

Изобретение относится к технологии получения и выращивания пересадочных культур растительных тканей, например, культура ткани женьшеня (*Panax ginseng*), содержащих в качестве продуцентов биологически активные вещества, используемые в медицинской, микробиологической и других отраслях промышленности.

Известен способ культивирования ткани лекарственных растений на питательной среде, содержащей неорганические соли, витамины, аденин сульфат, НУК, кинетин, 2,4-Д-мезоинозит, глицин, сахарозу и др. [1].

Эта среда обеспечивает увеличение кратности, прироста биомассы многих лекарственных растений в среднем в 10 раз через 8-10 недель культивирования, что для промышленного выращивания является мало эффективным.

Наиболее близким к техническому решению заявляемого изобретения является способ культивирования ткани женьшеня [2] на питательной среде по Мурасиге и Скугу, которая содержит компоненты в следующем соотношении, мг/л:

|                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Макроэлементы по Мурасиге-Скугу   | $4,1 \cdot 10^3$ - $4,8 \cdot 10^3$   |
| Микроэлементы по Мурасиге-Скугу   | 37,0-39,0                             |
| Кинетин                           | 0,5-1,5                               |
| Тиаминхлорид                      | 0,3-0,6                               |
| $\alpha$ – Нафтилуксусная кислота | 1,0-3,0                               |
| Мезоинозит                        | 60-90                                 |
| Хелат железа                      | 4,0-6,0                               |
| Гидролизат казеина                | $0,2 \cdot 10^3$ - $0,6 \cdot 10^3$   |
| Сахароза                          | $25,0 \cdot 10^3$ - $35,0 \cdot 10^3$ |
| Агар-агар                         | $5,0 \cdot 10^3$ - $8,0 \cdot 10^3$   |
| Вода                              |                                       |

дистиллированная До 1л

и родиолы розовой на модифицированной питательной среде [2].

Недостатком данной среды является дефицит гидролизата казеина, сахарозы и низкий выход биомассы, что в значительной степени затрудняет организацию крупнотоннажного промышленного производства.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа культивирования растительных тканей, путем использования смеси аминокислотной гид-ролизатной (САГ) в качестве источника азотного питания, а в качестве углеродистого питания - сахара-сырца, чем обеспечивается увеличение выхода биомассы и за счет этого удешевляется процесс производства культуры ткани женьшеня.

Поставленная задача решается тем, что в способе культивирования растительных тканей, включающем помещение ткани на питательную среду, содержащую макро- и микроэлементы по Мурасиге-Скугу, кинетин, тиаминхлорид,  $\alpha$  – нафтилуксусную кислоту, мезоинозит, хелат железа, источники азотного и углеродного питания, агар-агар, воду, выращивание и съем биомассы, согласно изобретению, в питательную среду вводят в качестве источника азотного питания смесь аминокислот гидролизатную, а в качестве углеродного питания - сахар-сырец, при этом выращивание осуществляют на среде при следующем соотношении компонентов, мг/л:

|                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Макроэлементы по Мурасиге-Скугу   | $4,1 \cdot 10^3$ - $4,8 \cdot 10^3$   |
| Микроэлементы по Мурасиге-Скугу   | 37,0-39,0                             |
| Кинетин                           | 0,5-1,5                               |
| Тиаминхлорид                      | 0,3-0,6                               |
| $\alpha$ – Нафтилуксусная кислота | 1,5-2,3                               |
| Мезоинозит                        | 60,0-80,0                             |
| Хелат железа                      | 4,0-6,0                               |
| Смесь аминокислот гидролизатная   | $0,2 \cdot 10^3$ - $0,35 \cdot 10^3$  |
| Сахар-сырец                       | $20,0 \cdot 10^3$ - $30,0 \cdot 10^3$ |
| Агар-агар                         | $7,0 \cdot 10^3$ - $8,0 \cdot 10^3$   |
| Вода                              |                                       |

дистиллированная До 1л

Поставленная цель достигается тем, что культивирование ведут в емкости объемом 200мл на 90мл питательной среды.

Использование смеси аминокислот гид-ролизатной (САГ), представляющей собой комплекс свободных аминокислот с большим содержанием пролина, необходимого растениям для ускорения роста, вместо гидролизата казеина, у которого компоненты связаны между собой пептидными связями, что затрудняет их утилизацию, повышает питательный и стимулирующий эффект азотистого компонента питательной среды.

САГ представляет собой побочный продукт производства индивидуальных L-аминокислот по ТУ 10.16 УССР 40-88.

В настоящее время организовано производство САГ промышленным способом.

Массовая доля L-аминокислот в САГ составляет, %:

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| Лизин                 | 0-1,7    |
| Гистидин              | 0 0,5    |
| Аргинин               | 0-1,2    |
| Аспарагиновая кислота | 0,5-2,5  |
| Треонин               | 46-8,0   |
| Серин                 | 5,6-10,0 |

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Глутаминовая кислота | 05-3,0    |
| Пролин               | 8,5-15,0  |
| Глицин               | 10,0-20,0 |
| Аланин               | 13,0-20,0 |
| Цистин               | 0,5-2,5   |
| Валин                | 7,0-15,0  |
| Метионин             | 0,5-2,0   |
| Изолейцин            | 2,5-8,5   |
| Лейцин               | 10,0-23,0 |
| Тирозин              | 0-1,5     |
| Фенилаланин          | 0-5,0     |
| Оксипролин           | 0-2,0     |

Замена сахарозы на сахар-сырец не сказывается на росте и качестве биомассы, а стоимость питательной среды, при этом удешевляется.

Выращивание биомассы женьшеня и родиолы розовой проводили на питательных средах с различными концентрациями химических компонентов и на разных объемах питательной среды.

Пример 1. Навески компонентов питательной среды растворяют в дистиллированной воде из расчета, мг/л:

|                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| Макроэлементы по          |                   |
| Мурасиге-Скугу            | $4,57 \cdot 10^3$ |
| Микроэлементы по          |                   |
| Мурасиге-Скугу            | 38,22             |
| Кинетин                   | 1,0               |
| Тиаминхлорид              | 0,4               |
| $\alpha$ – Нафтилуксусная |                   |
| кислота                   | 2,0               |
| Мезоинозит                | 80,0              |
| Хелат железа              | 5,0               |
| Гидролизат казеина        | $0,6 \cdot 10^3$  |
| Сахароза                  | $30,0 \cdot 10^3$ |
| Агар-агар                 | $7,5 \cdot 10^3$  |
| Вода                      |                   |
| дистиллированная          | До 1л             |

Питательную среду разливают в банке объемом 200мл по 50мл и стерилизуют в автоклаве для уничтожения микроорганизмов при 0,9-1 ати 15мин. На стерильную питательную среду засевают инокулянтный материал в соотношении 1:50. Цикл выращивания - 30сут. Выход биомассы из одного культивационного сосуда 0,5г на АСВ, или 10г/л питательной среды.

Пример 2. Каллусную ткань женьшеня культивируют аналогично примеру 1 на питательной среде следующего состава, мг/л:

|                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| Макроэлементы по          |                   |
| Мурасиге-Скугу            | $4,57 \cdot 10^3$ |
| Микроэлементы по          |                   |
| Мурасиге-Скугу            | 38,22             |
| Кинетин                   | 1,0               |
| Тиаминхлорид              | 0,4               |
| $\alpha$ – Нафтилуксусная |                   |
| кислота                   | 2,0               |
| Мезоинозит                | 80,0              |
| Хелат железа              | 5,0               |
| Смесь аминокислот         |                   |
| гидролизатная             | $0,3 \cdot 10^3$  |
| Сахар-сырец               | $25,0 \cdot 10^3$ |
| Агар-агар                 | $7,5 \cdot 10^3$  |
| Вода                      |                   |
| дистиллированная          | До 1л             |

Выход биомассы из одного культивационного сосуда составляет 0,68г на АСВ или 13,6г/л питательной среды.

Пример 3. Каллусную ткань женьшеня культивировали аналогично примеру 2 при соотношении инокулюм: среда 1:70.

|                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| Макроэлементы по          |                   |
| Мурасиге-Скугу            | $4,57 \cdot 10^3$ |
| Микроэлементы по          |                   |
| Мурасиге-Скугу            | 38,22             |
| Кинетин                   | 1,0               |
| Тиаминхлорид              | 0,4               |
| $\alpha$ – Нафтилуксусная |                   |
| кислота                   | 2,0               |
| Мезоинозит                | 80,0              |
| Хелат железа              | 5,0               |
| Смесь аминокислот         |                   |
| гидролизатная             | $0,3 \cdot 10^3$  |
| Сахар-сырец               | $25,0 \cdot 10^3$ |
| Агар-агар                 | $7,5 \cdot 10^3$  |

Вода

дистиллированная До 1л

Выход биомассы из одного культивационного сосуда 0,94г на АСВ или 13,6г/л питательной среды.

Пример 4. Каллусную ткань женьшеня культивировали аналогично примеру 2 при соотношении инокулюм: среда 1:90.

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Макроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 4,57 10 <sup>3</sup> |
| Микроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 38,22                |
| Кинетин            | 1,0                  |
| Тиаминхлорид       | 0,4                  |
| α – Нафтилуксусная |                      |
| кислота            | 2,0                  |
| Мезоинозит         | 80,0                 |
| Хелат железа       | 5,0                  |
| Смесь аминокислот  |                      |
| гидролизатная      | 0,3 10 <sup>3</sup>  |
| Сахар-сырец        | 25,0 10 <sup>3</sup> |
| Агар-агар          | 7,5 10 <sup>3</sup>  |

Вода

дистиллированная До 1л

Выход сухой биомассы из одного культивационного сосуда 1,2 или 13,6г/л питательной среды.

Пример 5. Каллусную ткань женьшеня культивировали аналогично примеру 2 при соотношении инокулюм: среда 1:100.

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Макроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 4,57 10 <sup>3</sup> |
| Микроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 38,22                |
| Кинетин            | 1,0                  |
| Тиаминхлорид       | 0,4                  |
| α – Нафтилуксусная |                      |
| кислота            | 2,0                  |
| Мезоинозит         | 80,0                 |
| Хелат железа       | 5,0                  |
| Смесь аминокислот  |                      |
| гидролизатная      | 0,3 10 <sup>3</sup>  |
| Сахар-сырец        | 25,0 10 <sup>3</sup> |
| Агар-агар          | 7,5 10 <sup>3</sup>  |

Вода

дистиллированная До 1л

Выход сухой биомассы 0,9г из одного культивационного сосуда или 10г/л питательной среды.

Каллусную ткань родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L) культивировали аналогично примеру 2 при соотношении инокулюм:среда 1:70 на среде следующего состава, мг/л;

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Макроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 4,57 10 <sup>3</sup> |
| Микроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 38,22                |
| Кинетин            | 1,0                  |
| Тиаминхлорид       | 0,4                  |
| α – Нафтилуксусная |                      |
| кислота            | 2,0                  |
| Мезоинозит         | 80,0                 |
| Хелат железа       | 5,0                  |
| Смесь аминокислот  |                      |
| гидролизатная      | 0,3 10 <sup>3</sup>  |
| Сахар-сырец        | 25,0 10 <sup>3</sup> |
| Агар-агар          | 7,5 10 <sup>3</sup>  |

Вода

дистиллированная До 1л

Выход биомассы родиолы розовой 0,9г на АСВ из одного культивационного сосуда.

Пример 6. Каллусную ткань женьшеня и родиолы розовой культивировали аналогично примеру 1 на питательной среде следующего состава, мг/л:

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| Макроэлементы по   |                     |
| Мурасиге-Скугу     | 3,9 10 <sup>3</sup> |
| Микроэлементы по   |                     |
| Мурасиге-Скугу     | 36,0                |
| Кинетин            | 0,8                 |
| Тиаминхлорид       | 0,2                 |
| α – Нафтилуксусная |                     |
| кислота            | 1,5                 |
| Мезоинозит         | 50                  |
| Хелат железа       | 3,0                 |

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| Смесь аминокислот |                      |
| гидролизатная     | 0,15 10 <sup>3</sup> |
| Сахар-сырец       | 20,0 10 <sup>3</sup> |
| Агар-агар         | 7,0 10 <sup>3</sup>  |
| Вода              |                      |
| дистиллированная  | До 1л                |

Питательную среду разливают в банки объемом 200мл по 90мл и стерилизуют аналогично примеру 1.

Выход сухой биомассы женьшеня с одного культивационного сосуда 1,0г или 11г/л, а родиолы розовой 0,7г или 10г/л питательной среды.

Пример 7. Каллусную ткань женьшеня и родиолы розовой культивировали аналогично примеру 1 на питательной среде следующего состава, мг/л:

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Макроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 4,1 10 <sup>3</sup>  |
| Микроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 37,0                 |
| Кинетин            | 0,5                  |
| Тиаминхлорид       | 0,3                  |
| α – Нафтилуксусная |                      |
| кислота            | 1,5                  |
| Мезоинозит         | 60,0                 |
| Хелат железа       | 4,0                  |
| Смесь аминокислот  |                      |
| гидролизатная      | 0,2 10 <sup>3</sup>  |
| Сахар-сырец        | 20,0 10 <sup>3</sup> |
| Агар-агар          | 7,0 10 <sup>3</sup>  |
| Вода               |                      |
| дистиллированная   | До 1л                |

Выход сухой биомассы с одного культивационного сосуда 1,2г или 13,6г/л, а родиолы розовой - 13г/л питательной среды.

Пример 8. Каллусную ткань женьшеня и родиолы розовой культивировали аналогично примеру 1 на питательной среде следующего состава, мг/л:

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Макроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 4,8 10 <sup>3</sup>  |
| Микроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 39,0                 |
| Кинетин            | 1,5                  |
| Тиаминхлорид       | 0,6                  |
| α – Нафтилуксусная |                      |
| кислота            | 2,3                  |
| Мезоинозит         | 80,0                 |
| Хелат железа       | 6,0                  |
| Смесь аминокислот  |                      |
| гидролизатная      | 0,35 10 <sup>3</sup> |
| Сахар-сырец        | 30,0 10 <sup>3</sup> |
| Агар-агар          | 8,0 10 <sup>3</sup>  |
| Вода               |                      |
| дистиллированная   | До 1л                |

Выход сухой биомассы женьшеня с одного культивационного сосуда 1,2г или 13,6г/л, а родиолы розовой - 13г/л питательной среды.

Пример 9. Каллусную ткань женьшеня и родиолы розовой культивировали аналогично примеру 1 при таком соотношении химических компонентов, мг/л:

|                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| Макроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 5,0·10 <sup>3</sup>  |
| Микроэлементы по   |                      |
| Мурасиге-Скугу     | 40,0                 |
| Кинетин            | 1,7                  |
| Тиаминхлорид       | 0,7                  |
| α – Нафтилуксусная |                      |
| кислота            | 2,5                  |
| Мезоинозит         | 100                  |
| Хелат железа       | 7,0                  |
| Смесь аминокислот  |                      |
| гидролизатная      | 0,45                 |
| Сахар-сырец        | 40,0 10 <sup>3</sup> |
| Агар-агар          | 8,5 10 <sup>3</sup>  |
| Вода               |                      |
| дистиллированная   | До 1л                |

Выход сухой биомассы женьшеня 11,5г/л, а родиолы розовой - 10г/л питательной среды.

Из приведенных примеров видно, что наилучший рост биомассы женьшеня и родиолы розовой наблюдается в примерах 7 и 8.

При высоких концентрациях Химических компонентов в питательной среде рост биомассы угнетается и стоимость среды возрастает.

Выход сухой биомассы с одного культивационного сосуда увеличено за счет увеличения объема питательной среды в сосудах объемом 200мл до 90мл. Если увеличить объем до 100мл, то при стерилизации подмокают ватно-марлевые пробки, которыми закрыты сосуды. Это приводит к инфицированию каллуса во время 30-ти суточного культивирования. Использование банок большего объема приведет к большим удельным затратам электроэнергии на единицу продукции. При этом в высоких сосудах полностью питательная среда во время роста биомассы не расходуется. Поэтому наилучшими сосудах для выращивания женьшеня и родиолы розовой в заводских условиях являются банки объемом 200мл.

Таким образом, предложенная питательная среда позволяет увеличить выход биомассы на 30% с 1л питательной среды; заменить дефицитное пищевое сырье на отходы производства мясо-молочной промышленности; удешевить питательную среду за счет замены источника азотного и углеродного питания; увеличить выход биомассы из одного культивационного сосуда в два раза при неизменном инокулюме.