



Научная статья

05.18.15 – Технология и товароведение пищевых продуктов и функционального и специализированного назначения и общественного питания (технические науки)

УДК 664

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.04.009

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КАЛЛУСНЫХ И КОРНЕВЫХ КУЛЬТУР *PANAX GINSENG*

Анастасия Михайловна Федорова¹, Анна Ивановна Лосева²,
Любовь Сергеевна Дышлюк³, Варвара Ивановна Минина⁴,

^{1, 2, 3, 4} Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

¹ anastasija.fedorova-af2014@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8071-4411>

² losevaa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4037-2653>

³ soldatovals1984@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7333-8411>

⁴ vminina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3485-9123>

Аннотация. *Panax ginseng* является самым ценным и известным тонизирующим препаратом в традиционной китайской медицине. В нем сосредоточено значительное количество биологически активных веществ, которые имеют антиоксидантные, антимикробные, противоопухолевые и противовоспалительное воздействие. Целью данного исследования является оптимизация параметров экстракции для извлечения биологических активных соединений из каллусных и корневых культур *Panax ginseng*, используя различные виды растворителей. В ходе работы установлены оптимальные условия культивирования каллусной и корневой культуры *Panax ginseng*: для каллусной культуры *Panax ginseng* выбраны питательные среды, при которых образуется более плотная каллусная культура, для корневой культуры установлен штамм *Agrobacterium rhizogenes*, способствующий эффективной трансплантации корней *Panax ginseng*. По полученным данным определены рабочие параметры экстрагирования: органическим растворителем для каллусной культуры *Panax ginseng* является ацетон, для корневой – диэтилового эфира, гидромодуль все всех клеточных культур составил 1:10, время экстракции для каллусной культуры *Panax ginseng* – 360 мин, для корневой – 60 мин, температура экстракции каллусной и корневой культуры *Panax ginseng* – 50 °С. С помощью метода ТСХ дана оценка общего содержания кофейной кислоты, рутина, экидистеронов, мангиферина, кверцетина, флавоногликозидов, апигенинов, кодонопсина, кардиофолина и колеофолида. Высокое содержание рутина (2,23±0,11 мг/кг) отмечилось для экстрактов каллусной культуры *Panax ginseng*, а для экстрактов корневой культуры *Panax ginseng* – апегенин (12,30±0,62 мг/кг). В случае метода ВЭЖХ в экстрактах были установлены органические кислоты. Экстракты каллусных и корневых культур *Panax ginseng* содержали в себе максимальное количество фурмаровой кислоты (0,36±0,02 и 0,85±0,05 мг/кг).

Ключевые слова: лекарственные растения, каллус, культуры клеток, биомасса, экстракция, биологические активные вещества.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 075-02-2018-223 от 26.11.2018, № 075-15-2019-1362 от 14.06.2019 (идентификатор проекта RFMEFI57718X0285).

Для цитирования: Оптимизация экстрагирования активных веществ каллусных и корневых культур *Panax ginseng* / А. М. Федорова [и др.]. // Ползуновский вестник. 2021. № 4. С. 60–69. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.04.009.

Original article

OPTIMIZATION OF EXTRACTION OF ACTIVE SUBSTANCES OF CALLUS AND ROOT CULTURES OF *PANAX GINSENG*

Anastasia M. Fedorova¹, Anna I. Loseva², Lyubov S. Dyshlyuk³,
Varvara I. Minina⁴

^{1, 2, 3, 4} Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

¹ anastasija.fedorova-af2014@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8071-4411>

² losevaa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4037-2653>

³ soldatovals1984@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7333-8411>

⁴ vminina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3485-9123>

Abstract. *Panax ginseng* is the most valuable and well-known tonic drug in traditional Chinese medicine, since it contains a significant number of biologically active substances that have antioxidant, antimicrobial, antitumor and anti-inflammatory effects. The purpose of this study is to optimize the extraction parameters for the extraction of biologically active compounds from callus and root cultures of *Panax ginseng*, using different types of solvents. In the course of the work, optimal conditions for the cultivation of the callus and root culture of *Panax ginseng* were established: nutrient media were selected for the callus culture of *Panax ginseng*, which formed a denser callus culture, a strain of *Agrobacterium rhizogenes* was established for the root culture, which contributes to the effective transplantation of *Panax ginseng* roots. According to the obtained data, the working parameters of extraction were determined: acetone is an organic solvent for the *Panax ginseng* callus culture, diethyl ether is for the root culture, the hydromodule of all cell cultures was 1:10, the extraction time for the *Panax ginseng* callus culture was 360 min, for the root culture-60 min, the extraction temperature of the *Panax ginseng* callus and root culture was 50 °C. The total content of caffeic acid, rutin, ecdisterols, mangiferin, quercetin, flavonoglycosides, apigenins, codonopsin, cardiofoline and coleofolide was estimated using the TLC method. A high content of rutin (2.23 ± 0.11 mg/kg) was noted for extracts of the callus culture of *Panax ginseng*, and for extracts of the root culture of *Panax ginseng* - apigenin (12.30 ± 0.62 mg/kg). In the case of the HPLC method, organic acids were found in the extracts. Extracts of callus and root cultures of *Panax ginseng* contained the maximum amount of fumaric acid (0.36 ± 0.02 and 0.85 ± 0.05 mg/kg).

Keywords: extraction, callus, cell culture, medicinal plant, biological active substances, biomass.

Acknowledgments: The research was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of the Federal Program "Research in Priority Directions for the Development of the Russian Science and Technology Complex for 2014-2020", agreement No. 075-02-2018-223, November 26, 2018, and agreement No. 075-15-2019-1362, June 14, 2019 (project identification number: RFMEFI57718X0285).

For citation: Fedorova, A. M., Loseva, A. I., Dyshlyuk, L. S. & Minina, V. I. (2021). Optimization of extraction of active substances of callus and root cultures of *Panax ginseng*. *Polzunovskiy vestnik*, (4), 60-69. (In Russ.). doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.04.009.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные растения и травы применялись в системе здравоохранения во всем мире со времен человеческой цивилизации [1]. Лекарственные свойства растений обусловлены биологически активными веществами (БАВ), присутствующими в различных частях растений, известные как вторичные метаболиты [2]. Они дифференцированно распределены среди ограниченных таксономических групп в преде-

лах растительного царства. Из двух типов метаболитов, первичных и вторичных, производимых растениями, последний включает алкалоиды, фенолы, флавоноиды, стероиды, дубильные вещества и терпены [3]. Большинство растений обладают одним или несколькими целебными свойствами, а именно: антибактериальными, антиоксидантными, противогрибковыми, противовирусными, противоопухолевыми и другими [4, 5]. Из довольно широкого спектра растительного сырья *Panax ginseng* является знаме-

нитым лекарственным растением, который сочетается в себе такие свойства [6]. На протяжении последних лет растет интерес к препаратам на основе *Panax ginseng*, в результате возникает экологическая проблема, которая подразумевает почти полное исчезновение дикоросов *Panax ginseng*. Так, например, в Сибирском федеральном округе дикорастущие формы *Panax ginseng* подвергаются массовому уничтожению, даже молодые корни дикороса, которые не достигли нескольких грамм. В результате этого *Panax ginseng* был включен в Красную книгу [7]. Следовательно, использование клеточных культур лекарственных растений становится довольно актуальным.

Технология культивирования растительных тканей оказалась потенциальной альтернативой для производства желательных биоактивных компонентов из растений, для получения достаточного количества необходимого растительного материала и для сохранения видов, находящихся под угрозой исчезновения [8]. Различные системы культивирования растительных тканей были тщательно изучены для улучшения и усиления производства БАВ из разнообразных лекарственных растений [9]. Растительные клетки являются тотипотентными, то есть клетки в культуре могут вырабатывать те же метаболиты, что и интактные растение [10, 11]. Различные стратегии, использующие систему культивирования *in vitro*, были широко изучены для улучшения производства БАВ [12]. Несколько типов клеточной культуры используются для получения желаемых метаболитов, таких как каллус, клеточная суспензия, трансформированные клетки и органы [13].

Корни лекарственного растения *Panax ginseng* уже около 2000 лет являются ценным и важным средством народной медицины в странах Восточной Азии, таких как Китай, Корея и Япония. Род «*Panax*» происходит от слова «панация», что означает лечение от всех болезней и долголетие, физическая сила и стойкость. Главными активными компонентами *Panax ginseng* являются гинзенозиды, полисахариды, пептиды, полиацетиленовые спирты, органические кислоты, витамины, макро- и микроэлементы [14]. Гинзенозиды, группы сапонинов с тритерпеноидной даммарной структурой, являются часто изучаемыми БАВ *Panax ginseng* [15]. Фармакологические эффекты женьшеня были продемонстрированы при раке, сахарном диабете, сердечно-сосудистой, иммунной, центральной нервной системах, включая антистрессовую и антиоксидантную активность [16].

Вследствие положительных качеств лекарственного растения *Panax ginseng* растет инте-

рес в производстве экстрактов на его основе. С помощью экстрагирования происходит разрушение некоторых компонентов растительных клеток, в результате чего растворенные БАВ переносятся в экстрагент [17]. Существует небольшая разновидность растворителей для экстракции. Одни растворители являются полярными, к ним можно отнести воду или глицерин, такие растворители способны извлекать гликозиды, сапонины, органические кислоты и т.д. [18]. Другие растворители относятся к группе малополярной (этиловый спирт). Данная группа растворителей способна извлекать такие БАВ, как жиры, флавоноиды, эфирные масла. И к последней группе относят неполярные растворители – это хлороформ, гексан и др. Эти растворители способны извлекать воски, алколойды и сапогенины [19]. Процесс экстракции также разнообразен: мацерация, паровая или гидродистилляция, прессование, отвар, настой, перколяция и экстракция Сокслета [20].

Исходя из вышесказанного, главной целью исследования является установление рабочих параметров экстрагирования БАВ каллусных и корневых культур *Panax ginseng* и идентификация полученных БАВ.

МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали высушенную биомассу каллусных и корневых культур *Panax ginseng*.

Для получения каллусных культур *Panax ginseng* использовали следующую методику. На начальной стадии образцы растения *Panax ginseng* промывали детергентом и подвергали стерилизации. Для этого образцы помещали в 0,1 % раствор хлорида ртути (II) на 1–2 мин. Далее материал подвергали двукратному отмыванию в течение 20–25 мин в стерильной дистиллированной воде. Всю поверхность листа *Panax ginseng* разделяли на листовые пластинки скальпелем на отдельные сегменты с размером 6х6 мм. Данные сегменты применяли в качестве эксплантов, которые затем помещали на питательную агаризованную среду. Для проращивания эксплантов использовали среды с минеральной основой Мурасиге-Скуга (MS), Гамборга (B5), и Шенка Хильдебрандта (SH) с некоторым внесением гидролизата казеина (0,60 г/л), мио-инозитола (0,15 г/л), сахарозы (2–3 %), и агара (0,3–0,5 %) [21]. В ходе исследования использовали 5 вариантов сред, которые отличались минеральным и гормональным составом (кинетин, 6-БАП, НУК, 2, 4-Д).

В таблице 1 представлены все варианты питательных сред для культивирования куллу-

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КАЛЛУСНЫХ И КОРНЕВЫХ КУЛЬТУР *PANAX GINSENG*

сных культур *Panax ginseng*. Процесс культивирования продолжался в течение 30 дней в стерильных условиях в темных помещениях при температуре 25 ± 1 °С и относительной влажности воздуха 65–70 %.

Таблица 1 – Состав питательных сред для культивирования каллусных культур *Panax ginseng*

Table 1 – Composition of nutrient media for cultivation of *Panax ginseng* callus cultures

Компоненты	Питательные среды на 1 л дистиллированной воды				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Минеральная основа	MS	MS	MS	B5	SH
Сахароза, г	30	30	30	30	30
Fe-ЭДТА, мл	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Гидролизат казеина, г	–	–	0,60	0,60	–
Тиамин, мг	0,10	0,10	0,20	0,10	0,20
Пиродоксин, мг	0,10	0,10	–	0,10	–
Никотиновая кислота, мг	0,50	–	0,50	0,50	–
Кинетин, мг	–	–	0,50	–	0,30
Мио-инозит, г	0,15	0,15	–	–	0,15
6-БАП	0,53	1,04	1,55	1,00	0,20
НУК	1,00	2,00	–	3,00	2,00
2,4-Д	2,00	–	–	–	–
Агар, г	20,0 0	20,0 0	20,0 0	20,0 0	20,0 0
pH	5,6– 5,7	5,6 –5,7	5,6– 5,7	5,6 –5,7	5,6 –5,7

Получение корневых культур *Panax ginseng* осуществлялось по следующей методике. На первых этапах применяли стерилизацию семян лекарственного растения *Panax ginseng*. Процесс стерилизации проводился путем погружения семян на 1–2 мин в 96 % этиловый спирт, затем семена подвергали высушиванию на фильтровальной бумаге в стерильном ламинарном боксе. Дальнейшая стерилизация семян проходила в присутствии диоксида в течение 10–15 мин. Затем семена трехкратно промывали дистиллированной водой и проращивали их на среде Стрита (AS) [22] в темном помещении при температуре 25 ± 1 °С. Для дальнейшей работы использовали проростки семян растения *Panax ginseng*, а именно листья, которые были получены после 2–3 недельной инкубации. Для трансформации листьев применяли два вида немодифицированных штаммов почвенных агробактерий *Agrobacterium rhizogenes* A4 и *Agrobacterium rhizogenes* 15834 Swiss. Данные штаммы выращивали на питательной среде YEB следующего состава (г/л): пептон – 5,0; дрожжевой экстракт 1,0; сахароза – 5,0; $MgCl_2$ –

0,5 в течение 24 ч при 23 ± 1 °С на качалке при определенной скорости вращения 90 об/мин. Для получения корневых культур *in vitro* лекарственного растения *Panax ginseng* опирались на методику трансформации эксплантов, представленной в работе Е.В. Амброса и его коллег [23]. Суть методики заключалась в том, что для трансформации экспланты протыкали стерильной иглой и помещали на питательную среду B5 [24], содержащую суспензию ($OD_{600} = 0,4$) агробактерии. Через 24–48 ч выдерживания в бактериальной суспензии образовавшиеся экспланты промывали стерильной дистиллированной водой, затем удаляли излишки влаги стерильной фильтровальной бумагой и помещали на твердую питательную среду B5 (рН среды $5,5–5,6 \pm 0,2$), которая уже должна содержать в своем составе антибиотик – цефотаксим («Клафоран», Великобритания) в концентрации 500 мг/л. Данный антибиотик применялся для удаления остатков агробактерий. Цикл культивирования составлял 5 недель. Культивирование корневой культуры *Panax ginseng* осуществлялось при относительной влажности 60–70 %, в темноте при температуре 26 ± 1 °С.

Извлечение БАВ из лекарственного растения *Panax ginseng* осуществлялось следующим образом. Исходную навеску сухого растительного сырья в количестве $3,0 \pm 0,001$ г заливали растворителем в количестве 40 мл. С целью скрининга наиболее подходящего метода экстракции для получения БАВ из экстрактов каллусных и корневых культур *Panax ginseng* предварительно изучили эффективность различных растворителей (метанол, этилацетат, ацетон, изопропанол, диэтиловый эфир, 70 % этанол). Приготовленные суспензии помещали в шейкер на 1 ч. Затем осуществляли фильтрацию полученных экстрактов через бумажные фильтры «Желтая лента» (Россия, Сартогосм) с размером пор 8–12 мкм. После фильтрации экстракты дополнительно центрифугировали при 3800 об/мин для удаления взвешенных взвесей.

Для определения фракционного состава экстрактов использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) [25]. На первом этапе с помощью стеклянного капилляра наносили небольшие пятна на специальную хроматографическую пластину. Затем пластину помещали в камеру для ТСХ. Также для количественного определения БАВ в экстрактах каллусных и корневых культур *Panax ginseng* использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Schimadzu LC-20AD, Япония) [26]. Диапазон детектирования для дионо-матричного детектора составляет 180–900 нм, скорость потока элюэнта равнялась 1 мл/мин. Для разделения веществ использовалась обра-

ценно-фазная колонка Phenomenex 250 мм 2,5 мм, с размером частиц 25 мкм, сорбент силикагель модифицированный С-18, с фенильным эндкапированием.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 представлен внешний вид полученных каллусных культур *Panax ginseng*.



Рисунок 1 – Каллусные культуры лекарственного растения *Panax ginseng*, выращенные на питательной среде № 2 (а) и № 4 (б)

Figure 1 - Callus cultures of the medicinal plant *Panax ginseng* grown on nutrient medium № 2 (a) and № 4 (b)

Результаты трансформации лекарственного растения *Panax ginseng* различными штаммами *Agrobacterium rhizogenes* представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Эффективность трансформации *Panax ginseng* штаммами *Agrobacterium rhizogenes*

Table 2 - Efficiency of transformation of *Panax ginseng* by *Agrobacterium rhizogenes* strain

Вид штамма <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Общее число эксплантов, используемых в экспериментах, шт	Доля эксплантов с корнями, %
A4	75	40,0
15834 Swiss	75	26,7

Для установления эффективности различных растворителей были определены следующие значения выхода сухих веществ в экстрактах каллусной и корневой культуры *Panax ginseng* (рисунок 2).

На рисунках 3 и 4 представлены результаты анализа оптимизации параметров экстракции БАВ каллусных и корневых культур *Panax ginseng*.

В ходе исследования был установлен температурный режим процесса экстрагирования комплекса БАВ каллусной и корневой культуры *Panax ginseng* (рисунок 4).

Изучение фракционного состава экстрактов каллусной и корневой культуры *Panax ginseng* осуществлялось с помощью ТСХ.

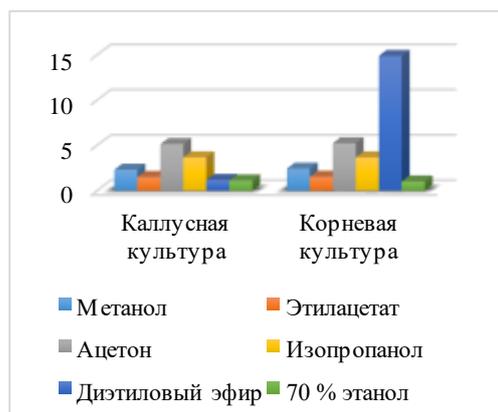


Рисунок 2 – Эффективность извлечения БАВ из биомассы клеточных культур *Panax ginseng* различными растворителями

Figure 2 - Efficiency of extraction of BAS from the biomass of *Panax ginseng* cell cultures with various solvents

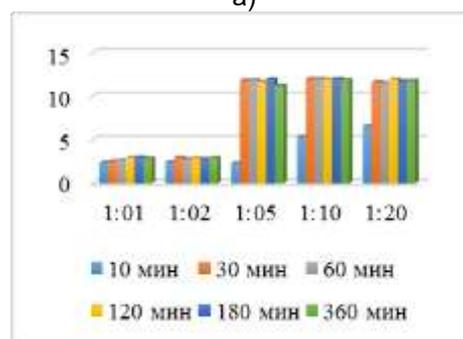
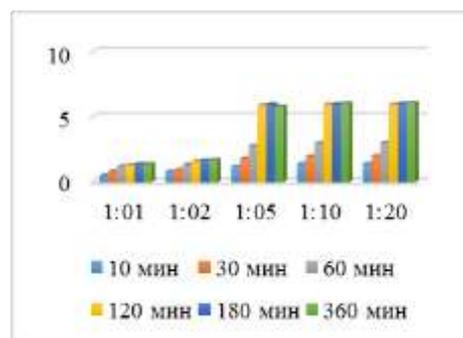


Рисунок 3 – Количественный выход (%) экстракта каллусной (а) и корневой (б) культуры *Panax ginseng* в зависимости от начальной массы сырья к объему растворителя

Figure 3 - Quantitative yield (%) of the extract of the callus (a) and root (b) cultures of *Panax ginseng*, depending on the initial mass of the raw material to the volume of the solvent

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КАЛЛУСНЫХ И КОРНЕВЫХ КУЛЬТУР *Panax ginseng*

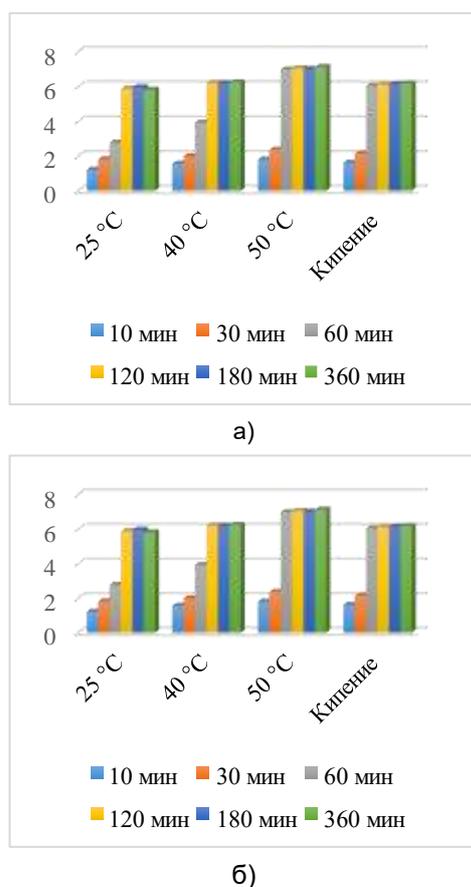


Рисунок 4 – Характеристика температурного режима процесса извлечения БАВ из каллусной (а) и корневой (б) культуры *Panax ginseng*

Figure 4 - Characteristics of the temperature regime of the BAS extraction process from the callus (a) and root (b) cultures of *Panax ginseng*

Анализ качественного состава экстрактов показал, что наиболее перспективными с точки зрения промышленного и технологического получения являются следующие БАВ: кофейная кислота, рутин, сумма экидистеронов, мангиферин, кверцетин, сумма флавоногликозидов, апигенин, кодонопсин, кардиофолин, колеофолид. Данные соединения вносят наибольший вклад в комплекс БАВ экстрактов, для них уже установлена биологическая активность, а их технологическое получение рентабельно, поскольку позволяет реализовать данные соединения на уже имеющемся рынке, тем самым снижая экономический риск. Таким образом, перечисленные причины определили выбор данных соединений для дальнейшего изучения их количественного содержания в каллусных и корневых культурах *Panax ginseng*. В таблице 3 представлены результаты исследования содержания БАВ, полученных из экстрактов каллусной и корневой культуры *Panax ginseng*.

POLZUNOVSKIY VESTNIK № 4 2021

Таблица 3 – Результаты исследования содержания индивидуальных БАВ, полученных из экстрактов каллусной и корневой культуры *Panax ginseng*

Table 3 - Results of the study of the content of individual BAS obtained from extracts of callus and root culture of *Panax ginseng*

Наименование культуры <i>Panax ginseng</i>	Содержание БАВ, мг/кг									
	Кофейная кислота	РУТИН	Сумма экидистеронов	Мангиферин	Кверцетин	Сумма флавоногликозидов	Апигенин	Кодонопсин	Кардиофолин	Колеофолид
Каллусная культура	1,32± 0,07	2,23± 0,11	0,50± 0,03	1,65± 0,22	1,32± 0,07	0,87± 0,04	2,30± 0,12	1,17± 0,06	1,12± 0,06	0,12± 0,01
Корневая культура	2,32± 0,12	10,23± 0,51	3,50± 0,18	5,24± 0,26	11,32± 0,57	11,87± 0,59	12,30± 0,62	12,17± 0,61	12,12± 0,61	10,12± 0,51

Дополнительно с помощью метода ВЭЖХ в экстрактах каллусной и корневой культуры *Panax ginseng* определяли содержание органических кислот: фумаровой, молочной и пировиноградной. Результаты определения органических кислот, полученных из экстрактов каллусных и корневых культур *Panax ginseng*, представлены рисунке 5.

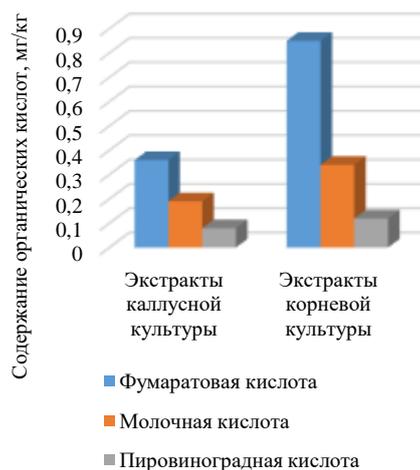


Рисунок 5 – Количественное содержание органических кислот в экстрактах, полученных из высушенной биомассы каллусных и корневых культур *Panax ginseng*

Figure 5 - Quantitative content of organic acids in extracts obtained from dried biomass of callus and root cultures of *Panax ginseng*

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментальных работ, направленных на определение факторов, влияющих на интенсивность каллусогенеза *Panax ginseng*, установлено, что большинство полученных линий култусных культур имело плотную консистенцию и низкую степень оводненности клеток (соотношение сухая масса клеток / сырая масса клеток было в диапазоне 1/8–1/10). Цвет культур желтоватый и желтовато-бурый, реже образовывался более рыхлый светлый каллус. Анализ результатов по каллусогенезу лекарственного растения *Panax ginseng* свидетельствует о том, что при использовании питательных сред № 2 с добавлением гормонов роста НУК в количестве 2,00 мг и 6–БАП в количестве 1,04 мг и № 4 с добавлением гормонов 6–БАП – 1,00 мг и НУК – 3,00 мг наблюдается образование плотной каллусной культуры со стабильной фазой роста (рисунок 1). При применении питательных сред № 1, № 3, и № 5 наблюдалось эффективное каллусообразование, но в процессе культивирования отмечалась гибель экспланта.

Анализ результатов трансформации лекарственного растения *Panax ginseng*, представленный в таблице 2, показывает, что экспланты образуют корневые культуры *in vitro* с разной интенсивностью при применении различных штаммов *Agrobacterium rhizogenes*. Так, на примере 75 эксплантов показано, что наиболее эффективная трансформация корней *Panax ginseng* происходит при использовании штамма *Agrobacterium rhizogenes* A4.

Исходя из результатов исследования, представленных на рисунке 2, выбраны органические растворители для каждой клеточной культуры. Для получения экстрактов каллусной культуры *Panax ginseng* ацетон является подходящим растворителем, так как при использовании данного растворителя выход экстракта был максимальным (5,24±0,52 %) в сравнении с другими растворителями. Максимальный выход экстракта корневой культуры *Panax ginseng* составил при использовании диэтилового эфира в размере 14,87±1,49 %

По полученным результатам анализа продолжительности экстракции каллусной культуры *Panax ginseng* (рисунок 3 (А)) можно сказать, что максимальный выход экстракта наблюдался при соотношении массы начального сырья к объему растворителя (гидромодуль) 1:10 в течение 360 мин (6,04±0,60 %). В результате исследования установлено, что дальнейшее увеличение временного значения является нецелесообразным. Данные, приведенные на рисунке 3 (Б), говорят о том, что высокий выход комплекса

БАВ корневой культуры *Panax ginseng* отмечается при продолжительности от 30 до 180 мин при гидромодуле 1:10. Так, максимальный выход БАВ экстракта корневой культуры *Panax ginseng* при комнатной температуре составил 11,98±1,20 %.

Результаты оптимизации температурного режима экстракции каллусной культуры *Panax ginseng* (рисунок 4 (А)) говорят о том, что максимальный выход экстракта наблюдался при температурном режиме 50 °С в течение 360 мин. При таких установленных параметрах выход экстракта каллусной культуры *Panax ginseng* составил 7,12±0,71 %. Из рисунка 4 (Б) следует, что максимальный выход комплекса БАВ корневой культуры *Panax ginseng* (12,40±1,24 %) наблюдается при температуре 50 °С в течение 60 мин.

Результаты изучения содержания индивидуальных БАВ, выделенных из экстрактов каллусных и корневых культур *Panax ginseng*, свидетельствуют о том, что основными веществами, содержащимися в экстрактах, являются апигенин, рутин, кондонопсин. Для экстрактов каллусных культур *Panax ginseng* рутин является основным активным соединением, так его содержание находится в рекордном количестве (2,23±0,11 мг/кг). Высокое содержание апигенина отмечено для экстрактов корневой культуры *Panax ginseng*, его количество составляет в размере 12,30±0,62 мг/кг. Анализ результатов, представленных в таблице 3, показал, что содержание БАВ, экстракта корневой культуры *in vitro* лекарственного растения *Panax ginseng*, значительно превышает содержание БАВ экстрактов каллусной культуры *Panax ginseng*.

Количественное содержание органических кислот в экстрактах корневой культуры *Panax ginseng* превышает содержание органических кислот в экстрактах каллусной культуры *Panax ginseng* (рис. 5). Так, фумаратовая кислота содержится в большей степени в экстрактах каллусных и корневых культурах *Panax ginseng*, в экстрактах каллусной культуры *Panax ginseng* её содержание составляет 0,36±0,02 мг/кг, а в экстрактах корневой культуры 0,85±0,05 мг/кг.

ВЫВОДЫ

В ходе проведенного исследования на первом этапе установлены условия культивирования каллусных и корневых культур *Panax ginseng*. Для каллусогенеза *Panax ginseng* выбраны питательные среды № 2 и № 4. Для получения корневой культуры *Panax ginseng* выбран штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4, так как при таком виде штамма происходила

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КАЛЛУСНЫХ И КОРНЕВЫХ КУЛЬТУР *PANAX GINSENG*

эффективная трансформация корней *Panax ginseng*. Для установления рабочих параметров экстракции каллусной и корневой культуры *Panax ginseng* были выбраны оптимальные условия экстрагирования. Так, органическим растворителем для каллусной культуры *Panax ginseng* является ацетон, для корневой – диэтиловый эфир, гидромодуль все всех клеточных культур составил 1:10, продолжительность экстракции для каллусной культуры *Panax ginseng* составила 360 мин, для корневой – 60 мин, температурный режим экстракции составил 50 °С. В ходе исследования БАВ при методике ТСХ в экстрактах обнаружено высокое содержание рутина (2,23±0,11 мг/кг) в экстрактах каллусной культуры *Panax ginseng*, а в экстрактах корневой культуры *Panax ginseng* – апегенин был в рекордном количестве (12,30±0,62 мг/кг). Исходя из результатов анализа ВЭЖХ, в экстрактах было отмечено присутствие органических кислот (фурмаровой, молочной и пировиноградной). Так, экстракты каллусных и корневых культур *Panax ginseng* содержали в себе максимальное количество фурмаровой кислоты в объеме 0,36±0,02 и 0,85±0,05 мг/кг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais [Medicinal plants and herbal medicines in Primary Health Care: the perception of the professionals] / G. Mattos [et al.] // Cien Saude Colet. 2018. № 23 (11). P. 3735–3744. doi: 10.1590/1413-812320182311.23572016.
2. Tanahashi T. [Diversity of Secondary Metabolites from Some Medicinal Plants and Cultivated Lichen Mycobionts] // Yakugaku Zasshi. 2017. № 137(12). P. 1443–1482. doi: 10.1248/yakushi.17-00147.
3. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants / Li, Y., [et al.] // Plant Physiol Biochem. 2020. № 148. P. 80–89. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
4. Buyel J.F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents // Biotechnol Adv. 2018. № 36(2). P. 506–520. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.02.002.
5. Федорова А.М., Милентьева И.С. Обогащение молочной сыворотки биологическими активными веществами с антиоксидантными свойствами *Thymus Vulgaris* L. и *Panax Ginseng* С.А. Мей // Современные достижения биотехнологии. 2021. С. 318–322.
6. Biotic elicitation of ginsenoside metabolism of mutant adventitious root culture in *Panax ginseng* / K.C. Le [et al.] // Appl Microbiol Biotechnol. 2018. № 102(4). P. 1687–1697. doi: 10.1007/s00253-018-8751-9.
7. Гапонов В.В. Перспективы охраны и использования дикорастущего женьшеня (*Panax Ginseng* С. А. Мей.) в России // Проблемы региональной экологии. 2009. № 6. С. 57–63.
8. Callus cultures of thymus vulgaris and trifolium pratense as a source of geroprotectors / L.S. Dyshlyuk [et al.] // Food Processing: Techniques and Technology. 2021. № 2. С. 423–432. DOI: 10.21603/2074-9414-2021-2-423-432.
9. Pant B. Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants // Adv Exp Med Biol. 2014. № 808. P. 25–39. doi: 10.1007/978-81-322-1774-9_3.
10. Secondary metabolites in in vitro cultures of siberian medicinal plants: content, antioxidant properties, and antimicrobial characteristics / I.S. Milentyeva [et al.] // Foods and Raw Materials. 2021. № 1. С. 153–163.
11. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends / R. Eibl [et al.] // Appl Microbiol Biotechnol. – 2018. № 102(20). P. 8661–8675. doi: 10.1007/s00253-018-9279-8.
12. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures / M. Halder [et al.] // Eng Life Sci. 2019. № 19(12). P. 880–895. doi: 10.1002/elsc.201900058.
13. Srivastava S., Srivastava A.K. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites // Crit Rev Biotechnol. 2007. № 27(1). P. 29–43. doi: 10.1080/07388550601173918.
14. Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds / T.K. Yun [et al.] // J Korean Med Sci. 2001. № 16. P. 6–18. doi: 10.3346/jkms.2001.16.S.S6.
15. Advances on hormone-like activity of *Panax ginseng* and ginsenosides / M. Tian [et al.] // Chin J Nat Med. 2020. № 18 (7). P. 526–535. doi: 10.1016/S1875-5364(20)30063-7.
16. Mancuso C., Santangelo R. *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*: From pharmacology to toxicology // Food Chem Toxicol. 2017. 107. P. 362–372. doi: 10.1016/j.fct.2017.07.019.
17. Mesgarzadeh I., Akbarzadeh A.R., Rahimi R. Surface-Active Properties of Solvent-Extracted *Panax ginseng* Saponin-Based Surfactants // Journal of Surfactants and Detergents. 2017. № 20(3). P. 609–614. doi:10.1007/s11743-017-1940-1.
18. Optimization of extraction of polyphenolic compounds from medicinal lungwort (*Pulmonaria Officinalis* L.) / L.S. Dyshlyuk [et al.] // Journal of Pharmaceutical Research International. 2020. № 24. С. 36–45. DOI: 10.9734/JPRI/2020/v32i2430807.
19. Optimization of solvent extraction of shea butter (*Vitellaria paradoxa*) using response surface methodology and its characterization / E.O. Ajala [et al.] // J Food Sci Technol. 2016. № 53(1). P. 730–8. doi: 10.1007/s13197-015-2033-7.
20. Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials / P. Putnik [et al.] // Foods. 2018. № 7(7). P. 106. doi: 10.3390/foods7070106.
21. Получение и изучение каллусных культур клеток женьшеня вьетнамского *Panax Vietnamensis* Ha Et Grushv / Г.И. Соболева [и др.] // Вестник северо-восточного федерального университета им. М.К. Ам-

мосова. 2018. № 3(65). С. 39–49. doi: 10.25587/SVFU.2018.65.14067.

22. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения // Физиология растений. 2011. № 5. С. 787–796.

23. Адаптивный ответ регенерантов *Fragaria × ananassa* Duch. под действием механокомпозиата на основе аморфного диоксида кремния и флавоноидов зелёного чая в условиях *in vitro* / Е.В. Амброс [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 4. С. 116–122. doi: 10.25750/1995-4301-2019-4-116-122.

24. Gamburg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley *Can J Biochem.* 1968. № 46(5). P. 417–21. doi: 10.1139/o68-063. PMID: 5658143.

25. ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматографи. Фармакопея.рф (pharmасороеia.ru) (дата обращения 27.09.2021).

26. ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография». Фармакопея.рф (pharmасороеia.ru) (дата обращения 27.09.2021).

Информация об авторах

А. М. Федорова – младший научный сотрудник лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков НИУ, ассистент кафедры бионанотехнологии Кемеровского государственного университета.

А. И. Лосева – кандидат технических наук, начальник Управления научно-издательской деятельности Кемеровского государственного университета.

Л. С. Дышлюк – доктор технических наук, профессор кафедры бионанотехнологии, зав. лабораторией биотестирования природных нутрицевтиков НИУ Кемеровского государственного университета.

В. И. Минина – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой генетики и фундаментальной медицины Кемеровского государственного университета.

REFERENCES

1. Mattos, G., Camargo, A. (2018). Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais [Medicinal plants and herbal medicines in Primary Health Care: the perception of the professionals]. *Cien Saude Colet*, (23(11)) 3735-3744. doi: 10.1590/1413-812320182311.23572016.

2. Tanahashi, T. (2017). [Diversity of Secondary Metabolites from Some Medicinal Plants and Cultivated Lichen Mycobionts]. *Yakugaku Zasshi.* (137(12)). 1443-1482. doi: 10.1248/yakushi.17-00147.

3. Li Y, Kong D. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary me-

tabolites in medicinal plants. *Plant Physiol Biochem.* (148) 80-89. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.

4. Buyel, J.F. (2018). Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnol Adv.* (36(2)) 506-520. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.02.002.

5. Fedorova, A.M. & Milentyeva, I.S. (2021). Enrichment of whey with biologically active substances with antioxidant properties of *Thymus Vulgaris* L. And *Panax Ginseng* C.A. Mey. *Modern achievements of biotechnology. Global challenges and current problems of processing and use of secondary raw materials of the agro-industrial complex of Russia.* 318-322. (In Russ.).

6. Le, K.C., Im, W.T. (2018). Biotic elicitation of ginsenoside metabolism of mutant adventitious root culture in *Panax ginseng*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (102(4)) 1687-1697. doi: 10.1007/s00253-018-8751-9.

7. Gaponov, V.V. (2009). Prospects for the protection and use of wild ginseng (*Panax Ginseng* C. A. Mey.) in Russia. *Problems of regional ecology.* (6) 57-63. (In Russ.).

8. Dyshlyuk, L.S., Fedorova, A.M. (2021). Callus cultures of *thymus vulgaris* and *trifolium pratense* as a source of geroprotectors *Food Processing: Techniques and Technology.* (2) 423-432. doi: 10.21603/2074-9414-2021-2-423-432.

9. Pant, B. (2014). Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. *Adv Exp Med Biol.* (808) 25-39. doi: 10.1007/978-81-322-1774-9_3.

10. Milentyeva, I.S., Le, V.M. (2021). Secondary metabolites in *in vitro* cultures of siberian medicinal plants: content, antioxidant properties, and antimicrobial characteristics. *Foods and Raw Materials.* 2021. (1) 153-163.

11. Eibl, R, Meier, P. (2018). Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol.* (102(20)) 8661-8675. doi: 10.1007/s00253-018-9279-8.

12. Halder, M., Sarkar, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci.* (19(12)) 880-895. doi: 10.1002/elsc.201900058.

13. Srivastava, S. & Srivastava, A.K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol.* (27(1)) 29-43. doi: 10.1080/07388550601173918.

14. Yun, T.K., Lee, Y.S. (2001). Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds. *J Korean Med Sci.* (16) 6-18. doi: 10.3346/jkms.2001.16.S.S6.

15. Tian, M., Li, L.N. (2020). Advances on hormone-like activity of *Panax ginseng* and ginsenosides. *Chin J Nat Med.* (18(7)) 526-535. doi: 10.1016/S1875-5364(20)30063-7.

16. Mancuso, C. & Santangelo, R. (2017). *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*: From pharmacology to toxicology. *Food Chem Toxicol.* (107) 362-372. doi: 10.1016/j.fct.2017.07.019.

17. Mesgarzadeh, I., Akbarzadeh, A.R. (2017). Surface-Active Properties of Solvent-Extracted *Panax ginseng* Saponin-Based Surfactants. *Journal of Sur-*

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КАЛЛУСНЫХ И КОРНЕВЫХ КУЛЬТУР *PANAX GINSENG*

factants and Detergents, (20(3)) 609-614. doi:10.1007/s11743-017-1940-1.

18. Dyshlyuk, L.S., Fedorova, A.M. (2020). Optimization of extraction of polyphenolic compounds from medicinal lungwort (*Pulmonaria Officinalis* L.). *Journal of Pharmaceutical Research International*. (24) 36-45. doi: 10.9734/JPRI/2020/v32i2430807.

19. Ajala, E.O., Aberuagba, F. (2016). Optimization of solvent extraction of shea butter (*Vitellaria paradoxa*) using response surface methodology and its characterization. *J Food Sci Technol*. (53(1)) 730-8. doi: 10.1007/s13197-015-2033-7.

20. Putnik, P., Lorenzo, J.M. (2018). Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods*. (7(7)) 106. doi: 10.3390/foods7070106.

21. Sobolkova, G.I., Kochkin, D.V. (2018). Obtaining and studying callus cultures of Vietnamese ginseng cells *Panax Vietnam-sis* Ha Et Grushv. *Bulletin of the Northeastern Federal University named after M.K. Ammosov*. (3(65)). 39-49. doi: 10.25587/SVFU.2018.65.14067. (In Russ.).

22. Kuzovkina, I.N., Vdovitchenko, M.Yu. (2011). Genetically transformed roots as a model for studying the physiological and biochemical processes of the root system of a whole plant. *Plant Physiology*, (5) 787-796. (In Russ.).

23. Ambros, E.V., Kotsupiy, O.V. (2019). Adaptive response of regenerants *Fragaria ananassa* Duch. under the action of mechanocomposites based on amorphous silicon dioxide and green tea flavonoids under in vitro conditions. *Theoretical and ap-*

plied ecology. (4) 116-122. doi: 10.25750/1995-4301-2019-4-116-122. (In Russ.).

24. Gamborg, O.L. & Eveleigh, D.E. (1968). Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can J Biochem*. (46(5)) 417-21. doi: 10.1139/o68-063. PMID: 5658143.

25. OFFICE.1.2.1.2.0003.15 Thin-layer chromatography / Pharmacopoeia.rf (pharmacopoeia.ru) (In Russ.).

26. OFFICE.1.2.1.2.0005.15 High-performance liquid chromatography / Pharmacopoeia.rf (pharmacopoeia.ru) (In Russ.).

Information about the authors

A. M. Fedorov - Junior Researcher of LBPN NIU, Assistant Professor of the Department of "Bionanotechnology" of the Kemerovo State University.

A. I. Loseva - Candidate of Technical Sciences, Head of the Department of Scientific and Publishing Activities of the Kemerovo State University.

L. S. Dyshlyuk - Doctor of Technical Sciences, Professor of the Department of Bionanotechnology, Head of the laboratory of Natural Nutraceutical Biotesting Laboratory of the Kemerovo State University.

V. I. Minina - Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Genetics and Fundamental Medicine of Kemerovo State University.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 01.11.2021; одобрена после рецензирования 18.11.2021; принята к публикации 29.11.2021.

The article was received by the editorial board on 1 Nov 21; approved after reviewing on 18 Nov 21; accepted for publication on 29 Nov 21.