

УДК 633.79:58.085:663

**ВЫРАЩИВАНИЕ ЖЕНЬШЕНЯ
В КУЛЬТУРЕ IN VITRO,
РАЗРАБОТКА НАПИТКОВ
С ПРИМЕНЕНИЕМ
ЕГО ЭКСТРАКТОВ**

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук
зав. лабораторией вирусологии

Агеева Наталья Михайловна
д-р техн. наук, профессор
главный научный сотрудник
НЦ «Виноделие»

Костюк Марина Александровна
мл. научный сотрудник
лаборатории вирусологии

Беседина Екатерина Николаевна
мл. научный сотрудник
лаборатории вирусологии

*Федеральное Государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства»,
Краснодар, Россия*

Цель исследований заключалась в получении препаративной формы экстрагированной клеточной культуры женьшеня in vitro в условиях лаборатории, а также в разработке препаратов на основе экстрактов женьшеня. В работе над статьёй использованы результаты собственных исследований, а также аналитический обзор отечественных и зарубежных литературных источников. Работа выполнена в лаборатории биотехнологии и Центре виноделия Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства. Объектом исследования и совершенствования явилась методика производства женьшеня в культуре in vitro. В исследованиях использован биоматериал

UDC 633.79:58.085:663

**CULTIVATION
OF THE GINSENG
IN VITRO, DEVELOPMENT
OF DRINKS WITH USE
OF ITS EXTRACTS**

Buntsevich Leonid
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Virology

Ageeva Natalia
Dr. Sci. Tech., Professor
Chief Research Associate
of SC "Wine-making"

Kostyuk Marina
Junior Research Associate
of Laboratory of Virology

Besedina Ekaterina
Junior Research Associate
of Laboratory of Virology

*Federal State Budget Scientific
Organization «North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture»,
Krasnodar, Russia*

The purpose of the research was to obtain a preparative form of extractive cell culture «in vitro» of ginseng in the laboratory conditions, as well as in the development of products based on ginseng extracts. In the article the results of own research are used and analytical review of domestic and foreign sources. The work is performed in the laboratory of biotechnology and the center of winemaking of North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture. The object of research and improvement of methods of production of ginseng has been in vitro culture. In the study the biomaterial of ginseng

женьшеня и экстракт корней. Методики исследований – общепринятые. В статье приведены полезные свойства и проблемы выращивания женьшеня в огородной культуре. Указана актуальность получения его биомассы в культуре *in vitro*.

Разработан состав питательной среды для выращивания культуры клеток женьшеня: макро- и микроэлементы по Мурасиге-Скугу, сахароза – 30 мг/л, тиамин-хлорид – 1 мг/л, мезоинозит – 80 мг/л, кинетин – 1 мг/л, α-НУК – 2 мг/л, хелат железа – 10 мг/л, агар-агар – 7 мг/л.

Охарактеризован цикл культивирования биомассы женьшеня. Изготовлена вкусоароматическая добавка «Женьшеневая», приведены её органолептические и физико-химические показатели. Как один из женьшеневых препаратов, эта добавка наследует характеристики женьшеня.

Она обладает тонизирующим свойством, положительно влияет на состояние человека при гипотонии, усталости, переутомлении, неврастении, пониженной потенции. Является прекрасным адаптогеном, повышающим сопротивляемость организма к заболеваниям и стрессам.

На основе этой добавки разработаны уникальные газированные и негазированные безалкогольные напитки, слабоалкогольные, винные и крепкие напитки, водки, бальзамы, горькие настойки.

Ключевые слова: КУЛЬТУРА IN VITRO, ЭКСПЛАНТЫ, ЖЕНЬШЕНЬ, НАПИТОК

and extract of roots are used.

The research techniques are generally accepted. In the article the useful properties of a ginseng and problems of its cultivation in garden culture are given. The actuality of receiving of its biomass *in vitro* is specified. The structure of a nutrient medium for cultivation of a ginseng's cellular culture is developed: the macro – and microelements according to Murashige and Skoog, sucrose – 30 mg/l, tiamin-chloride – 1 mg/l, mesoinositol – 80 mg/l, kinetin – 1 mg/l, α-NУК – 2 mg/l, iron chelate – 10 mg/l, an agar-agar – 7 mg/l. The ginseng's biomass cultivation cycle is characterized.

The flavouring-aromatic addition of "Zhenshenevaya" is made, its organoleptic and physical and chemical features are given.

As one of the ginseng preparations, this addition inherits the characteristics of a ginseng. It possesses the toning property and positively influences on person's condition when a hypotonia, an exhaustion, a neurasthenia, the lowered potentiality. It is a fine adaptogen, which increases the organism resistance to diseases and stresses.

On the basis of this addition the unique aerated and not aerated soft drinks, low alcohol and hard drinks as, vodka, balms, liquors are developed.

Key words: IN VITRO CULTURE, PLANTLETS, GINSENG, DRINK

Введение. Интерес к природным оздоравливающим препаратам никогда не уменьшается и, наоборот, в последние годы только растёт. Ухудшение экологии мест проживания людей, изменение рациона питания, хроническая нехватка витаминов делает уязвимым для болезней организм человека, который в значительной мере зависит от состояния иммунитета. Наблюдается постоянный рост больных, страдающих так называемыми «болезнями цивилизаций». Это болезни сердца и сосудов, онкологические

заболевания, диабет, СПИД, гепатиты и др. С древних времен человечество излечивало недуги с помощью разнообразных растительных и животных веществ натурального происхождения. С началом производства фармацевтических лекарственных средств об этом стали забывать. А между тем, все чаще использование искусственных лекарственных средств приводит к различным последствиям, таким как аллергия, развитие иммуно- и витаминдефицита. Поэтому большую популярность приобретают средства, направленные на поддержание здорового состояния организма человека. Одним из таких средств, укрепляющим, иммуностимулирующим, продлевающим жизнь человека издавна считали женьшень.

Актуальность работы определена спросом на натуральные оздоравливающие препараты, в частности женьшень и продукты на его основе.

Цель исследований заключалась в получении препаративной формы экстрагированной клеточной культуры женьшеня *in vitro* в условиях лаборатории, а также в разработке препаратов на основе экстрактов женьшеня.

Объекты и методы исследований. В работе над статьёй использованы результаты собственных исследований, а также аналитический обзор отечественных и зарубежных литературных источников.

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии и Центре виноделия ФГБНУ СКЗНИИСиВ. Объектом исследования и совершенствования явилась методика производства женьшеня в культуре *in vitro*. В исследованиях использован биоматериал женьшеня и экстракт корней. Методики исследований – общепринятые.

Обсуждение результатов. Женьшень – исчезающий вид. Его ботаническое название – *Panax ginseng* С.А. Меу, семейство аралиевых (Araliaceae). Дикий женьшень всё ещё можно встретить в горных широколиственных и хвойных лесах Приморского края (Россия) и на северо-востоке Китая. В местах естественного произрастания он предпочитает дрениро-

ванные горно-лесные бурые почвы. Это теневыносливое многолетнее растение с корневищем (шейкой) и мясистым стержневым корнем (телом), состоящим из нескольких разветвлений (рис.). Стебель женьшеня одиночный, верхушечная розетка состоит из 5 листьев. Соцветие – зонтик, цветы зеленоватые, мелкие.

Женьшень издавна известен как ценное лечебное средство. Установлено его сильное тонизирующее и стимулирующее действие при умственном и физическом переутомлении, слабости и пониженном кровяном давлении [1]. Тонизирующие и стимулирующие свойства женьшеня основаны на активности тритерпеновых гликозидов (панаксозидов А, В, С, D, Е, F, G), которые относятся к тетрациклическим тритерпенам даммаранового ряда. Также в корнях женьшеня выделены даукостерин, слизи, смолы, витамины В₁ и В₂, С, холин, горькие вещества, эфирные и жирные масла, пектины и др. углеводы [2, 3].



Рис. 1. Изолированные корни женьшеня

Тонизирующее влияние женьшеня проявляется при длительном применении в форме общего улучшения состояния организма человека [4, 5]. Стимулирующая активность женьшеня проявляется при однократ-

ном приеме в двойном-тройном объеме, в форме эффективного снижения усталости и резкого повышения работоспособности [6].

Направленность воздействия женьшеня на организм человека не специфична, а системна, то есть при приеме его препаратов повышается общая резистентность организма, независимо от характера вредного воздействия. Прием препаратов женьшеня не исключает, а предполагает параллельное использование лекарств. Установлено, что женьшень регулирует обмен нуклеиновых кислот и белков, способствует регенерации тканей, усиливает ассимиляцию питательных веществ, предотвращает избыточное отложение жира в печени. Имеются положительные результаты применения женьшеня при миокардиодистрофии и нервных заболеваниях. В зависимости от дозы женьшень может возбуждать или успокаивать кору головного мозга [7].

Известно, что женьшень, в отличие от средств, защищающих от внешней радиации, в случае инкорпорации радиоактивных изотопов (стронция, плутония, фосфора и др.) защищает организм человека при внутреннем облучении. Он приводит к усилению обмена кальция в костной ткани, чем способствует полному выведению из организма накопленных там радионуклидов.

Использование женьшеня после жёсткого радиоактивного облучения повышает выживаемость, замедляет потерю массы тела, увеличивает количество эритроцитов, нормализует содержание гемоглобина, ретикулоцитов, лейкоцитов в крови и предупреждает лучевые болезни. Защитный эффект проявляется не только при его профилактическом введении перед облучением, но и спустя некоторое время после облучения [8].

И.И. Брехман в опыте с плавающими до полного утомления белыми мышами показал, что наиболее эффективны водные экстракты женьшеня, на втором месте по эффективности – 50%-ные водно-спиртовые экстракты женьшеня [9].

Выявленные ценные свойства женьшеня определяют его использование в медицине и других областях, направленных на лечение и сохранение здоровья и долголетия человека. Препараты женьшеня используют для лечения атеросклероза, при пониженном артериальном давлении, пороках сердца, малокровии, сахарном диабете [7]. Человек нуждается в них после тяжелых заболеваний, во время и после стрессовых состояний, при работе во вредных условиях, при повышенной утомляемости.

Группа учёных под руководством доктора биологических наук Г. Порошенко (ВНИИ биотехнологии, 1986) установила, что женьшень способствует репарации хромосом, поврежденных радиоактивным излучением или другими мутагенами (митомицин С или нитрозометилмочевина). Установлено, что препараты женьшеня сдерживают рост раковых опухолей и в ряде случаев предотвращают рецидив болезни.

Раньше, когда женьшень был достаточно представлен в ареале своего распространения (Дальний Восток России, Китай, Корея), корни собирали, сушили и перерабатывали различными способами. Уже к середине 20-го века его запасы резко сократились, и женьшень научились возделывать в огородной культуре. Химический состав корней и фармакологические свойства дикорастущего и культивируемого женьшеня при соблюдении правил агротехники практически не различаются [5]. Однако и у огородной культуры этого растения есть свои проблемы – товарный корень вырастает за 5-7 лет, многочисленные заболевания зачастую уничтожают целые плантации женьшеня. Учитывая, что современные агроценозы в целом испытывают существенное негативное антропогенное воздействие [10], перспективы огородной технологии выращивания женьшеня неустойчивы. Решением проблемы могут быть тепличное выращивание корня и культура *in vitro* женьшеня [11-15].

Огородная культура и тепличное выращивание корня женьшеня относятся к традиционным агротехнологиям. Но в настоящее время активно

развивается технология воспроизводства биомассы женьшеня *in vitro* на клеточном уровне. Её основа заключается в выращивании инициальной клеточной культуры женьшеня, полученной из тканей натурального корня, на среде с кинетином, с последующим пересевом и отбором выросшей биомассы для экстракции биологически активных веществ.

Питательная среда, на которой выращивается культура клеток женьшеня, содержит макро- и микроэлементы по Мурасиге-Скугу, сахарозу – 30 мг/л, тиамин-хлорид – 1 мг/л, мезоинозит – 80 мг/л, кинетин – 1 мг/л, α -НУК – 2 мг/л, хелат железа – 10 мг/л, агар-агар – 7 мг/л. В процессе приготовления среду разливают в стеклянные сосуды объёмом 200-250 мл порциями по 60-80 мл. Сосуды тщательно укупорируют крышками из фольги и автоклавируют в целях стерилизации. Бокс и инструменты также стерилизуют. После посадки инициальной культуры на питательную среду культивационные сосуды переносят в специальное помещение с постоянной температурой воздуха в 26 °С и влажностью 70 %.

Выросшая на питательной среде клеточная культура женьшеня – кремово-белого цвета, рыхлая, оводнённая, со специфическим запахом и вкусом. Она состоит на 60-90 % из клеток меристематического типа и на 2-10 % из клеток паренхимного типа. Цикл выращивания биомассы женьшеня характеризуется S-образной кривой с лагфазой продолжительностью 5 суток от начала культивирования, фазой экспоненциального роста – с 5 по 10 сутки, линейной фазой – с 10 по 32 сутки, фазой замедления роста – с 32 по 35 сутки, и стационарной фазой – после 35 суток от начала культивирования. Биомассу, завершившую рост и снятую с питательной среды, сушат и затем экстрагируют.

Препаративная форма экстрагированной клеточной культуры *in vitro*, разработанная в СКЗНИИСиВ, – вкусо-ароматическая добавка «Женьшеневая». Её получают путём водно-спиртовой перколяции высушенной биомассы женьшеня. Как один из женьшеневых препаратов, вкусо-

Токсичные элементы (мышьяк, кадмий, свинец, ртуть) во вкусо-ароматической добавке «Женьшеневая» не обнаружены. Содержание радионуклидов составляет: цезий-137 – менее бк/л, стронций-90 – менее 25 бк/л. Гарантийный срок хранения вкусо-ароматической добавки «Женьшеневая» составляет 12 месяцев со дня его изготовления. Условия хранения – в сухом, защищённом от света месте. Вкусо-ароматическая добавка «Женьшеневая» является полуфабрикатом и применяется в качестве сырья в производстве алкогольных, слабоалкогольных, безалкогольных напитков и минеральной воды; пива, плодовых, ягодных, виноградных, овощных соков, напитков, компотов, сиропов, нектаров. Она не подлежит реализации через аптечную сеть и специализированные отделы торговой сети. Рекомендуемая концентрация добавки: до 4 мл на 1 л, или 4 г на 1 кг готового продукта, из расчёта суточной нормы потребления до 4 г на взрослого человека. Противопоказания к использованию не выявлены.

Кроме того, вкусо-ароматическая добавка «Женьшеневая» при добавлении в рекомендуемой пропорции в водно-спиртовую смесь улучшает её органолептические показатели (снижает проявление посторонних тонов, в том числе сивушных, землистых и т.п.), не оказывает влияния на розливостойкость напитков, не приводит к выпадению осадка, изменению цвета и прозрачности. Высокотемпературная (200 °С) обработка вкусо-ароматической добавки «Женьшеневая» не влечёт за собой ухудшения биологических и органолептических свойств, при прогревании происходят конформационные изменения, не затрагивающие биологическую и пищевую ценность продукта.

Заключение. Оптимальная питательная среда для выращивания клеток женьшеня, содержащая макро- и микроэлементы по Мурасиге-Скугу: сахарозу – 30 мг/л, тиамин-хлорид – 1 мг/л, мезоинозит – 80 мг/л, кинетин – 1 мг/л, α -НУК – 2 мг/л, хелат железа – 10 мг/л, агар-агар – 7 мг/л.

На основе вкусо-ароматической добавки «Женьшеневая» разработаны функциональные продукты питания: уникальные газированные и негазированные напитки: безалкогольный «Женьшеневый», слабоалкогольный «Женьшень-тоник», слабоалкогольный «Энотоник»; водки «Легенда», «Женьшеневая особая», бальзамы «Императрица», «Экспромт», «Женьшеневый», настойки горькие «Родник», «Ривьера», винный напиток «Женьшеневый крепкий», крепкий напиток «Женьшеневая настойка». Бальзам «Женьшеневый» и винный напиток «Женьшеневый крепкий» награждены золотыми медалями и дипломами ВВЦ России.

Литература

1. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения / А.Ф. Гаммерман, Г.Н. Кадаев, А.А. Яценко-Хмелевский // М.: Высшая школа. – 1990. – С. 183-186.
2. Сикура, И.И. Интродуцированные лекарственные растения / И.И. Сикура, Н.Е. Антонюк, А.А. Пироженоко [и др.] // Киев.: Наукова думка. – 1983. – 93 с.
3. Choi, K.T. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C. A. Meyer/ K.T. Choi // Acta Pharmacol Sin. - V.29. -2008. - P. 1109-1118.
4. Чёрный, И.К. Влияние длительного приёма препарата женьшеня на физическую и умственную работоспособность человека / И.К. Черный.– Вып. 2. – М.-Л.: АН СССР, 1955. – С. 166-170.
5. Сало, В.М. Зелёные друзья человека / В.М. Сало // М.: Наука. – 1975. – С. 68.
6. Чёрный, И.К. Эргографическое исследование стимулирующего действия женьшеня и фенамина / И.К. Черный.– М.-Л.: АН СССР, 1955.– С. 171-173.
7. Кириллов, О.И. Опыт фармакологической регуляции стресса / О.И. Кириллов // М.: Наука. – 1981. – С. 15-18.
8. «Женьшень. Лечебные свойства женьшеня». Материалы фирмы «Женьшень». – Кимры. – 2002.
9. Гриневиц, М.А. Опыт биологической оценки действия различных препаратов женьшеня / М.А. Гриневиц // Материалы к изучению женьшеня и лимонника.– Вып. 2. – М.-Л.: АН СССР, 1955. – С. 160-165.
10. Разработки, формирующие современный облик садоводства / Под ред. В.П. Поповой. – Краснодар, 2011.– 317 с.
11. Бунцевич, Л.Л. Свойства женьшеня, биотехнологический способ культивирования и применение продуктов его переработки в пищевой индустрии / Л.Л. Бунцевич // Достижения науки и техники АПК.– №7. – М., 2004. – С. 20-21.
12. Nguyen Trung Thanh. Optimization of ginseng cell culture in airlift bioreactors and developing the large-scale production system / Nguyen Trung Thanh, Hosakatte Niranjana Murthy, Kee Yoeup Paek // Industrial Crops and Products.- Volume 60. - 2014. - Pages 343-348.
13. Uchendu, E.E. 4.25 – Improvement of Ginseng by *In Vitro* Culture: Challenges and Opportunities/ E.E. Uchendu, M.R. Shukla, B.M. Reed, D.C.W. Brown, P.K. Saxena //Comprehensive Biotechnology (Second Edition). - Volume 4: Agricultural and Related Biotechnologies. – 2011. - Pages 317–329.

14. Wu, Jianyong . Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects / Jianyong Wu, Jian-Jiang Zhong //Journal of Biotechnology. - Volume 68. - Issues 2–3. -1999. - Pages 89–99.

15. Park, J. D. Biological activities and chemistry of saponins from Panax ginseng C. A. Meyer / J. D. Park, D. K. Rhee, Y. H. Lee // Phytochemistry Reviews. - Vol. 4. – 2005. - PP. 159–175.

References

1. Gammerman, A.F. Lekarstvennye rasteniya / A.F. Gammerman, G.N. Kadaev, A.A. Yatsenko-Hmelevskiy // M.: Vysshaya shkola. – 1990. – S. 183-186.

2. Sikura, I.I. Introdutsirovannye lekarstvennye rasteniya / I.I. Sikura, N.E. Antonyuk, A.A. Pirozhenko [i dr.] // Kiev.: Naukova dumka. – 1983. – 93 s.

3. Choi, K.T. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C. A. Meyer/ K.T. Choi // Acta Pharmacol Sin. - V.29. -2008. - R. 1109-1118.

4. Chernen'kiy, I.K. Vliyanie dlitel'nogo priema preparata zhen'shenya na fizicheskuyu i umstvennyuyu rabotosposobnost' cheloveka / I.K. Chernen'kiy.– Vyp. 2. – M.-L.: AN SSSR, 1955. – S. 166-170.

5. Salo, V.M. Zelenye druz'ya cheloveka / V.M. Salo // M.: Nauka. – 1975. – S. 68.

6. Chernen'kiy, I.K. Ergograficheskoe issledovanie stimuliruyushchego deystviya zhen'shenya i fenamina / I.K. Chernen'kiy.– Vyp. 2. – M.-L.: AN SSSR, 1955. – S. 171-173.

7. Kirillov, O.I. Opyt farmakologicheskoy regulyatsii stressa / O.I. Kirillov // M.: Nauka. – 1981. – S. 15-18.

8. «Zhen'shen'. Lechebnye svoystva zhen'shenya». Materialy firmy «Zhen'shen'». – Kimry. – 2002.

9. Grinevich, M.A. Opyt biologicheskoy otsenki deystviya razlichnyh preparatov zhen'shenya / M.A. Grinevich // Materialy k izucheniyu zhen'shenya i limonnika.– Vyp. 2. – M.-L.: AN SSSR, 1955. – S. 160-165.

10. Razrabotki, formiruyushchie sovremennyj oblik sadovodstva / Pod red. V.P. Popovoy. – Krasnodar, 2011.– 317 s.

11. Buntsevich, L.L. Svoystva zhen'shenya, biotehnologicheskij sposob kultivirovaniya i primeneniye produktov ego pererabotki v pischevoy industrii / L.L. Buntsevich // Dostizheniya nauki i tehniki APK.– №7. – M., 2004. – S. 20-21.

12. Nguyen Trung Thanh. Optimization of ginseng cell culture in airlift bioreactors and developing the large-scale production system / Nguyen Trung Thanh, Hosakatte Niranjana Murthy, Kee Yoeup Paek // Industrial Crops and Products.- Volume 60. - 2014. - Pages 343-348.

13. Uchendu, E.E. 4.25 – Improvement of Ginseng by In Vitro Culture: Challenges and Opportunities/ E.E. Uchendu, M.R. Shukla, B.M. Reed, D.C.W. Brown, P.K. Saxena //Comprehensive Biotechnology (Second Edition). - Volume 4: Agricultural and Related Biotechnologies. – 2011. - Pages 317–329.

14. Wu, Jianyong . Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects / Jianyong Wu, Jian-Jiang Zhong //Journal of Biotechnology. - Volume 68. - Issues 2–3. -1999. - Pages 89–99.

15. Park, J. D. Biological activities and chemistry of saponins from Panax ginseng C. A. Meyer / J. D. Park, D. K. Rhee, Y. H. Lee // Phytochemistry Reviews. - Vol. 4. – 2005. - PP. 159–175.