное промывание сырья может приводить к удалению отдельных компонентов подмора и таким образом влиять на химический состав и биологическую активность конечного продукта. На рис. 1 представлены данные по изменению масс полученных апиэкстрактов и выхода балластных компонентов относительно массы исходного сырья – пчелиного подмора.

Как следует из приведенных данных, увеличение продолжительности промывания подмора приводит к уменьшению выхода как экстрагируемых, так и балластных веществ.

В результате промывания исходного сырья в течение суток масса конечного апиэкстракта уменьшается на 18,8%, при увеличении продолжительности промывания пчелиного подмора до трех суток на 25,9%. Удаление балластных веществ в процессе промывания исходного сырья происходит более интенсивно: если для апиэкстракта 1 отношение масс апиэкстракта и балласта составляет 1,6:1, то для апиэкстракта 3 это отношение равно 2,4:1.

Промывание исходного сырья в течение 3-х суток (рис. 2) снижает концентрацию флавоноидов с 50,8 до 3,6 мг/г. В то же время концентрация каротиноидов в апиэкстракте 3 уменьшается с 3,22 до 1,78 мг/г (рис. 3).

Вероятно, различия в концентрациях антиокислителей при изменении режима промывания исходного сырья объясняются тем, что единственным источником флавоноидов в апиэкстракте может являться пыльца растений, в то время как каротиноиды содержатся не только в пыльце, но и

### Results and discussion

One of the most important stages of apiextract obtaining is flushing of dead bees prior to drying and fragmentation. Intensive flushing of raw material may result in the removal of some components of dead bees and thereby affect chemical composition and biological activity of final product. Fig. 1 shows the data on change in masses of obtained apiextracts and ballast component yield in respect of the mass of initial raw material, dead bees.

These data demonstrate that the rise in duration of washing-out of dead bees result in a reduction of the yield of both the substances to be extracted and ballast ones.

As a result of flushing of initial raw material for 24 hrs the mass of final apiextract decreases by 18.8%. An increased duration of washing-out for dead bees up to 3 days leads to extra-loss of 25.9% of final product. Removal of ballast substances during flushing of initial raw material proceeds more intensively if for the apiextract 1 the ratio of masses for apiextract and ballast makes 1.6:1 and for the apiextract 3 it is 2.4:1.

As proceeds from Fig. 2 flushing of initial material for 3 days results in a reduction of the concentration of flavonoids approximately in 14 times: from 50.8 to 3.6 mg/g. At the same time the concentration of carotenoids in the apiextract 3 alters not so significantly, in 1.8 times: from 3.22 to 1.78 mg/g (Fig. 3).

Differences in concentrations of anti-oxidizers during variation of flushing protocol are likely to be explained by the fact that a single source of flavonoids

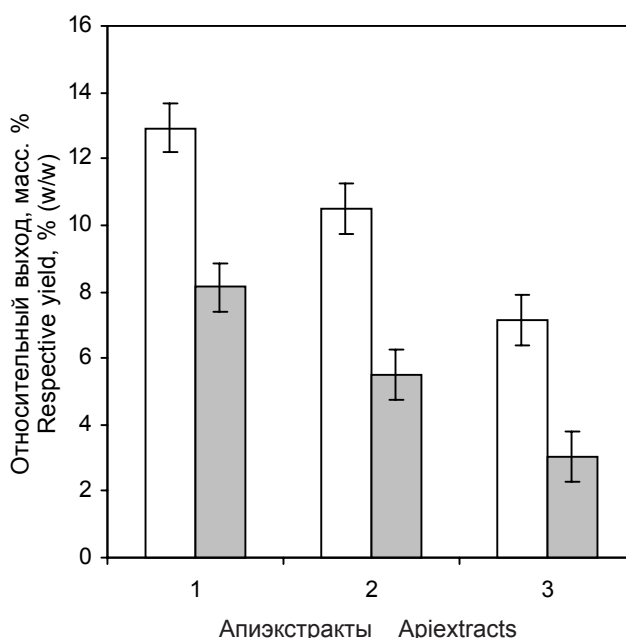
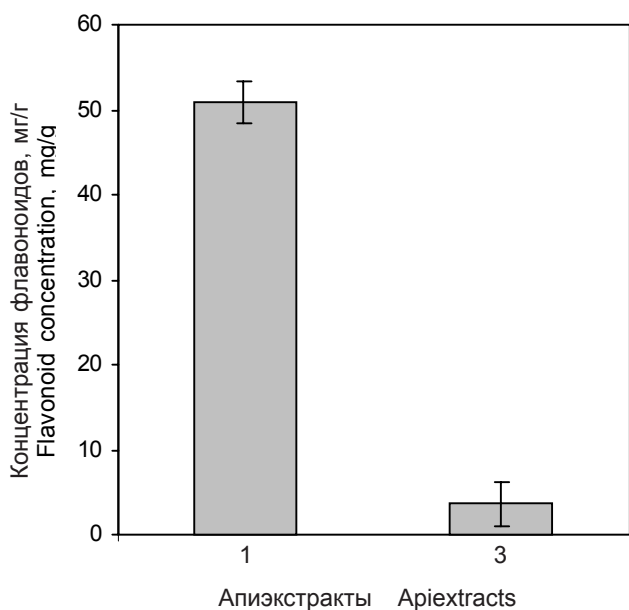


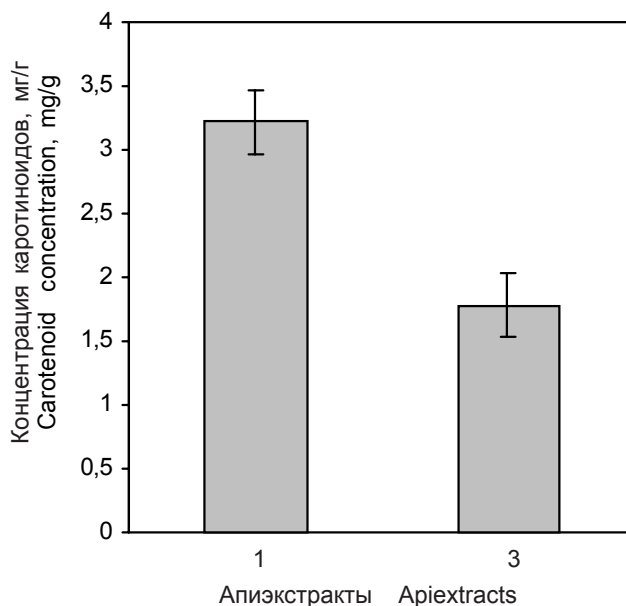
Рис. 1. Зависимость масс апиэкстракта и балластных компонентов от степени промывания исходного сырья: □ – экстракт; ■ – балластные компоненты.

Fig. 1. Dependence of masses of extracts and ballast components on the degree of initial raw materials: □ – extracts; ■ – ballast components.



**Рис. 2.** Концентрация суммы флавоноидов в апиекстрактах 1 и 3.

**Fig. 2.** Concentration of the sum of flavonoids in apiextracts 1 and 3.



**Рис. 3.** Концентрация суммы каротиноидов в апиекстрактах 1 и 3.

**Fig. 3.** Concentration of the sum of carotenoids in apiextracts 1 and 3.

в теле пчел. Таким образом, анализируя динамику изменения концентраций антиоксидантных компонентов и балластных веществ в апиекстрактах, полученных из сырья с различными режимами промывания, можно заключить, что изменение химического состава апиекстрактов в зависимости от длительности процесса промывания объясняется механическим удалением частиц воска и пыльцы.

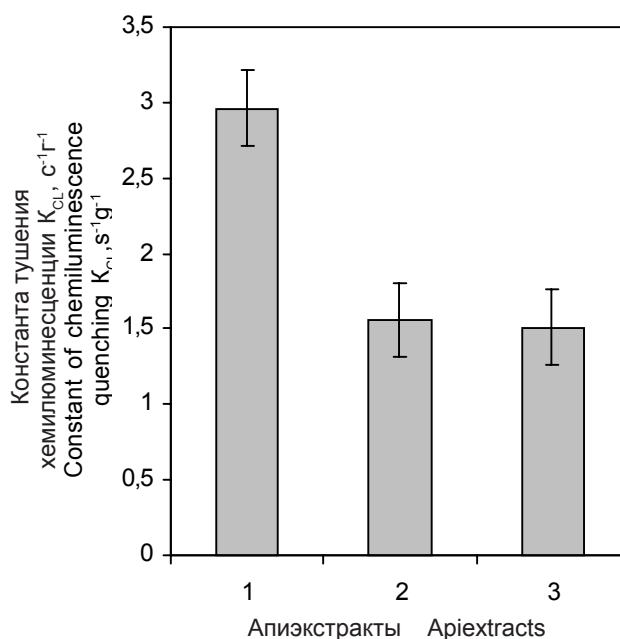
Следует отметить, что флавоноиды и каротиноиды – не единственные антиокислительные компоненты апиекстрактов. Так, антиокислительная активность характерна и для восстанавливающих сахаров, к которым относится глюкоза. Поскольку углеводы хорошо растворимы в воде, их концентрация может значительно уменьшаться в процессе промывания сырья.

В связи с тем, что, согласно полученным данным, концентрации антиоксидантов в процессе подготовки сырья изменяются в широких пределах, большой интерес представляет исследование общей антиокислительной способности экстрактов в зависимости от продолжительности промывания пчелиного подмора.

В качестве показателя антиоксидантной активности экстракта использовали парциальную константу скорости тушения хемилюминесценции. Величины парциальных констант для апиекстрактов 1-3 приведены на рис. 4. Так, антиоксидантная активность экстрактов после трехдневной отмывки сырья уменьшается с 2,96 до 1,51 с<sup>-1</sup>г<sup>-1</sup>. Сопоставление величин  $K_{CL}$  с представленными выше концентрациями антиоксидантов позволяет заключить, что общий антиоксидантный эффект

in apiextract is plant pollen, meanwhile as carotenoids are comprised not only by pollen but also in bee bodies. Thus when analyzing the dynamics of the changes in concentrations of anti-oxidant components and ballast substances in apiextracts, derived from the raw material with various flushing protocols we may conclude that the change in chemical composition of apiextracts depending on flushing duration may be explained by mechanical removal of wax particles and pollen.

It should be noted that flavonoids and carotenoids are not the only anti-oxidative components of



**Рис. 4.** Антиоксидантная активность апиекстрактов 1-3.

**Fig. 4.** Antioxidative activity of apiextracts 1-3.

апиэкстрактов незначительно зависит от содержания в них флавоноидов и в большей степени определяется присутствием каротиноидов и других антиокислителей.

Этанол, используемый для приготовления апиэкстракта, также обладает антиокислительными свойствами [8]. Определяли  $K_{CL}$  в водных растворах этанола с различными концентрациями спирта. Полученные значения были близки к нулю, что позволяет связывать наблюдаемый эффект с антиокислительной активностью компонентов экстракта, а не растворителя.

Следует также отметить, что по антиокислительной активности апиэкстракт 1 в три раза превышает антиоксидантный препарат “Аскорутин” ( $1,04 \text{ c}^{-1}\text{r}^{-1}$ ) и в шесть – аскорбиновую кислоту ( $0,54 \text{ c}^{-1}\text{r}^{-1}$ ).

Воздействие апиэкстрактов 1-3 на биологические объекты оценивали по динамике роста нативных клеток, а также апиэкстракта 1 на пролиферативную активность криоконсервированных клеток *S. cerevisiae*.

Было изучено влияние различных концентраций спирта, который является растворителем для апиэкстрактов, на жизнеспособность дрожжевых клеток до и после замораживания-отогрева.

Установлено, что добавление спирта в конечных концентрациях 5; 10; 20% к нативным клеткам дрожжей достоверно не влияло на колониеобразующую способность *S. cerevisiae* по сравнению с контрольными значениями (табл. 1).

Рост культуры дрожжей в присутствии апиэкстрактов 1-3 (1,6 мг/мл) отображен на рис. 5. При инкубировании *S. cerevisiae* в течение 6 ч наблюдается стимуляция роста при наличии апиэкстрактов 1 и 2. Следует отметить, что экстракт, полученный из исходного сырья без промывания (апиэкстракт 1), оказывает максимальный эффект стимуляции. Увеличение продолжительности промывания исходного сырья

апиэкстрактов. So, anti-oxidative activity is characteristic also for recovering of sugars, glucose is referred to those. Since carbohydrates are well dissolved in water, their concentration may significantly decrease during raw material flushing.

Due to the data obtained concentrations of anti-oxidants when preparing raw material vary within a wide range, of big interest is the study of general anti-oxidative ability of extracts depending on flushing duration for dead bees.

As the index of anti-oxidant activity of extract we used partial constant of chemiluminescence quenching rate. The values of partial constants for apiextracts 1-3 are presented in Fig. 4. As presented data show anti-oxidative activity of extracts after 3 days' washing-out reduces two times: from  $2.96 \text{ s}^{-1}\text{g}^{-1}$  down to  $1.51 \text{ s}^{-1}\text{g}^{-1}$ . Comparison of the  $K_{CL}$  values with those presented above concentrations of anti-oxidants enables to conclude that general anti-oxidant effect of apiextracts is slightly dependent on the content of flavonoids and in greater extent is determined by the presence of carotenoids and other anti-oxidants.

Ethanol, used during preparing of apiextract, also has anti-oxidative properties [8]. We examined  $K_{CL}$  in aqueous solutions of ethanol with various alcohol concentrations. Obtained values were close to zero that enables to associate the observed effect to anti-oxidative activity of extract components but not a solvent.

It should be also noted that on anti-oxidative activity the apiextract 1 is three times higher than the one for anti-oxidant agent “Ascorutin” ( $1.04 \text{ s}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) and six times for ascorbic acid ( $0.54 \text{ s}^{-1}\text{g}^{-1}$ ).

Effect of apiextracts 1-3 on biological objects was estimated by the dynamics of growth of native cells, as well as that of apiextract 1 on proliferative activity of *S. cerevisiae* cryopreserved cells.

The influence of different concentrations of alcohol, being a solvent for apiextracts on viability of yeast cells prior to and after freeze-thawing has been studied.

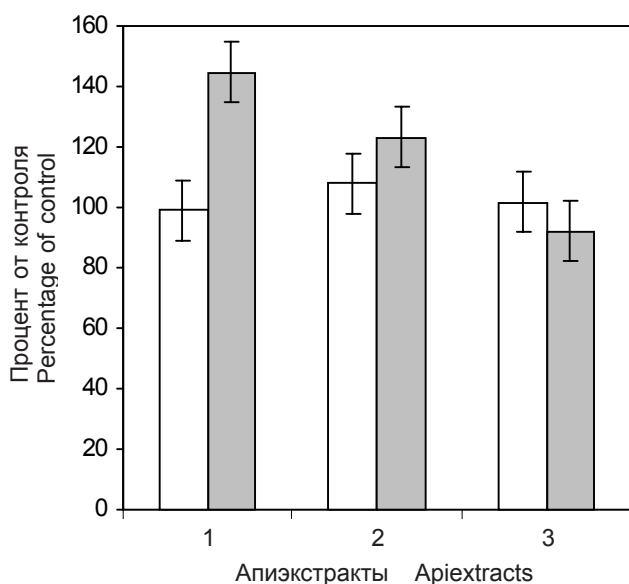
Alcohol addition in 5; 10; 20% final concentrations into native yeast cells was established as not significantly affecting colony-forming ability of *S. cerevisiae* in comparison with the control values (Table 1)

Yeast culture growth in presence of apiextracts 1-3 (1.6 mg/ml) is shown in Fig. 5. During incubation of *S. cerevisiae* for 6 hrs there is observed growth stimulation in presence of apiextracts 1 and 2. It should be noted that the extract derived from initial raw material with no flushing (extract 1) renders maximum stimulation effect. An increased duration of washing-out of initial raw material results in a decrease in stimulating effect of extract on yeast culture growth. In case of introduction of apiextract 3 into the medium of yeast incubation there is found a tendency to inhibiting of *S. cerevisiae* population growth. Thus, stimulating effect of apiextracts on the growth of

**Таблица 1.** Влияние различных концентраций этилового спирта на колониеобразующую способность *S. cerevisiae*

**Table 1.** Effect of different concentrations of ethyl alcohol on colony-forming ability of *S. cerevisiae*

Вид добавки Additive type	КОЕ/мл $\times 10^8$ CFU/ml $\times 10^8$
Контроль Control	1,98 $\pm$ 0,36
Этиловый спирт, 5 % Ethyl alcohol, 5 %	2,15 $\pm$ 0,1
Этиловый спирт, 10 % Ethyl alcohol, 10 %	1,94 $\pm$ 0,13
Этиловый спирт, 20 % Ethyl alcohol, 20 %	1,52 $\pm$ 0,32



**Рис. 5.** Рост культуры клеток дрожжей в присутствии апиекстрактов 1-3: □ – через 20 мин инкубации; ■ – через 6 ч инкубации.

**Fig. 5.** Growth of yeast cell culture in the presence of apiextracts 1-3: □ – in 20 min incubation; ■ – in 20 min incubation.

снижает стимулирующее действие экстракта на рост культуры дрожжей. При внесении апиекстракта 3 в среду инкубации дрожжей отмечается тенденция к ингибированию роста популяции *S. cerevisiae*. Таким образом, стимулирующее действие апиекстрактов на рост культуры *S. cerevisiae* зависит от режима промывания исходного сырья.

Было также изучено влияние апиекстракта на пролиферативную активность криоконсервированных клеток *S. cerevisiae*.

Влияние различных экстремальных воздействий, в том числе криоконсервирования, на клеточные суспензии микроорганизмов приводит к потенциально летальным повреждениям [1, 9, 12].

В процессе криоконсервирования клетки подвергаются изменениям, приводящим к их гибели. Для уменьшения количества погибших клеток используются различные репарирующие среды [14]. Поскольку апиекстракт 1 обладает максимальным стимулирующим действием на рост культуры дрожжей, в дальнейших экспериментах мы изучали его влияние на колониеобразующую способность криоконсервированных клеток.

Добавление апиекстракта 1 (1 мг/мл) к замороженным и отогретым клеткам дрожжей способствовало снижению количества КОЕ до 50% (табл. 2). Введение апиекстракта 1 в концентрациях 0,05; 0,25; 0,5 мг/мл к клеткам после отогрева и эквilibрации приводило к повышению количества колониеобразующих единиц до 88-90%, что на 30% превышает результаты, полученные при

*S. cerevisiae* culture depends on the flushing protocol for initial raw material.

In the following sets of experiments we have investigated the effect of apiextract on proliferating activity of *S. cerevisiae* cryopreserved cells.

It is known that the effect of different extreme influences including cryopreservation on cell suspensions of microorganisms leads to potentially lethal impairments [1, 9, 12].

During cryopreservation the cells are underwent the changes resulting to their death. To reduce the number of dead cells there are used various reparative media [14]. Since apiextract 1 has maximum stimulating effect of yeast culture growth we have studied its influence on colony forming ability of cryopreserved cells.

Addition of apiextract 1 (1 mg/ml) to frozen and thawed yeast cells resulted in a decrease in the number of CFU down to 50% (Table 2). Introduction of apiextract 1 under concentrations of 0.05; 0.25; 0.5 mg/ml to cells after thawing and equilibration led to a rise in the number of colony-forming units up to 88-90% that by 30% exceeds the results obtained during freeze-thawing with no additives (Table 2). This may testify to a stimulating effect of apiextract on reparative processes in yeast cells.

The effect of the extracts derived from samples 1-3 on biological objects was estimated on studying the dynamics of growth of native cells, as well as extract 1 on proliferative activity of cryopreserved *S. cerevisiae* cells.

Preliminarily there was investigated the influence of different concentrations of alcohol which is the solvent for apiextracts on viability of yeast cells prior to and after freeze-thawing.

It has been established that alcohol addition under final concentrations of 5, 10, 20% to native cells of yeast did not statistically and significantly affect colony-forming ability of *S. cerevisiae* if compared with the control values (Table 2).

To prepare apiextract alcohol is used as solvent, therefore we have studied the influence of alcohol on colony-forming activity of cryopreserved cells. The choice of alcohol concentrations was determined by its content in apiextract as a solvent.

Table 2 shows that the effect of alcohol addition under the mentioned concentrations to frozen and thawed cells was significantly lower than apiextract effect under corresponding concentrations.

Therefore biological activity of apiextracts depends on the way of their obtaining: the most poorly purified extract has the highest biological effect.

## Conclusions

Extracts derived from dead bees contain high concentrations of flavonoids and carotenoids and have significant antioxidative and biological activity.

замораживании-отогреве без введения каких-либо добавок (табл. 2). Это может свидетельствовать о стимулирующем действии апиэкстракта на репарационные процессы в клетках дрожжей.

При приготовлении апиэкстракта как растворитель используется спирт, поэтому мы изучали влияние спирта на колониеобразующую способность криоконсервированных клеток. Выбор концентраций спирта определялся его содержанием в апиэкстракте.

Как видно из табл. 2, эффект добавления спирта в указанных концентрациях к замороженным и отогретым клеткам был существенно ниже, чем влияние апиэкстракта в соответствующих концентрациях.

Следовательно, биологическая активность апиэкстрактов зависит от способа их получения: наименее очищенный экстракт обладает наибольшим биологическим эффектом.

### Выводы

Экстракты из пчелиного подмора содержат высокие концентрации флавоноидов и каротиноидов и обладают значительной антиоксидантной и биологической активностью.

Технологические приемы по подготовке исходного сырья и получению экстракта оказывают значительное влияние на химический состав и активность конечного продукта. Промывание пчелиного подмора приводит к удалению из него ценных биологически активных компонентов, следствием чего является ухудшение качества конечного продукта.

### Литература

1. Бондарчук И.А. Моделирование выживаемости клеток млекопитающих, подвергнутых действию ионизирующего излучения с разной линейной передачей энергии // Биофизика, – 2003. – Т. 48, №3. – С. 474-479.
2. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
3. Луста К.А., Фикте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пушкино, 1990. – 186 с.
4. Сняжков А.Ф. Мед и медолечение. – М.: Вече, 2000. – 464 с.
5. Таранов Г.Ф. Анатомия и физиология медоносных пчел. – М.: Колос, 1968. – 344 с.
6. Ульяничев Е.М., Кривцов Н.И. Проблемы отрасли // Пчеловодство. – 2001. – № 1. – С. 3-5.
7. Хисматуллин М.Р. Разработка и изучение функциональных аспектов действия косметических препаратов с биологически активными составляющими природных компонентов пчеловодства: Автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 2003. – 20 с.
8. Шепелов А.П. Перекисное окисление липидов в бурой жировой ткани крыс при остром охлаждении // Физиол. журн. СССР. – 1978. – Т. 64, №1. – С. 108-112.
9. Gage A.A., Baust J.G. Cryosurgery – a review of recent advances and current issues // Cryoletters. – 2002. – Vol.23, N2. – P. 69-78.

**Таблица.2.** Влияние различных добавок на колониеобразующую способность криоконсервированных клеток *S. cerevisiae*

**Table 2.** Effect of different additives on colony-forming ability of *S. cerevisiae* cryopreserved cells

Вид добавки Additive type	Количество колоний,% от контроля Number of colonies,% of control
Отсутствует Absent	51,64±6,38
Этиловый спирт, 20% Ethyl alcohol, 20%	85,72±6,59
Этиловый спирт, 10% Ethyl alcohol, 10%	63,30±10,98
Этиловый спирт, 5% Ethyl alcohol, 5%	73,19±5,27
Этиловый спирт, 1% Ethyl alcohol, 1%	68,35±4,18
Апиэкстракт 1 (1 мг/мл) (этиловый спирт, 20%) Apiextract1 (1 mg/ml) (Ethyl alcohol, 20%)	50,38±8,76
Апиэкстракт 1 (0,5 мг/мл) (этиловый спирт, 10%) Apiextract 1 (0.5 mg/ml) (Ethyl alcohol, 10%)	93,63±3,69
Апиэкстракт 1 (0,25 мг/мл) (этиловый спирт, 5%) Apiextract 1 (0.25 mg/ml) (Ethyl alcohol, 5%)	88,36±7,37
Апиэкстракт 1 (0,05 мг/мл) (этиловый спирт, 1%) Apiextract 1 (0.05 mg/ml) (Ethyl alcohol, 1%)	90,20±4,33

Technological protocols for preparing initial raw materials and obtaining the extract determine chemical composition and activity of final product. Dead bees washing results in removal from it of valuable biologically active components, that leads to the aggravation of final product quality.

### References

1. Bondarchuk I.A. Modeling of cell survival of mammals subjected to ionizing irradiation with different linear energy transfer // Biofizika, 2003. – Vol. 48, N3. – P. 474-479.
2. Labinskaya A.S. Microbiology with microbiological research technique. – Moscow: Meditsina, 1978. – 394 p.
3. Lusta K.A., Fikhte B.A. Methods of determining microorganisms viability. – Puschino, 1990. – 186 p.
4. Sinyakov A.F. Honey and treatment with honey. – Moscow: Veche, 2000. – 464 p.
5. Taranov G.F. Anatomy and physiology of honey bees. – Moscow: Kolos, 1968. – 344 p.
6. Ulyanichev E.M., Krivtsov N.I. Branch problems // Pchelovodstvo. – 2001. – N1. – P. 3-5.
7. Khismattulin M.R. Development and study of functional aspects of the effect of cosmetic preparations with biological active substances of bee-keeping natural components: Author's thesis of candidate of biol. sciences. – Moscow, 2003. – 20 p.
8. Shepelov A.P. Lipid peroxidation in rat's brown fat tissues under acute cooling // Fiziol. zhurn. USSR. – 1978. – Vol. 64, N1. – P. 108-112.



10. *Gundermann K.D., McCapra F.* Chemiluminescence in Organic Chemistry.– Berlin: Springer-Verlag, 1987.– 217 p.
  11. *Krzyminski K., Kadnikova N., Roshal A. et al.* Biological activity of hydrophilic bee extract // FEBS Journal, Abstracts of 31<sup>st</sup> FEBS Congress. 2006.– Vol. 273.– P. 299.
  12. *Morris G.J., Coulson G.E., Clarke K.J.* Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of Growth Conditions// Cryobiology, 1988.– Vol. 25, N5.– P. 471-482.
  13. *Phaff H. J., Miller M.W., Mrak E.M.* The life of yeasts. 2 ed.,– Camb., 1979.– 271 p.
  14. *The effects of low temperatures on biological systems / Eds.: Grout B.W., Morris G.J.– London: Arnold, 1987.– 500 p.*
  15. *Weeks I., Beheshti I., McCapra F. et al.* Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay // Clin. Chem.– 1983.– Vol. 29, N8.– P. 1474-1479.
9. *Gage A.A., Baust J.G.* Cryosurgery – a review of recent advances and current issues // Cryoletters.– 2002.– Vol.23, N 2.– P. 69-78.
  10. *Gundermann K.D., McCapra F.* Chemiluminescence in Organic Chemistry.– Berlin: Springer-Verlag, 1987.– 217 p.
  11. *Krzyminski K., Kadnikova N., Roshal A. et al.* Biological activity of hydrophilic bee extract // FEBS Journal, Abstracts of 31<sup>st</sup> FEBS Congress. 2006.– Vol. 273.– P. 299.
  12. *Morris G.J., Coulson G.E., Clarke K.J.* Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of growth conditions// Cryobiology, 1988.– Vol. 25, N5.– P. 471-482.
  13. *Phaff H. J., Miller M.W., Mrak E.M.* The life of yeasts. 2 ed.,– Camb., 1979.– 271 p.
  14. *The effects of low temperatures on biological systems / Eds.: Grout B.W., Morris G.J.– London: Arnold, 1987.– 500 p.*
  15. *Weeks I., Beheshti I., McCapra F. et al.* Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay // Clin. Chem.– 1983.– Vol. 29, N8.– P. 1474-1479.

*Поступила 17.03.2006*

*Accepted in 17.03.2006*