

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Львівська політехніка»

// На правах рукопису
УДК 66.061.34+581.143.6

КРВАВИЧ АННА СЕРГІЇВНА

**ЕКСТРАГУВАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З БІОМАСИ
GLADIOLUS IMBRICATUS, КУЛЬТИВОВАНОЇ В УМОВАХ *IN VITRO***

05.17.08 – процеси та обладнання хімічної технології

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Науковий керівник
доктор хімічних наук, професор
Новіков В.П.

Ідентичність усіх примірників дисертації

ЗАСВІДЧУЮ:

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 35.052.09



Гумницький Я.М.

Львів – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Теоретичні основи екстрагування цільових компонентів із рослинної сировини.....	12
1.2. Технологічні методи екстракції та виділення БАР.....	19
1.3. Використання методів біотехнології в культивуванні лікарських рослин.....	26
1.4. Технологічні аспекти культивування рослин в умовах <i>in vitro</i>	29
1.5. Висновки до розділу.....	34
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	37
2.1. Об'єкти дослідження.....	37
2.2. Підготовка об'єктів дослідження для екстрагування та фітохімічного аналізу.....	39
2.3. Фітохімічний аналіз одержаних екстрактів.....	40
2.3.1. Ідентифікація БАР в екстрактах <i>G. imbricatus</i>	40
2.3.2. Ідентифікація флаваноїдів.....	40
2.3.3. Кількісне визначення ряду груп БАР <i>G. imbricatus</i>	41
2.3.4. Визначення суми фенольних сполук.....	41
2.3.5. Визначення компонентного складу БАР <i>G. imbricatus</i> .	42
2.4. Методика досліджень кінетики екстрагування цільового компоненту з <i>G. imbricatus</i> в апараті з мішалкою.....	43
2.5. Методика досліджень кінетики екстрагування цільового компоненту з <i>G. imbricatus</i> в апараті Сокслета та визначення максимального виходу цільового компоненту з рослинної сировини	44
2.5.1. Методика дослідження кінетики екстрагування цільового компоненту в апараті Сокслета.....	44
2.5.2. Визначення максимального виходу цільового	

компоненту з <i>G. imbricatus</i>	45
2.6. Методика ведення в культуру <i>in vitro</i> насіння та бульбоцибулин <i>G.imbricatus</i>	45
2.7. Методика культивування біомаси <i>G. imbricatus</i>	46
2.8. Математичні методи дослідження.....	47
2.9. Висновки до розділу.....	48
РОЗДІЛ 3. КУЛЬТИВУВАННЯ <i>GLADIOLUS IMBRICATUS</i> В УМОВАХ <i>IN</i> <i>VITRO</i>	49
3.1. Загальна характеристика розділу.....	49
3.2. Введення в культуру <i>in vitro</i> насіння та бульбоцибулин <i>G.imbricatus</i>	50
3.3. Вибір експлантів.....	55
3.4. Калусогенез.....	58
3.5. Висновки до розділу.....	59
РОЗДІЛ 4. ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ЕКСТРАГУВАННЯ ЦІЛЬОВИХ КОМПОНЕНТІВ З РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ <i>G. IMBRICATUS</i>	61
4.1. Загальна характеристика розділу.....	61
4.2. Механізм та кінетика екстрагування.....	61
4.3. Експериментальні дослідження кінетики екстрагування цільового компонента з частинок дикорослого виду <i>G. imbricatus</i>	66
4.4. Вибір екстрагенту.....	71
4.5. Вибір співвідношення Т/Р та визначення умов рівноваги.....	73
4.6. Експериментальні дослідження кінетики екстрагування..... цільового компонента в апараті Сокслета.....	75
4.7. Визначення коефіцієнта дифузії.....	77
4.8. Висновки до розділу.....	80

РОЗДІЛ 5. МЕХАНІЗМ ТА КІНЕТИКА ВИЛУЧЕННЯ ЦІЛЬОВИХ КОМПОНЕНТІВ З КАЛУСНОЇ БІОМАСИ <i>G. IMBRICATUS</i> ВИРОЩЕНОЇ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i>	81
5.1. Загальна характеристика розділу.....	81
5.2 Одержання біомаси <i>G. imbricatus</i> для екстрагування та фітохімічного аналізу.....	81
5.3 Дослідження кінетики екстрагування цільового компонента з <i>G. imbricatus</i> в апараті Сокслета та визначення виходу цільових компонентів в екстракті.....	82
5.4 Дослідження процесу екстрагування цільових компонентів з частинок калусу <i>G. imbricatus</i> в апараті з мішалкою.....	84
5.5. Дослідження компонентного складу <i>G.imbricatus</i> та одержаної калусної маси.....	86
5.6. Інтенсифікація процесів екстрагування зрідженими газами.....	89
5.7. Висновки до розділу.....	94
РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ <i>GLADIOLUS IMBRICATUS</i> (СХЕМА ПРОЦЕСУ).....	99
6.1. Загальна характеристика розділу.....	100
6.2. Суспензійне культивування біомаси <i>Gladiolus imbricatus</i>	100
6.3. Розрахунок процесу культивування	102
6.4. Розроблення технологічної схеми виробництва біомаси <i>Gladiolus imbricatus</i>	112
6.5. Опис технологічного процесу виробництва біомаси <i>Gladiolus imbricatus</i>	114
6.6. Висновки до розділу.....	117
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	121
ДОДАТКИ.....	137

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АСБ	- абсолютно суха біомаса
БВФ	- барабанний вакуум фільтр
БАР	- біологічно активні речовини
ВООЗ	- всесвітня організація охорони здоров'я
КР	- культуральна рідина
ЛР	- лікарські рослини
ЛРС	- лікарська рослинна сировина
МС	- Мурасіге і Скуга
МВ	- молекулярна маса
ПМ	- посівний матеріал
ПС	- поживне середовище
ТШХ	- тонкошарова хроматографія
УФ	- ультрафіолетовий
УНС	- лінія безперервної стерилізації
2,4-ДХФК	- 2,4-дихлорфеноксицтова кислота
t_R	- час затримки

ВСТУП

Актуальність теми. Одним із актуальних завдань сучасної фітохімії є пошук нових екологічно чистих сировинних джерел біологічно активних речовин (БАР).

Традиційно БАР рослин отримують на основі використання природної сировини. Найчастіше використовують біомасу дикорослих лікарських рослин, частину отримують з полів спеціалізованих господарств, де рослини культивують, підвищують врожайність різними заходами і збирають механічним способом. Широке використання рослин для отримання БАР призвело до стрімкого скорочення їх у природі. Деякі з них відносяться до рідкісних і зникаючих видів, багато рослин довго відновлюють свої площі вирощування. Однією з таких лікарських рослин є косарика черепитчасті (*Gladiolus imbricatus*) - поступово зникають з природних угруповань на території нашої країни, у зв'язку з чим внесені до останнього видання Червоної книги України зі статусом "вразливий".

Досягнення останніх років в галузі культури органів і тканин продемонстрували величезні можливості клітинних технологій як в розмноженні цінних генотипів, так і в одержанні БАР. Основна привабливість використання культури клітин в тому, що це є альтернативним способом отримання сировини для медицини. Однак дані про використання біотехнологічних методів в розмноженні та одержанні БАР *G.imbricatus* в літературі не достатньо описані.

Промислове одержання калусної біомаси *G.imbricatus* для отримання БАР забезпечує збереження генофонду рідкісної лікарської рослини в природі, чим визначає важливість даного дослідження.

Однією з основних стадій одержання БАР з біомаси *G.imbricatus* є стадія екстрагування. Однак, процеси, пов'язані з екстрагуванням є складними і не достатньо вивчені, тому існує необхідність проведення теоретичних та експериментальних досліджень процесів екстрагування БАР з калусної біомаси *G.imbricatus* з метою визначення фізико-хімічних та кінетичних констант з метою підвищення ступеня вилучення БАР, оптимізації та апаратного оформлення

процесу, комплексної переробки сировини, та ін. Отримання необхідних даних для ефективнішого вилучення БАР з біомаси *G. imbricatus* є актуальною задачею.

Беручи до уваги перспективу розробки екстракційної технології для вилучення БАР з біомаси *G.imbricatus* в промислових масштабах, важливим завданням є проведення теоретичних і експериментальних досліджень з метою визначення оптимальних умов екстрагування для одержання максимальної кількості БАР. Визначення механізму екстрагування, коефіцієнтів внутрішньої дифузії та кінетичних закономірностей, на основі яких можна визначити швидкість процесу при екстрагуванні БАР при різних параметрах процесу та оптимізувати його для одержання максимального виходу БАР з калусної біомаси *G. imbricatus*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота включає дослідження, виконані згідно плану науково-дослідних робіт кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» в межах науково-дослідних тем «Розробка основ технології одержання субстанцій з різними видами біологічної активності та нових препаратів, в тому числі пролонгованої дії на їх основі» (№ держреєстрації 0109U0045), а також державної науково-технічної програми 03.06. «Нові екологічно безпечні лікувальні засоби».

Мета та задачі дослідження. Метою даної роботи є дослідження процесу екстрагування БАР з калусної біомаси *G.imbricatus*, розробка технології культивування біомаси *in vitro* рідкісної лікарської рослини *G. imbricatus*.

Для досягнення цього необхідно вирішити такі основні завдання: проаналізувати літературні дані, дослідити фізико-хімічні характеристики цільових компонентів, дослідити механізм вилучення цільових компонентів з метою визначення лімітуючої стадії процесу, вивчити кінетичні закономірності процесу екстрагування, підібрати необхідні математичні моделі процесу екстрагування, за допомогою яких визначити кількісні параметри, необхідні для розробки технологічної схеми і які дали б можливість прогнозувати процес у реальних умовах.

Для досягнення мети необхідно було виконати наступні завдання:

- Встановити механізм екстракційного вилучення БАР з калусних клітинних агрегатів (глобул) з метою визначення лімітуючої стадії процесу, встановити кінетичні закономірності та прийняти надійні математичні моделі процесу екстрагування;
- оптимізувати процес екстрагування БАР з культивованої біомаси; визначити компонентний склад дикоростучого виду *G. imbricatus* та калусної біомаси, одержаної у процесі культивування;
- дослідити та розробити процес культивування *G.imbricatus*; встановити вплив стерилізуючих агентів, виду експлантів та фітогормонів на вихід біомаси; визначити технологічні параметри виробництва БАР при культивуванні *G. imbricatus*;
- розробити технологічну та апаратурну схему виробництва БАР з калусної маси *G. imbricatus*.

Об'єкт дослідження: механізм та кінетика екстрагування БАР з природних джерел проростання та калусної біомаси *G. imbricatus*, процес культивування біомаси *G. imbricatus*.

Предмет дослідження: калусна біомаса та рослинна сировина *G. imbricatus*.

Методи дослідження: процес екстрагування досліджували в апараті з мішалкою та в апараті Сокслета, на установці надкритичної флюїдної екстракції, процес культивування калусної біомаси *G. imbricatus* досліджували у ферментері, фізико-хімічні параметри (рН середовища, температура, вміст розчиненого кисню) визначалися за допомогою автоматичного аналізатора, кількісне визначення БАР рідких екстрактів *G. imbricatus* проводили спектрофотометричним та титриметричним методами, визначення хімічного складу БАР в одержаній біомасі проводили за допомогою тонкошарової та вискоефективної рідинної хроматографії та хромато-мас-спектроскопії, для обробки експериментальних даних та розрахунків використовували математичне моделювання з використанням програмних пакетів (MathCAD, Excel, Grapher).

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті проведених досліджень було встановлено:

- механізм екстрагування (лімітуючу стадію) та кінетичні закономірності процесу, вибрано необхідні математичні моделі процесу екстрагування, перевірено їх на адекватність, встановлено умови найбільш ефективного вилучення цільових компонентів (температурний режим, діаметр частинок зерна, вибрано оптимальний екстрагент та ін.), визначено константи екстрагування, знання яких необхідне для прогнозування процесу екстрагування в умовах виробництва;
- встановлено якісний та кількісний склад екстрактів з дикорослої рослини та калусної маси *G. imbricatus*;
- введено в культуру *in vitro* і отримано високопродуктивну калусну культуру *G. imbricatus* та встановлено оптимальні умови культивування *G. imbricatus*, що забезпечило підвищення виходу БАР та зменшення часу культивування;
- розроблено оптимальний склад поживних середовищ; встановлено, що модифіковане поживне середовище Мурасіге і Скуга найкращим чином забезпечує процеси життєдіяльності експлантів *G.imbricatus* і накопичення БАР у калусі;
- встановлено, що вміст та співвідношення фітогормонів у середовищі впливає на накопичення клітинної біомаси *G. imbricatus* і кількість БАР в ній;
- розроблено технологічний процес отримання БАР з клітинної культури *G.imbricatus* та вибрано необхідне обладнання.

Практичне значення одержаних результатів. Уперше пропонується використовувати клітинну біомасу *G. imbricatus* в якості джерела БАР. Експериментально визначені умови одержання біомаси *G. imbricatus* при різних параметрах процесу та оптимізовано процес екстрагування.

Визначено оптимальні параметри процесу культивування у лабораторному ферментері SIMAX (Czech Republic) (рН – 6,0, температура вирощування – 28°C,

концентрація розчиненого кисню 60 -70%), об'ємом 60 л , що дозволяє одержати екстракт з максимальним вмістом комплексу БАР.

Розроблено технологію одержання БАР з біомаси *G.imbricatus*. Запропоновано принципову технологічну та апаратурно-технологічну схеми виробництва БАР з калусної маси *G. imbricatus*, які в подальшому можна використати для підготовки технічного проекту.

З одержаної таким способом калусної маси *G.imbricatus*, яка містить ряд цінних БАР, можна виробляти продукт для харчової, фармацевтичної, косметичної, хімічної та інших галузей промисловості. Наведений спосіб дає можливість одержання продукту незалежно від клімату, сезону, погоди, ґрунтових умов.

Фрагменти роботи впроваджено у навчальний та науковий процеси на кафедрі ТБСФБ Національного університету «Львівська політехніка».

Особистий внесок здобувача полягає в проведенні літературного пошуку та аналітичній обробці наукової літератури, плануванні та виконанні експериментальної частини, інтерпретації фізико-хімічних та хроматографічних даних, обробці результатів біотехнологічних досліджень, формулюванні основних положень та висновків дисертаційної роботи, в розробці технологічної схеми процесу, у виборі відповідної апаратури при розробці технологічної схеми.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи доповідались на Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (Харків, 2011), XVII Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2013), Національній науково-технічній інтернет-конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (Львів, 2013), XX International Scientific And Practical Conference “Actual Questions Of Development of New Drugs”, (Харків, 2013), міжнародній науково-практичній конференції молодих науковців «Проблеми та перспективи досліджень рослинного світу», (Ялта, 2014), II International Scientific Conference

«Pharm. Sciences in XXI Century», (Georgia, 2014), ІХ Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХІ століття», (Київ, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць, з яких 7 статей, 5 з них – у фахових виданнях, 2 – в іноземному, 10 публікацій – у матеріалах і тезах конференцій.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Теоретичні основи екстрагування цільових компонентів із рослинної сировини

Екстрагування в системі тверде тіло — рідина є одним із найважливіших технологічних процесів у хімічній, фармацевтичній, парфумерній та багатьох інших галузях промисловості. Вагомий вклад у розробку теорії та практики екстрагування внесли Г.А. Аксельруд [37,112,113], Г.Н. Доброхотов [40], П. Г. Романков [41], В.М. Лисянський [42], В.В. Белобородов [39] та ін.

Вилучення цільових компонентів з рослинної сировини, є набагато складнішим порівняно з екстрагуванням цільових компонентів з мінеральної сировини, оскільки клітинна будова рослинної сировини є складною і не достатньо вивченою.

Оскільки речовина, що вилучається, утворює з твердою фазою різноманітні зв'язки, то екстрагування не зводиться до простого промивання сировини, а супроводжується руйнуванням цих зв'язків з утворенням нових. Процес гальмують і труднощі, пов'язані з проникненням розчинника в тверду частинку і вихід його разом з речовиною з цієї частинки. Отже, процес має складний фізико-хімічний характер.

Складність процесу екстрагування пов'язана з низкою таких процесів як змочування, набухання, розчинення, хімічна взаємодія, адсорбція, абсорбція, дифузія, діаліз тощо. У ньому розрізняють три основні стадії:

- просочування сухого рослинного матеріалу екстрагентом;
- розчинення цільових компонентів сировини;
- перехід розчинених речовин в екстрагент.

Просочування рослинного матеріалу екстрагентом здійснюється за рахунок капілярних явищ. По каналах, які утворюються між частинками подрібненого матеріалу, по міжклітинних ходах, по мікро- і ультрамікропорах екстрагент проникає у товщу сировини і у середину клітин.

При проникненні екстрагента до клітини утворюється концентрований розчин речовин, і цим закінчується друга стадія і розпочинається третя стадія процесу екстрагування – стадія масообміну.

В свою чергу рівноважна концентрація залежить від агрегатного стану цільового компонента, що підлягає вилученню. Якщо цільовий компонент знаходиться в капілярах (порах) матеріалу в розчиненому виді, то в умовах рівноваги його концентрація в порах твердого матеріалу і в основній масі розчинника – вирівнюються.

Якщо цільовий компонент знаходиться в твердому виді, то в процесі його розчинення рівновага настає тоді, коли концентрація C_1 в основній масі розчинника досягає концентрації насичення C_s . Тому при визначенні рушійної сили процесу екстрагування необхідно в першу чергу в'яснити, в якому стані знаходиться цільовий компонент в порах твердого матеріалу – рідкому чи твердому [113]. Рушійною силою процесу екстрагування є різниця рівноважних і робочих концентрацій цільового компонента.

Процес масообміну є дифузійним процесом, і в цьому складному процесі розрізняють два принципово відмінні один від одного види дифузії:

- молекулярну дифузію - внутрішню;
- конвективну дифузію.

Молекулярна дифузія здійснюється за рахунок хаотичного руху молекул при нерухомій рідкій і твердій фазах. Молекулярна дифузія виникає на границі розділу твердої і рідкої фаз, у середині клітини, у дифузійному (ламінальному) шарі, який оточує поверхню твердих частинок твердої сировини.

На процес молекулярної дифузії впливають:

- температура (чим вона вища, тим швидше рухаються молекули);
- розмір молекул, що дифундують (чим менша молекула, тим більша її рухливість);
- поверхня контакту фаз (чим вона більша, тим швидше відбувається масообмін);

товщина дифузійного шару, крізь який відбувається масообмін (чим більша ця величина, тим повільніше відбувається дифузія).

На перший погляд, простим засобом інтенсифікації є зменшення розмірів частинок, що надходять на екстрагування. Але такий метод викликає негативні наслідки в існуючих операціях подрібнювання (перед екстрагуванням) і відділення розчину від твердої фази (після екстрагування). Дійсно, зі зменшенням розміру частинок зростають затрати енергії, що витрачається на роботу дробарок або млинів, а також труднощі при реалізації фільтрування або відстоювання.

Для розрахунку процесу масопередачі під час екстрагування в системі тверде тіло – рідина ставиться мета визначити концентрацію екстрагованого компонента в розчині і всередині частинок твердої фази в будь-який момент часу від початку процесу. Кінетика цього процесу описується відомими рівняннями нестационарної дифузії. Це завдання вирішується на основі диференційного рівняння Фіка та відомих диференційних рівнянь, граничних і початкових умов.

Процеси, пов'язані з екстрагуванням цільових компонентів із пористих тіл вивчали багато авторів, серед яких слід відзначити монографії Г. А. Аксельруда [37,112,113], В. В. Белобородова [39], В. М. Лисянського [42].

Тверде пористе тіло містить у своєму пористому об'ємі розчин цільового компонента. При взаємодії з екстрагентом цільовий компонент дифундує крізь пористу структуру твердого тіла в основну масу рідини. Діаметр пор, що складають пористий об'єм, настільки малий, що рідина в порах практично нерухома. З цього випливає, що механізмом переносу розчиненої речовини є молекулярна дифузія. Пористі структури твердих частинок мають велику розмаїтість. Серед них варто виділити клас ізотропних структур, що володіють тими властивостями, що дифузійна провідність в об'ємі частинки однакова у всіх напрямках. Анізотропні пористі тіла можуть мати регулярну структуру. Прикладами таких тіл є рослинні об'єкти, що володіють системою капілярів, у напрямку яких спостерігається найбільша дифузійна провідність. Пористі, анізотропні тіла з нерегулярною структурою характеризуються залежністю дифузійної провідності від координат.

Усередині тіла розташовуються вмістища розчину, статистично розподілені по розмірах. Молекулярний перенос речовини завершується по досягненні цільовим компонентом зовнішніх границь пористого тіла, після чого реалізується конвективний перенос речовини в навколишнє рідке середовище.

Розглянемо ізотропне пористе тіло сферичної форми, у пористому об'ємі якого утримується розчин цільового компонента з початковою концентрацією C_0 . По ходу екстрагування концентрація прийме значення C , різне в кожній точці об'єму частинки та у різний час екстрагування. Концентраційна обстановка усередині пористого об'єму може бути описана диференціальним рівнянням дифузії для пористих тіл сферичної форми [113].

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (1.1)$$

де r - поточний радіус $0 < r < R$ (R радіус пористого тіла); D - коефіцієнт дифузії; t - час.

До цього рівняння слід додати крайові умови

$$\text{при } r = 0 \quad \frac{\partial C}{\partial r} = 0 \quad (1.2)$$

$$\text{при } r = R \quad -D_m \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right)_{r=R} = K(C_n - C_1) \quad (1.3)$$

$$\text{при } t = 0 \quad C = C_n$$

де K - коефіцієнт масовіддачі; (C_n - концентрація на поверхні при $r = R$; D_m - коефіцієнт масопровідності (у загальному випадку не дорівнює коефіцієнтові дифузії D)).

Таким чином концентрація C є функцією часу і радіусу $C = f(r, t)$

Рівняння (1.2) визначає умову симетричності концентраційного профілю. Рівняння (1.3) є математичним описом процесу масовіддачі від поверхні сферичного тіла в основну масу рідини. Скільки речовини в одиницю часу підводиться до міжфазової границі за допомогою молекулярної дифузії, стільки ж відводиться за допомогою механізму масовіддачі.

Увівши наступні безрозмірні параметри

$$\varphi = \frac{r}{R}, \quad Bi = \frac{K \cdot R}{D_m}$$

перетворимо рівняння (1.3) до виду:

$$-\left(\frac{\partial C}{\partial \varphi}\right)_{\varphi=1} = Bi(C_n - C_1) \quad (1.4)$$

З отриманого рівняння стає ясным фізичний зміст дифузійного числа Bi . При $Bi = \infty$ $C_n = C_1$, тобто концентрація на поверхні дорівнює концентрації в основній масі рідини. Такий режим екстрагування іменується внутрішньо дифузійним. В умовах внутрішньо дифузійного режиму процес екстрагування протікає найбільше інтенсивно, тому що увесь зовнішньо дифузійний опір знятий. При $Bi \ll 1$ $\frac{\partial C}{\partial \varphi} = 0$; $C = const$, такий режим іменується зовнішньо дифузійним, він характеризується рівномірним розподілом концентрації в пористому об'ємі частинок у кожен момент часу екстрагування. Шляхом збільшення коефіцієнта масовіддачі (цього можна досягти збільшуючи швидкість обтікання частинок рідиною) можна перевести процес екстрагування в режим внутрішньо дифузійний, забезпечуючи максимально можливу інтенсифікацію процесу. Для розв'язку системи (1.1), (1.2), (1.3) слід приєднати до неї рівняння матеріального балансу, що встановлює залежність між концентраціями C і C_1 , яке замикає систему. Для проточного процесу

$$V(C_o - \bar{C}) = W(C_1 - C_n) \quad (1.5)$$

V – об'єм розчинюваних пор усіх часток, що надходять в одиницю часу в апарат;
 W – об'єм рідкого екстрагента, що надходить в одиницю часу в апарат; C_o - початкова концентрація екстрагента; \bar{C} - осереднена концентрація в пористому об'ємі частинок до даного моменту часу

$$\bar{C} = \frac{1}{\frac{4}{3}\pi R^3} \int_0^R C 4\pi r^2 dr \quad (1.6)$$

Для протікотоку

$$V(C_o - \bar{C}) = W(C_k - C_1) \quad (1.7)$$

C_K - кінцева концентрація на виході з апарата.

Розглянута система має наступний аналітичний розв'язок:

$$\frac{C_o - \bar{C}}{C_o - C_T} = \frac{1}{1 + \beta} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{\left(3\beta - \frac{\mu_n^2}{Bi}\right)^2 + \mu_n^2 \left(1 - \frac{1}{Bi}\right) + 9\beta} e^{-\mu_n^2 \tau} \quad (1.8)$$

в якому $\tau = \frac{Dt}{R^2}$; $\beta = \frac{V}{W}$; t - час перебування твердих часток в апараті $t = \frac{l}{v}$, де v - швидкість руху твердої фази.

Рівняння (1.8) справедливе для прямогоку і для протivotоку. Тільки для прямогоку $\beta > 0$; $C_m = C_n$; для протivotоку $\beta < 0$; $C_T = C_n$; μ_n - корені характеристичного рівняння

$$Ctg\mu = \frac{1}{\mu} + \frac{1}{\frac{3\beta}{\mu} - \frac{\mu}{Bi}} \quad (1.9)$$

Збіжність рядів, якими представляються функції (1.8) така, що вже при $\tau > 0.1$ можна обмежитися першим членом ряду.

Таким чином, за допомогою кінетичного рівняння (1.8) можна простежити за зменшенням концентрації \bar{C} у порах твердого тіла по довжині прямогочного або протivotочного апарата при незмінних параметрах β і Bi . Можна визначити довжину апарата, що забезпечує зниження визначеної концентрації \bar{C} до заданої величини.

Для полідисперсної суміші частинок:

$$\frac{C_o - C}{C_o - C_p} = \frac{1}{1 + \beta} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{\beta \left(1 + 3\beta \left(1 - \frac{1}{\mu_n^2} + \sum_{i=1}^q q_i \frac{\mu_n}{2i}\right)\right)} e^{-\mu_n^2 \tau}, \quad (1.10)$$

при цьому:

$$\frac{1}{\mu} + \frac{\mu}{3\beta} = \sum_{i=1}^q q_i C_i ctg \frac{\mu}{\alpha} \quad (1.11)$$

Згідно з рівняннями (1.4)–(1.8) основними дифузійно-кінетичними параметрами процесу екстрагування з твердого тіла цільових компонентів є коефіцієнт внутрішньої дифузії D , що визначає величину критерію Фур'є, і

коефіцієнт масовіддачі в рідкій фазі K , що визначає величину критерію Біо. Коефіцієнт K найпростіше може бути визначений з умов експерименту, що проводиться в замкнутих умовах при інтенсивному перемішуванні. Різке зменшення зовнішнього опору масоперенесення дозволить прийняти:

$$Bi = \frac{K \cdot R}{D_m} \rightarrow \infty. \quad (1.12)$$

Отримані на базі експериментальних даних кінетичні криві, побудовані в логарифмічних координатах, дадуть змогу виділити ділянку регулярного процесу, для якого можна обмежитися першим членом асимптотичного ряду рівняння (1.8). У цьому випадку вираз для коефіцієнта масопровідності при монодисперсному складі частинок має вигляд:

$$D = \frac{\ln A - \ln \left(\frac{1}{1 + \beta} - \frac{C_{TO} - C_P}{C_{TO} - C_P} \right) \cdot R^2}{\mu^2 \cdot \tau}. \quad (1.13)$$

Знайдені таким способом коефіцієнти зберігають своє значення для процесів, схема яких відрізняється від схеми замкнутого процесу.

Якщо до диференціального рівняння (1.1) додати найпростіші краєві умови $t = 0$; $C_2 = C_0 = \text{const}$; $C_{2n} = 0$, то результатом розв'язку рівняння (1.1) буде рівняння, що визначає середню концентрацію в пористих частинках. Для сферичних частинок (R – радіус кулі) одержимо:

$$\frac{\bar{C}_2}{C_0} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{\pi^2 n^2} e^{-\pi^2 n^2 \frac{Dt}{R^2}}. \quad (1.14)$$

Механізм та кінетика екстрагування цільових компонентів із рослинної сировини детально описана в роботах Є.М. Семенишина [117-130]. Математична модель екстрагування олії з насіння амаранту має такий вид:

$$1 - \frac{C_1}{C_k} = e^{\frac{-3Kt}{R} \cdot \frac{C_{II}}{C_{II} - C_K}}, \quad (1.15)$$

де C_I – бажана концентрація в розчині; C_{II} – початкова концентрація олії в насінні; C_K – кінцева концентрація в розчині; R – радіус сфери; t – час; $K = \frac{D_{cm}}{\delta}$ – кінетичний коефіцієнт.

Що стосується механізму вилучення біологічно активних сполук з рослинної сировини, то ці більш складні процеси описані в працях В.В. Дячка [53,131-132].

Емпіричні дані, що пов'язують коефіцієнт масовіддачі з фізичними властивостями системи і гідродинамічною обстановкою, як правило, узагальнюються за допомогою критеріальних рівнянь.

Як засвідчує аналіз літератури, сьогодні немає єдиних поглядів на кінетику екстрагування цільових компонентів із пористих структур, особливо з рослинної сировини. Деякі дослідники вважають, що перенесення речовини в пористій структурі визначається режимом переміщення рідини в капілярах (вимушений рух чи природна конвекція). Варто підкреслити, що саме визнання дифузійного механізму екстрагування недостатнє, оскільки необхідно вирішити питання, що лімітує процес – зовнішня чи внутрішня дифузія.

Однак деякі дослідники ігнорують ці відмінності, що характерні для процесів екстрагування, і поряд з визначенням коефіцієнтів внутрішньої дифузії, визначають коефіцієнт зовнішньої дифузії. Хоча в обох випадках перенесення цільового компонента дифузійне, проте механізм його різний, оскільки одна із стадій, яка є найповільнішою, визначає швидкість всього процесу.

1.2. Технологічні методи екстрагування та виділення БАР

Основною стадією отримання цільового продукту з рослинної сировини є її екстрагування, яке зумовлене загальними законами, властивостями рослинної клітини й фізико-хімічною спорідненістю екстрагенту й речовин, що вилучаються.

У хімічній промисловості біомаса ЛР (екстраговані з неї первинні або вторинні метаболіти) широко використовується у різних її галузях. Так, наприклад, якщо в 70-х роках у світі використовувалось 6 млн. т олій для промислового, тобто «нехарчового», призначення, то ситуація в 2000р. вже змінилася — понад 24 млн. т з

вироблених 98 млн. т олій було використано на технічні цілі [21]. Рослинні олії тепер розглядають переважно як сировину харчовій промисловості і для виробництва біодизельного палива. Проте відомі й інші сфери застосування хімікатів, які одержують на базі рослинних олій — естерів ненасичених вищих жирних кислот. Вивчення складу олій насіння різних вищих рослин виявило в них понад 500 вищих жирних кислот, які відрізняються довжиною ланцюга, місцем та кількістю подвійних зв'язків, ацетиленових ланцюгів, присутністю гідроксигрупи, гетероциклічних, епоксидних та циклопропанових фрагментів.

Широке застосування ЛР, біологічно активних добавок і косметичних засобів на основі БАР вимагає удосконалення технологій їх одержання, пошуку нових ефективних шляхів інтенсифікації процесу екстрагування та розробки оптимальних схем аналітичного постадійного контролю виробництва. Тільки таким чином можна забезпечити раціональний підхід до розробки оптимальної технології виробництва нових та удосконалення технології виробництва вже існуючих цільових продуктів [20].

На виробництві для одержання БАР із рослинної сировини використовують різні способи:

- ремацерацію і її варіанти;
- перколяцію;
- реперколяцію;
- циркуляційне екстрагування;
- протитечійне екстрагування в батареї перколяторів із циркуляційним перемішуванням;
- безперервне протитечійне екстрагування з переміщенням сировини і екстрагента, а також інші методи, що включають подрібнювання сировини в середовищі екстрагента;
- вихрову екстракцію;
- екстракцію з використанням електромагнітних коливань, ультразвуку, електричних розрядів, електроплазмолізу, електродіалізу та ін.

Прогресивним методом для повного вилучення природного комплексу сполук є метод двохфазного екстрагування рослинної сировини системами незмішуваних розчинників різної полярності. Застосування як екстрагента однорідної суміші з двох, а інколи і більшої кількості розчинників дає змогу підвищити селективність екстрагента, а також змінити деякі властивості, що впливають на масопередачу (знизити міжфазний натяг, зменшити в'язкість). Цей метод відрізняється найбільшою роздільною здатністю [44].

Фізико-хімічні явища, що відбуваються під час екстрагування, є досить складними та неоднозначними, залежать від багатьох факторів, тому для кожного виду ЛРС і застосованого екстрагента необхідно експериментально обґрунтовувати параметри технологічного режиму [67,80,128].

Проблема технічного удосконалення виробництва на основі модернізації машин і апаратів, застосування досягнень науки і техніки та прогресивних принципів технології вилучення корисних речовин з використанням нових засобів інтенсифікації процесів є предметом постійної уваги науковців та загально визнаним напрямом науково-технічного прогресу. Для найбільш енерго- та матеріалоемних галузей хімічної промисловості, де застосовується комплекс сполук, вилучених з рослинної сировини та її відходів ці задачі особливо актуальні. Особливо це стосується процесу екстрагування, який є одним з основних у цих галузях. При всій різноманітності конструкцій сучасних екстракторів періодичної та безперервної дії існують загальні недоліки, обумовлені тим, що дрібнофракційна рослинна сировина або підготовлена з неї маса не має достатньої поруватості для протитечійного безперервного екстрагування, погано транспортується, ущільнюється та стає малопроникною для екстрагенту. Практичне забезпечення умов оптимального ведення процесу екстрагування традиційними методами ускладнюється, з одного боку, названими та іншими властивостями сировини, з іншого — процесно-технологічними та конструктивними можливостями існуючого екстракційного обладнання. Аналіз традиційних способів екстрагування в системі тверде тіло-рідина вказав напрямок вирішення цієї проблеми, суть якого полягає в створенні таких гідродинамічних режимів руху, що забезпечують максимальне оновлення

поверхні взаємодії фаз за рахунок створення режиму інтенсивної знакозмінної турбулізації потоку [71-73].

Як відомо на кінетику процесу екстрагування впливає багато чинників [50]: спосіб екстрагування, апаратне оформлення процесу, вид екстрагенту, його концентрація та фізико-хімічні особливості, температура та тривалість проведення процесу, співвідношення сировини та екстрагенту тощо.

Удосконалення застарілих енерго- та ресурсомістких технологічних процесів і обладнання та підвищення їхньої ефективності є одним із перспективних напрямків досліджень в галузі фітохімії [51]. Слід зазначити, що розвиток ресурсозберігаючих технологій ґрунтується на проведенні комплексних наукових досліджень, які пов'язані з розробленням концепцій щодо використання уже відомих і принципово нових фізичних явищ. Одним із перспективних методів інтенсифікації таких процесів є зміна фізико-хімічних властивостей екстрагента [53].

Застосування попереднього оброблення екстрагенту у кавітаційних пристроях дає змогу прискорити процес вилучення цільових компонентів (БАР) з рослинної сировини та збільшити ступінь їхнього вилучення. Збільшення виходу БАР забезпечується зменшенням в'язкості екстрагента, утворенням мономерних молекул і їхньої активацією [54].

Екстракція із застосуванням ультразвуку прискорює процес екстрагування із сировини, забезпечуючи більш повне здобування діючих речовин. Джерело ультразвуку закріплюють на корпусі екстрактора-перколятора із зовнішнього його боку. Ультразвукові хвилі, що виникають, створюють знакозмінний тиск, кавітацію і звуковий вітер. У результаті швидше відбувається набухання матеріалу і розчинення вмісту клітини, збільшується швидкість обтікання частинок сировини, у пограничному дифузійному шарі виникають турбулентні і вихрові потоки. Молекулярна дифузія усередині частинок матеріалу та в пограничному дифузійному шарі практично замінюється конвективною, що призводить до інтенсифікації масообміну. Унаслідок кавітації відбувається руйнування клітинних структур, що прискорює процес переходу діючих речовин в екстрагент за рахунок їх вимивання. Як екстрагент використовують переважно спирто-водні суміші з високою

концентрацією етанолу, який інгібує окисно-відновні процеси, що мають місце в ультразвуковому полі. Для багатьох видів сировини оптимальна інтенсивність ультразвуку знаходиться в інтервалі $1,5—2,3 \cdot 10^4$ Вт/м² [54, 76].

До вад ультразвукової обробки можна віднести кавітацію, іонізацію молекул, зміну властивостей БАР, знижуючи або посилюючи їх терапевтичну активність, тому використання ультразвуку вимагає всебічного дослідження [77].

Поряд із механічним і гідравлічним способами відомі електроімпульсні, магнітоімпульсні, лазерні (оптикоімпульсні), вакуумні, СО₂ методи інтенсифікації екстрагування з рослинної сировини, які мають свої переваги та недоліки [57,60,86].

Застосування електроімпульсних розрядів дозволяє прискорити екстрагування із сировини з клітинною структурою. Для цього використовується імпульсний електроплазмолізатор [85].

Усередині екстрактора з оброблюваною сировиною поміщають електроди, на які подають імпульсний струм високої або ультрависокої частоти. Під впливом електричного розряду в екстрагованій суміші виникає хвиля, що створює високий імпульсний тиск. Унаслідок цього відбувається інтенсивне перемішування оброблюваної суміші, витончується або повністю зникає дифузійний пограничний шар і збільшується конвективна дифузія. Виникнення ударних хвиль сприяє проникненню екстрагента усередину клітини, що прискорює внутрішньоклітинну дифузію. Через іскровий розряд у рідині утворюються плазмові каверни, які, розширюючись, досягають максимального об'єму і захоплюються. При цьому за короткий проміжок часу в малому просторі виділяється велика кількість енергії і відбувається мікрровибух, розриваючи клітинні структури сировини. Екстракція прискорюється за рахунок вимивання БАР із зруйнованих клітин. Крім того, порожнини, які утворюються, постійно пульсують, викликаючи збільшення швидкості руху екстрагента біля частинок сировини і збільшуючи швидкість екстрагування за рахунок зростання коефіцієнта конвективної дифузії [19,56].

У процесі імпульсної обробки матеріалу, який екстрагується, за допомогою високовольтних розрядів електрична енергія перетворюється в енергію

коливального руху рідини, що скорочує час екстрагування і підвищує вихід БАР, ефективність екстрагування за одиницю часу та ін.

Використання електроплазмолізу при екстрагуванні полягає в руйнівному впливові струму на білково-ліпідні мембрани рослинних тканин із збереженням цілісності клітинних оболонок. Під дією електричного струму змінюються електричні потенціали поверхні сировини, поліпшується його змочуваність, прискорюється рух іонів БАР у порожнині клітин і в капілярах клітинних структур. У результаті збільшується коефіцієнт внутрішньої дифузії. Екстрагування цим методом проводять в апараті з електронепровідного матеріалу (дерево, пластикат) з конічним днищем з нержавіючої сталі, над яким міститься сталева перфорована пластинка, яка служить катодом. На пластину, покриту фільтрувальним матеріалом, завантажують попередньо замочену сировину, на яку зверху опускається кришка з умонтованим графітовим анодом [79].

Нині одним із найпоширеніших методів інтенсифікації екстрагування є використання зріджених газів. Вперше їх почали використовувати як розчинники на початку 1930-х рр. в колишньому СРСР, а з 1960-х рр. – в харчовій галузі в промисловому масштабі. Найбільш дослідженим екстрагентом був зріджений двоокис вуглецю CO_2 , рідше застосовували пропан і бутан. Витягвані речовини мали переважно гідрофобний характер: жирні, ефірні олії, каротиноїди, стерини, токоферолі і терпеноїди [48,57]. На сьогодні рідкий CO_2 залишається найпопулярнішим екстрагентом в Росії та за кордоном.

В Україні, починаючи з 1980-х рр., проводили експериментальні дослідження із застосування фторпохідних вуглеводнів (фреонів) як екстрагентів ЛРС. Встановлено, що деякі марки фреонів (наприклад, хладон-22) завдяки більшій полярності витягують ширший спектр БАР, ніж рідкий CO_2 : ефірні та жирні олії, жиророзчинні вітаміни, кумарини, каротиноїди, складні фенолоспирти, вальтрати, іридоїди, деякі алкалоїди і флавоноїди. Крім того, окремі фреони (наприклад, С318) мають дуже високу селективність, дозволяючи екстрагувати ефірні олії без супутніх жирних [58, 60].

Процес екстрагування здійснюється при робочому тискові 1,0— 6,6 МПа (залежить від тиску насиченої пари екстрагенту) і температурі 20—25°C. Багато які з екстрактів, отримані з використанням зріджених газів, відрізняються більш високим вмістом БАР, стійкістю до мікробної контамінації. Особливо це відноситься до сировини, що містить поліфенольні сполуки, алкалоїди, глікозиди [80, 81].

Як активатор та інтенсифікатор екстрактного процесу застосовуються також мікрохвильові поля. На сучасному етапі розвитку науки і техніки, заслуговують визнання потенційні можливості мікрохвильової технології для підвищення ефективності багатьох традиційних виробництв і отримання продукції з новими, кращими споживчими якостями.

Інтенсифікування екстрагування за допомогою мікрохвильового нагріву дозволило отримати позитивні результати при виробництві харчових барвників з буряку, плодово-ягідної сировини, в схемі прискореного дозрівання коньячних спиртів, при вилученні кедрової олії із насіння сосни сибірської, в лабораторних умовах для прискорення вилучення фунгіцидів із деревного матеріалу, при вилученні олій із листя м'яти, розмарину, чайного дерева і інших рослин, при екстрагуванні нікотину із тютюнової сировини [61-63].

Відомо, що при розробці технологій вилучення БАР з рослинної сировини найбільш важливими питаннями є наступні: умови здійснення екстрагування – підбір типу екстрагенту, температури, тривалості процесу та його електрофізичних параметрів, послідовність виконання операцій, ступінь подрібнення сировини та гідромодуль процесу (співвідношення сировина / екстрагент) [32, 89].

До основних технологічних параметрів рослинної сировини належать вологість, вміст екстрактивних речовин, питома, насипна та об'ємна густина, пористість, нарізність, вільний об'єм шару сировини, величина та поверхня часток рослинної тканини, плинність, кут природного укусу, швидкість і величина набухання сировини, поглинання сировиною екстрагенту, коефіцієнт вимивання, коефіцієнт дифузії речовин всередині сировини тощо [82]. Питома, насипна та об'ємна густина дозволяють визначити пористість, нарізність і вільний об'єм шару, що дає можливість встановити необхідні співвідношення сировини та екстрагенту.

1.3. Використання методів біотехнології в культивуванні лікарських рослин

Лікувальна дія рослин пов'язана зі специфічними біологічно активними речовинами (БАР), що містяться в них. Ці речовини поділяються на декілька груп, а саме: алкалоїди, глікозиди, сапоніни, слизи, дубильні речовини, леткі олії, фітонциди, вітаміни, органічні кислоти, мінеральні солі, мікроелементи, ферменти, гормони тощо. Вони є, первинними та вторинними продуктами біосинтезу рослин і, відповідно, склад і терапевтична дія в них різна [1].

Клінічно доведено, що природні БАР, виділені з лікарських рослин (ЛР), порівняно з синтетичними, легко включаються в процеси обміну, практично не мають побічних ефектів. Чимало з них є попередниками фізіологічно-активних речовин (гормонів, медіаторів). Згідно з останніми дослідженнями, широкі фармакологічні властивості БАР пов'язані з їхньою комплексністю [4]. Одним із основних способів забезпечення фармацевтичної промисловості рослинною сировиною є створення промислових плантацій, що призвело до стрімкого скорочення їх в природі [83]. Деякі з них відносяться до рідкісних і зникаючих видів, багато рослин довго відновлюють свої площі вирощування.

Актуальною є проблема збереження генофонду, як культурних видів, так і дикорослих рослин, що представляють собою цінний селекційний матеріал та джерело унікальних комплексів БАР. Рослини що ростуть тільки в Українських Карпатах (ендемичні види), мають особливе значення. До цієї групи з-поміж інших належать аконіт низький (*Aconitum nanum*), первоцвіт полонинський (*Primula poloninensis*), смородина карпатська (*Ribes carpaticum*), дзвоники карпатські (*Campanula carpatica*), ломикамінь карпатський (*Saxifraga carpatica*), айстра альпійська (*Aster alpinus*), відкашник татарниколистий (*Carlina onopordifolia*), зозулинці (*Orchis mascula*), любка дволиста (*Platanthera bifolia*), любка зеленоцвіта (*Platanthera chlorantha*), офрис (всі види) (*Ophrys L.*), пальчатокорінники (всі 10 видів) (*Dactylorhiza*), плаун-баранець (*Lycopodium selago*), плаун колючий (*Lycopodium annotinum*), росичка кругло листа (*Drosera rotundifolia*), скополія

карніолійська (*Scopolia carniolica*), тирлич жовтий (*Gentiana lutea*), тирлич крапчастий (*Gentiana punctata*), цибуля ведмежа (*Allium ursinum*), косаріки черепитчасті (*Gladiolus imbricatus*).

Фармацевтичні продукти, ароматичні речовини, прянощі, барвники, біостимулятори, отримані з вищих рослин, мають складну хімічну будову, багато з таких хімічних сполук або не можна, або надзвичайно важко синтезувати хімічним шляхом. Внаслідок зменшення природних запасів необхідно шукати відповідні нові джерела для виробництва БАР.

Основним, а інколи єдиним джерелом різноманітних високоактивних хімічних сполук є рослини, більшість з видів яких не вирощуються промисловим способом, а складність хімічного складу багатьох БАР виключає можливість проведення їхнього хімічного синтезу [23]. Внаслідок цього розроблення біотехнологічних способів одержання БАР з біомаси культивованих *in vitro* тканин та клітин рослин є реальною альтернативою іншим шляхам їх одержання.

Клітини рослин можна вирощувати в штучних умовах на поживних середовищах необмежено довго, при цьому частину біомаси можна використовувати для отримання цільового продукту, а частину пересаджувати на свіже живильне середовище для відновлення культури. Незалежність від впливу різних факторів навколишнього середовища (клімат, сезон, погода, ґрунтові умови, шкідники), більш високий вихід і екологічно безпечна якість продукту роблять привабливою технологію культури клітин і тканин для виробників [84].

Доцільність застосування біотехнологічних методів для одержання БАР з культури тканин і клітин лікарських рослин стала очевидною, коли було показано збереження у них здатності до синтезу вторинних метаболітів. Численні дослідження вчених показали здатність накопичувати ті чи інші вторинні метаболіти в культурі клітин рослин в більшій кількості, порівнянно з вихідною рослиною [15]. Так, було отримано значно вищий вміст фенольного продукту феругінолу та червоного пігменту криптотаншину у суспензійній культурі шавлії китайської (*Salvia miltiorrhiza*), інуліну в культурі клітин цикорію (*Cichorium intybus*) порівняно із коренями цілої рослини. [16]. Великим успіхом в галузі

генетичної інженерії є створення нового сорту рису, що отримав назву «Золотий». Особливість і цінність цього рису – підвищений вміст провітаміну А, заліза і фолієвої кислоти [6].

Серед клітинних технологій в окрему галузь виділено біотехнологію одержання з біомаси культивованих *in vitro* клітин особливо цінних БАР для використання в косметичній, харчовій, а також у медичній промисловості [18,24]. Зокрема, якщо раніше лікарською сировиною слугували лише цілі лікарські рослини або їхні частини, то тепер у багатьох випадках — біомаса ізольованих клітин або органів лікарських рослин, що вирощуються у стерильних умовах *in vitro*.

На основі методів клітинної біотехнології створюється також ЛРС з новими властивостями. Наприклад, вирощування клітин у повністю контрольованих умовах дозволяє в разі потреби насичувати біомасу будь якими макро- чи мікроелементами, певною мірою регулювати її вітамінний та амінокислотний склад. [85,86].

Важливою особливістю застосування методів *in vitro* є можливість працювати практично з будь якими експлантами рослин, започатковуючи різні типи асептичних культур з подальшою регенерацією рослин. Технології збереження генофонду рослин *in vitro* можуть бути використані тільки при наявності розроблених методик культивування в асептичних умовах, але ефективні відтворювані технології культивування *in vitro* на даний час розроблено для відносно обмеженої кількості видів, хоча це коло постійно розширюється [26].

1.4. Технологічні аспекти культивування рослин в умовах *in vitro*

Виробництво БАР за допомогою рослинних клітин, як технологічний процес, має ряд труднощів у порівнянні з налагодженою мікробною ферментацією [17]:

- рослинні клітини ростуть набагато повільнішими темпами з подвоєнням близько 40 год (порівняно з 0,3 год для деяких бактерій). Отже, витрати пов'язані з поколінням клітин набагато більші;
- потужність виробництва, як правило, нижча. Наприклад, незважаючи на кілька років оптимізаційних досліджень продуктивність шиконіну з безперервної

культури *Lythospermum erythrorhizon* становить 0,1 г, а продуктивність пеніциліну з гриба *Penicillium crysogenum* 3,2 г [15,16];

- рослинні клітини накопичують метаболіти в вакуолях, лише невелика їх кількість виділяється у середовище.

Клітини рослин більш чутливі до зміни умов, ніж клітини бактерій або дріжджів, що вимагає набагато м'якшої аерації.

Для підвищення продуктивності культивованих клітин широко і в багатьох випадках успішно застосовують:

- клітинну селекцію, що ґрунтується на спонтанних і на індукованих мутаціях в культурі клітин;
- оптимізацію умов вирощування і складу поживних і продукційних середовищ;
- інтенсифікацію процесів біосинтезу за рахунок удосконалення конструкцій біореакторів;
- культивування диференційованих культур, клітин чи індукцію диференціювання; використання еліситорів.

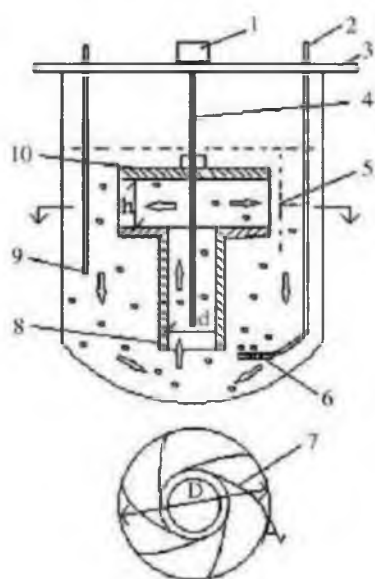
Проектування та експлуатація біореакторів в основному визначається біологічними потребами і технічними вимогами, які часто включають в себе цілий ряд факторів: ефективність передачі кисню, перемішування, низькість гідродинамічного опору, ефективність контролю фізико-хімічних параметрів середовища тощо. Оскільки деякі з цих факторів можуть бути суперечливі, тому важко безпосередньо використовувати звичайний мікробний реактор [25].

Нещодавно було розроблено біореактор з гвинтово-стрічковою крильчаткою, що ефективно використовується для рослинних клітин, які мають високу щільність. Ці біореактори характеризуються рівномірним гідродинамічним тиском, перемішуванням з достатнім запасом кисню і без зайвого піноутворення, флотацією біомаси.

Тип біореакторів має особливе значення у разі виробництва БАР. Доведено, що біореактори, розроблені для мікроорганізмів, не придатні для клітин рослин, тому що механічне перемішування спричинює швидке руйнування клітин і порушує

стерильність клітинної культури. Це призвело до потреби конструювання аероліфтних ферментерів з контрольованою подачею повітря. Клітини в них не руйнуються й інфікуються значно менше. Крім того, витрачається менше енергії внаслідок відсутності механічного перемішування клітин. Цей тип реакторів вдосконалюється і знаходиться в прямій залежності від розробок нових технологій, якими є іммобілізовані системи.

Кілька років тому було успішно розроблено біореактор з відцентровою крильчаткою (рис. 1.1.) [36]. Новий біореактор має ряд переваг в порівнянні з широко застосовуваними біореакторами.



Він включає в себе набагато більшу підйомність води, забезпечує краще перемішування, знижує напругу зсуву і турбулентність рідини на поверхні, що може викликати серйозні втрати життєздатності клітин. Конструкція цього біореактора була визнана одною з найбільш відповідних конструкцій для масового виробництва клітинних культур рослин.

Рис. 1.1. Біореактор з відцентровими крильчатками:

1 – магнітна мішалка; 2 – газ; 3 – головна пластина; 4 – агітаторний вал; 5 – вимірювання профілів швидкості розряду рідинного потоку; 6 – нержавіючий розбризкувач; 7 – відцентрові леза; 8 – проекторна трубка; 9 – зонд; 10 – відцентрово-обертовий вал.

Під час оцінки схем для виробництва БАР важливо знати, що синтез вторинного продукту клітин рослин не завжди збільшується паралельно з виробництвом біомаси і що умови сприяння швидкому росту часто пригнічують метаболізм і накопичення продуктів. У такій ситуації найприйнятнішим методом є іммобілізація культури клітин. Цим методом клітини, що знаходяться в пізній стаціонарній фазі, вводяться в належний матрикс і використовуються для виробництва метаболітів завдяки процесу безупинного потоку.

Дійсною альтернативою масовому використанні дикорослої рослинної сировини є біотехнологія рослинних клітин, яка полягає у вирощуванні окремих

клітин в біореакторах. Ця технологія має низку переваг, до яких передусім належать висока швидкість росту і незалежність виробництва від погодних умов. Штучно одержану відфільтровану біомасу в подальшому обробляють так само, як натуральну, тобто сушать, екстрагують, очищують, розливають тощо. На початку 60-х рр. Цей напрям біотехнології почали освоювати у промислових масштабах [38].

Мікроклональне розмноження має певні переваги порівняно з традиційними способами: вирощування в штучних умовах, які контролюються, із меристематичних тканин дає можливість досягти елімінації вірусів та інших патогенних мікроорганізмів і отримати здоровий садивний матеріал; ріст рослин можна підтримувати протягом багатьох років; можна застосовувати для форм рослин, які не розмножуються вегетативно або не дають життєздатного насіння; можливість вести відбір генотипів, стійких до несприятливих зовнішніх умов (екстремальні температури, засолення та закислення субстрату, пригнічуюча дія гербіцидів тощо) а також продуктивніших форм; швидкість та коефіцієнт розмноження досягає 1:1000000 і дає можливість в 2–3 рази пришвидшити отримання нових рослин для селекційних досліджень та для отримання цінної біомаси лікарських рослин [30].

Ізольовані клітини, тканини та органи рослин у культурі *in vitro* зберігають здатність до біосинтезу речовин спеціалізованого обміну і можуть бути джерелом економічно важливих продуктів метаболізму [31]. Вони також спроможні до біотрансформації, тобто здатні перетворювати дешеві продукти переробки чи відходи на цінні продукти. Наразі у виробництві широко використовують культуру тканин і клітин для одержання як нових форм рослин, так і клітинної біомаси — джерела БАР.

Серед методів клонального мікророзмноження розрізняють активацію вже існуючих меристем та індукцію виникнення організованих структур (бруньок чи ембріоїдів) *de novo* безпосередньо з ізольованих тканин експлантів чи первинного калюсу. Успіх мікророзмноження залежить від генотипу і стану донорної рослини, розміру і морфогенетичного потенціалу експланту та особливостей введення в

культуру *in vitro* (режим стерилізації, умови культивування, склад живильного середовища і вміст у ньому регуляторів росту) [34].

Насамперед культивування фрагментів тканини або органу рослини – експлантів, а тим більше окремих клітин, вимагає дотримання повної асептики. Мікроорганізми, які можуть потрапити в живильне середовище, виділяють токсини, які інгібують ріст клітин і призводять культуру до загибелі. Тому при всіх маніпуляціях з клітинами і тканинами при культивуванні *in vitro* дотримуються певних правил асептики в ламінарному боксі або в асептичних кімнатах. У першому випадку асептика досягається подачею профільтрованого стерильного повітря, направленою з ламінкар-боксу назовні, на працюючого. Асептичні кімнати стерилізують за допомогою ультрафіолетових ламп, а працюють в таких приміщеннях в стерильному одязі. Робочу поверхню столів в асептичних кімнатах та інструменти перед роботою додатково стерилізують спиртом.

Основною умовою успішного введення в культуру *in vitro* є використання стерилізуючих агентів, які б забезпечували позбавлення від грибової і бактеріальної інфекції на зовнішній поверхні насіння без ушкодження внутрішніх тканин, а також легко вилучалися із тканини промиванням дистильованою водою.

Рослинні тканини самі по собі можуть служити серйозним джерелом зараження, так як на їх поверхні завжди знаходиться епіфітна мікрофлора. Тому необхідна поверхнева стерилізація, яку проводять наступним чином. Попередню частину рослини, з якої буде взятий експлант, промивають водою. Потім рослинний матеріал стерилізують у розчинах різних дезінфікуючих речовин.

Сучасний рівень прикладних методик біотехнології рослин дозволяє використовувати як експланти практично будь-який орган інтактною рослини, хоча при виборі експланта необхідно враховувати генотип, фізіологічний стан та фазу онтогенезу інтактною рослини, а також походження тканини експланта, його розмір і локалізацію [92].

Ізольовані тканини культивують на твердих агаризованих живильних середовищах. Усі ізольовані культури культивують при спеціальних умовах:

вологість– 70%, температура– 26-28°C, фотоперіод– 16 год, освітлення 3000-4000 лк [93].

Розроблені технології вирощування рослин застосовують у різних галузях промисловості. У біотехнології відомі способи одержання біомаси калусних тканин деяких лікарських рослин - продуцентів БАР: ломиносу виноградолистого (*Clematis vitalba*), женьшеню (*Panax zingiberensis*), діоскореї (*Dioscorea*), княжика сибірського (*Clematis alpina*), гінкго дволопатевого (*Ginkgo biloba*), плюща (*Hedera helix*), полісцеасу кушового (*Polyscias fruticosa*). Для виробництва косметичної продукції культивують калусні культури лавсонії (*L. inermis*) [94], а для виробництва таблеток екдистероїдів – серпію увінчатого (*Serratula coronata L.*).

Культивування гладіолусів

Види гладіолусів мають велике значення в садівництві і у використанні як квіткової продукції. Різні сорти цього роду рослин слугують цінним генетичним матеріалом. Також є дані щодо лікувальних властивостей різних видів гладіолусів. Так, метанольні екстракти цибулин *Gladiolus psittacinus* оцінювали за їх антидіабетичною дією у щурів з індукованим аллоксаном цукровим діабетом. Рівень глюкози в сироватці крові і в крові щурів з індукованим аллоксаном цукровим діабетом оцінювали протягом 180 хвилин ферментативним, глюкозооксидазним методом. Екстракт цибулин при введенні дози в кількості 1 г/кг показав зниження рівня глюкози в крові на 16,2% в сироватці крові здорових щурів і максимальний ефект 78,9% у щурів з індукованим аллоксаном цукровим діабетом. Це дослідження показує можливий позитивний ефект екстрактів *Gladiolus psittacinus* у лікуванні інсулінзалежного цукрового діабету [95]. Також відоме народне застосування *G. Imbricatus* [96].

У 1970р. вперше опубліковано повідомлення про метод розмноження роду *Gladiolus* через культуру *in vitro* [33].

Дослідження культивування *in vitro* рідкісного дикого виду *G. Imbricatus*, який є фондом важливих генів цього роду, що володіють стійкістю до абіотичних і біотичних стресів, показали, що при збереженні до одного року на середовищі Мурасіге-Скуга, при низькій температурі, в темноті, 25% рослин можуть бути

успішно відновлені. Методи клонального мікророзмноження були розроблені для *G. imbricatus* [35].

1.5. Висновки до розділу

1. На даний час на ринку України присутня велика кількість іноземних фітопрепаратів. Одна з причин відсутності вітчизняних препаратів – це відсутність достатньої кількості і асортименту ЛРС для їх виготовлення. Вирішення нагальних проблем лікарського рослинництва України дасть можливість суттєво збільшити обсяги заготівлі лікарської продукції, забезпечити в достатній кількості фармацевтичну промисловість якісною сировиною та створити гідну конкуренцію іноземним фармацевтичним виробникам лікувальних засобів, виготовлених на основі рослинної сировини.
2. Проаналізувавши дані щодо сировинної бази України для виробництва фітопродукції (наявність дикорослої природної сировини, її запаси, доцільність вирощування на плантаціях) можна стверджувати, що вирощування методом культури клітин, тканин та органів в умовах *in vitro* є перспективним шляхом вирішення даної проблеми. Важливим при одержанні клітинних культур, суперпродуцентів вторинних метаболітів, є оптимізація умов культивування.
3. На сьогоднішній день біотехнологічні метод культивування рослин в умовах *in vitro* використовується досить часто, вони дають високі результати завдяки своїй економічності, швидкості утворення потрібного матеріалу та можливості контролювати кожен з етапів. Клітини рослин, на відміну від вирощування рослин у відкритому ґрунті, де вони часто зазнають неконтрольованого впливу біотичних та абіотичних факторів навколишнього середовища, можна культивувати в контрольованих умовах на поживному середовищі певного складу, культивування клітин рослин у ферментерах забезпечує постійне

одержання свіжого матеріалу упродовж року незалежно від кліматичних і сезонних змін.

4. Вірогідно вже найближчими роками хімічне виробництво органічних матеріалів буде широко застосовувати природні сировинні бази. Із біомаси рослин будуть виділяти продукти метаболізму, передусім первинного, такі як крохмаль, вищі жирні кислоти, гліцериди, білкові компоненти, вітаміни та деякі полімери. Рослини використовуватимуться як джерело екоприйнятних пестицидів та барвників, лікарських засобів тощо. Увага до проблеми заміни нафтової сировини на біомасу знову спонукає дослідників до активного подальшого пошуку нових продуктів технічного та побутового призначення з крохмалю і целюлози, природних жирних кислот та спиртів. Не виключено, що на ринок повернуться деякі «старі» продукти з целюлози, крохмалю татерпеноїдів, які було витіснено чисто синтетичними продуктами. З другого боку, поява на ринку доступних хімікатів з біомаси у значних обсягах буде важливим стимулом для розширення сфер застосування та створення нових проміжних і кінцевих продуктів.
5. Проведений огляд літератури показав, що екстрагування цільових компонентів з рослинної сировини характеризується складним механізмом порівняно з мінеральною сировиною. Складність полягає в тому, що структура рослинної сировини є складною і не достатньо вивченою. Складність процесу екстрагування полягає в тому, що процес вилучення цільових компонентів включає дві основні стадії – внутрішню і зовнішню дифузю, а швидкість всього процесу визначається найбільш повільною стадією, визначення якої дає можливість намітити шляхи інтенсифікації процесу. Складність процесу екстрагування полягає ще в тому, що він супроводжується з процесами осмосу, просочення, набухання сировини та ряд інших.

Всі ці проблеми викликають необхідність проведення як теоретичних так експериментальних досліджень з метою визначення молекулярно-кінетичних констант, необхідних для розрахунку та вибору ефективної апаратури.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти дослідження

Об'єктом для досліджень було обрано траву, бульбоцибулини та квіти косариків черепитчастих (*Gladiolus imbricatus*) із природної популяції (Українські Карпати, с. Новий Мізунь), насіння з колекції ботанічного саду Львівського Національного Університету ім. Ів. Франка та калусну біомасу *G. imbricatus* з ізольованих клітин, що були вирощені в стерильних умовах *in vitro* в ході експерименту.



Рід *Gladiolus* L. у останньому зведенні системи *Iridaceae* Juss. нараховує близько 250 видів. Для природної флори України вказується чотири види роду, серед яких косарики черепитчасті (*Gladiolus imbricatus* L.) є найпоширенішими.

Косарики черепитчасті (*G. imbricatus*) — багаторічна рослина з подвійною бульбоцибулиною, заввишки 50–120 см. Бульбоцибулина округла, до 2 см завширшки. Стеблових листків 4–6. Серед них 1–2 — лускоподібні (низові), 2–3 — широколінійні або мечоподібні, 9–20 мм завширшки (серединні) та 1–2 — вкорочені (верхові). Суцвіття — однобічний короткий колос (7–11 см завдовжки) з 5–12 квіток. Оцвітина зигоморфна, 25–35 мм завдовжки та 30–40 мм завширшки, пурпурово-лілового кольору. Частинки оцвітини овальні, дещо перекриваються, внизу зростаються у коротку, трохи вигнуту трубку, що сидить в обгортці з двох ланцетних приквіток з нижніми вузькоплівчастими краями. Плід тристулкова обернено-яйцеподібна багатонасінна коробочка. Насінини плескуваті, овальні, крилаті, 4–6 мм завдовжки, коричневі. Цвіте в червні – серпні, плодоносить у вересні–жовтні. Поновлюється вегетативно та насінням.

G. imbricatus рідкісний дикорослий вид, належить до родини Півникові (*Iridaceae*). Ростає в Центральній Європі, Середземномор'ї. В Україні поширений в Карпатах, на Поліссі та Розточчі. Ростає переважно на вологих і заболочених луках, а також на узліссях, просіках, у рідколіссях, чагарниках на висоті від 100 до 1450 м.

Останнім часом цей вид поступово зникає з природних угруповань на території нашої країни, у зв'язку з чим внесений до останнього видання Червоної книги України зі статусом "вразливий". Чисельність зменшується в результаті пасовищного та рекреаційного навантаження, осушувальної меліорації з наступним розорюванням територій. У локалітетах, що розташовані поблизу населених пунктів, та в зонах рекреації рослини під час цвітіння зривають на букети.

Охороняється він і у інших країнах, зокрема Білорусі, Казахстані, Латвії, Литві, Молдові, Німеччині, Польщі, Росії, Словаччині, Угорщині, Чехії [97].

Це декоративна рослина, що має перспективу використання у квітникуарстві для облаштування квітників, садово-паркових ландшафтів та на зріз. Однією з переваг природних видів *G. imbricatus* при вирощуванні в культурі є те, що вони добре зимують в ґрунті і не потребують щорічного викопування та пересадки. *G. imbricatus* вважається одним із найбільш зимостійких видів.

G. imbricatus мають також лікарські властивості. У народній медицині рослина використовується у вигляді відвару, як знеболювальний, протизапальний, протиревматичний, ранозагоювальний, вітамінний, сечогінний і лактогенний засіб. Володіє протівірусною, антибіотичною, бактерицидною, в'язучою, тонізуючою, заспокійливою та іншими діями. Настій цибулин використовують при алергії. Свіже запарене листя або свіжі дрібно посічені бульби прикладають до гнійних ран, виразок тощо. Шкірні захворювання лікують примочками з міцного відвару бульб. Згідно літературних даних косарики черепитчасті (*G. imbricatus*) містять у своєму складі крохмаль, цукри, вітаміни, естерні олії, велику кількість вітаміну С і мінералів.

Культивуванням рослин в умовах *in vitro* на даний час проводиться для одержання як нових форм рослин, так і клітинної біомаси. Біомаса, одержана *in vitro*, отримується у необмеженій кількості і може бути використана як лікарська

сировина, бо є екологічно чистою, не забрудненою хімічними добривами, пестицидами, гербіцидами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо. Деякі з таких культур накопичують у 10–30 разів більше цільового продукту, ніж природні рослини. Відомо, що деякі речовини перевищують вміст у рослині в 100 разів, як це описано, наприклад, для клітин раувольфії зміїної, які здатні накопичувати до 20% алкалоїду аймаліну [29].

Дані щодо дослідження хімічного складу та вирощування *G. imbricatus* в культурі *in vitro* в Україні в літературі не достатньо описані. Тому необхідно було дослідити компонентний склад рослини *G. imbricatus* та вирощеної в культурі *in vitro*, з'ясувати, які основні групи БАР містяться в ній, та пов'язати хімічний склад з фармакологічною активністю (згідно даних народної медицини).

2.2. Підготовка об'єктів дослідження для екстрагування та фітохімічного аналізу.

Якісний склад та кількісний вміст БАР визначали фармакопейними методами. Для цього готували водні, спиртово-водні та хлороформні екстракти та настойки (методом мацерації) з дикорослої рослинної сировини та сировини *G. imbricatus* культивованого в умовах *in vitro*.

Траву, квіти та бульбоцибулини *G. imbricatus* сушили в добре провітрюванному приміщенні без доступу світла при кімнатній температурі. Повітряно-суху рослинну сировину попередньо подрібнювали та просіювали на наборі сит у межах від 1 – 6,3 мм. Далі рослинну сировину вичерпно екстрагували в апараті Соксклета з різними екстрагентами. Екстракцію проводили при відношенні сировина екстрагент 1:10 до повного виснаження сировини. Одержані екстракти фільтрували крізь паперовий фільтр під вакуумом, створеним водоструменевим насосом. Розчинник відганяли, а залишок упарювали.

Отримані густі екстракти розчиняли в тому ж розчиннику, який був використаний при екстракції і використовували для якісного та кількісного фітохімічного аналізу.

2.3. Фітохімічний аналіз одержаних екстрактів

2.3.1. Ідентифікація БАР в екстрактах *G. imbricatus*

За допомогою якісних хімічних реакцій визначали наявність в екстрактах *G. imbricatus* діючих речовин, а саме флаваноїдів, аскорбінової кислоти, дубильних речовин, органічних кислот, полісахаридів, хінонів та хіноїдних сполук. Дослідження проводили за стандартними методиками з використанням реактивів «Sigma-Aldrich» і «Merk» [133].

2.3.2. Ідентифікація флаваноїдів

Для аналізу готували зразки водно-спиртової витяжки подрібнених листків *G. imbricatus*. Для цього 2,5г сухої сировини поміщали в колбу місткістю 250мл, додавали 75мл етилового спирту різної концентрації (40%, 50%, 60%, 70%), після чого колбу із зворотним водяним холодильником нагрівали на водяній бані протягом 30 хв., екстракт охолоджували і фільтрували [20].

Для порівняльного аналізу суми флаваноїдів в одержаному екстракті застосовували метод фотоколориметрії за ступенем комплексоутворення з хлоридом алюмінію. Для цього в мірну колбу ємністю 25мл поміщають 1мл екстракту, приготовленого за вищевказаною методикою, 2мл розчину алюмінію хлориду і доводять об'єм розчину 95%-им спиртом до мітки. Через 40хв. вимірюють оптичну густину розчину на КФК в діапазоні 365-400 нм в кюветах з товщиною поглинаючого шару 10мм. Як розчин порівняння використовують розчин, який складається з 1мл екстракту і 1 краплі оцтової кислоти і доведений 95%-им спиртом до мітки в мірній колбі ємністю 25мл. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину стандартного зразка кверцетину.

Вміст сухого залишку та суми флаваноїдів визначали відповідно до фармакопейних методик [133].

Вміст суми флаваноїдів в перерахунку на кверцетин і абсолютно суху сировину X, %, обчислювали за формулою:

$$X = D \times m_0 \times 100 \times 100 \times 100 / D_0 \times m \times 100 \times (100 - W),$$

де D – оптична густина використовуваного розчину;

D_0 – оптична густина фармакопейного зразка кверцетину;

m – маса сировини, г;

m_0 – маса фармакопейного зразка кверцетину, г;

W – втрата в масі при вичушуванні сировини, %.

Наявність флаваноїдів проводили методом тонкошарової хроматографії. Використовували пластинки TLS Silicagel 60, 20×20см фірми Merk, Німеччина. Як елюент використовували: хлороформ-метанол-етилацетат (85:15:3). Пластини нагрівали при температурі 100-120⁰С. Візуалізацію проводили в Уф- світлі, за специфічною флуоресценцією. Контролем служили водно-спиртові екстракти з трави *G. imbricatus* [133].

2.3.3. Кількісне визначення ряду груп БАР *G. imbricatus*

Кількісне визначення БАР рідких екстрактів *G. imbricatus* проводили спектрофотометричним та титриметричним методами (комплексометричне титрування) [133]. Кількісний вміст суми гідроксикоричних кислот визначали за методикою, що базується на спектрофотометричному методі в перерахунку на хлорогенову кислоту, суми флавоноїдних глікозидів – за методикою ДФУ I видання, в розрахунку на гіперозид [11], дубильних речовин – комплексометричним методом за ДГСТ4565-79 [13], суми катехінів – за спектрофотометричним методом в розрахунку на (+)-катехін. Визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти (в розрахунку на аскорбінову кислоту), суми органічних кислот (в розрахунку на яблучну кислоту), суми окиснюваних фенолів проводили за методиками, викладеними ДФ СРСР XI видання [133]. Кількісне визначення вмісту водорозчинних полісахаридів у досліджуваній сировині проводили гравіметричним методом [11].

2.3.4. Визначення суми фенольних сполук

Визначення (в перерахунку на галову кислоту) проводили спектрофотометричним методом. Для цього готували стандартний розчин галової

кислоти: 0,01г галової кислоти розчиняли в мірній колбі місткістю 10 мл дистильованою водою до мітки. Далі готували розведення стандартного розчину галової кислоти від 1 мг/мл до 0,1 мг/мл. До 0,02мл кожного розведення стандартного розчину галової кислоти різної концентрації додавали по 1,58мл H₂O і 0,1мл реактиву Фоліна та витримували 8хв в темному місці. Після чого, добавляли 0,3мл насиченого розчину Na₂CO₃ і знову ставили в темне місце на 2 год. Аналогічно готували досліджувані розчини.

Оптичну густина вимірювали при довжині хвилі 760 нм на спектрофотометрі Hitachi U-2810. Для достовірності даних проводили 3-ох кратне вимірювання.

2.3.5. Визначення компонентного складу БАР *G. imbricatus*.

Компонентний склад БАР екстрактів *G. imbricatus* визначали хромато-мас спектрометричним методом на хроматографі Agilent Technology HP6890 GC з мас-спектрометричним детектором 5973N. Компоненти розділяли на кварцовій капілярній колонці фірми HP довжиною 30 м та внутрішнім діаметром 0,32 мм, товщина шару 0,25 мкм. Газ-носій – гелій. Швидкість руху газу-носія 2,0 мл/хв. Температура детектора та випаровувача 280°C. БАР ідентифікували, порівнюючи отримані мас-спектри з даними бібліотеки NIST 11.L.

Аналіз вмісту фенолів та флаваноїдів проводили методом високо рідинної хроматографії на рідинному хроматографі Ultimate 3000 Dionex HPLC Systems з фотодіодним детектором (PDA) і за допомогою програмного забезпечення 6.8 Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Розподіл проводили на хроматографічній колонці Gemini 5u C-18 250×4,6 мм (Merck, Darmstadt, Germany, розмір часток 5 мкм) з рухомою фазою, що складається з 0,01 моль / л водного фосфатного буфера рН 2,5 (розчинник А) і метанол (розчинник В). Застосовували постійну швидкість потоку розчинника (1 мл / хв). Була застосована наступна схема градієнтних режимів (відношення А / В): 10: 90% t = 0 хв; 40: 60% t = 13,5 хв; 90: 10% t = 39 хв; 100: 0% t = 42 хв; 10: 90% t = 55 хв. Температура термостата колонки була встановлена на 30°C. Детектування хроматограми проводилось при 214 і 280 нм, оскільки більшість фенольних сполук показали максимум їх поглинання.

Порівняння УФ-спектрів і часу утримування стандартних зразків дозволив визначити наявність фенольних кислот і флавоноїдів в аналізованих екстрактах.

2.4. Методика досліджень кінетики екстрагування цільового компоненту з *G. imbricatus* в апараті з мішалкою

Дослідження кінетики виділення цільових компонентів з *G. imbricatus* здійснювали на установці в апараті з мішалкою, поданий на рис. 2.1.

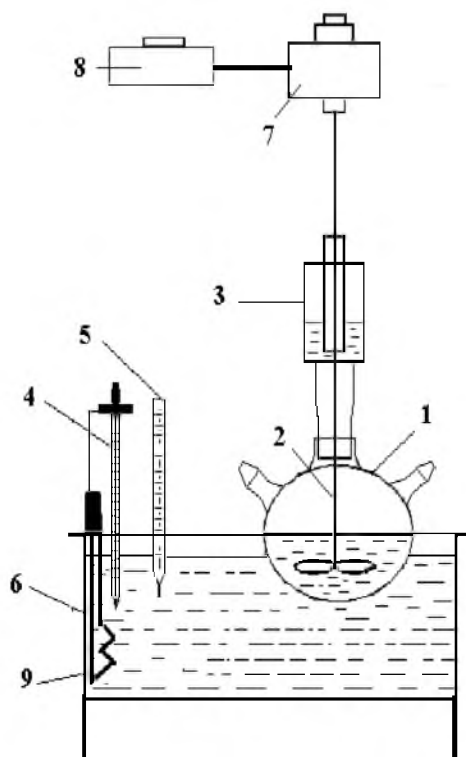


Рис. 2.1. Схема експериментальної установки апарата з мішалкою:

- 1 – тригорлова колба;
- 2 – мішалка;
- 3 – вакуум-затвор;
- 4 – контактний термометр;
- 5 – контрольний термометр;
- 6 – термостат;
- 7 – двигун;
- 8 – реостат;
- 9 – тен.

Методика проведення експериментів. Рослинну сировину *G. imbricatus* розсіювали на окремі фракції на наборі сит у межах від 1 – 6,3 мм з одержанням фракції з середнім діаметром $d_c = 1,6; 2,5; 4$ мм. Окрему фракцію *G. imbricatus* масою 50 г засипали в колбу ємністю 1 дм³, куди одночасно завантажували розчинник об'ємом 500 см³.

Процес екстрагування проводили в колбі 1, яка була розміщена в термостаті 6, при постійному перемішуванні і температурі 20, 30 та 40 °С, яка задавалась контактним термометром 4. Екстрагування відбувалося при сталому числі обертів мішалки 120 об/хв. Через певні проміжки часу 120, 240, 360, 480, 600 хв відбирали

проби об'ємом 50 мл, які після фільтрації аналізували на вміст цільових компонентів в розчині на фотоелектроколориметрі.

Для відокремлення твердих залишків відібрану пробу фільтрували у конічну колбу через паперовий фільтр під вакуумом, який створювали водоструминним насосом. Для збереження балансу розчинника, кожного разу після відбору проби, в реакційну колбу додавали відповідну кількість чистого розчинника. Таким чином, об'єм розчинника залишався постійним, а вміст цільового компоненту в колбі зменшувався. Тому при розрахунку концентрації цільового компоненту вводилася поправки на зміну концентрації.

При відборі другої та інших проб концентрацію цільового компоненту обчислювали, враховуючи масу цільового компоненту, яка була вилучена в процесі відбору проб, за формулою:

$$C_2 = \frac{m_2 + m_1^{олії}}{V_{розчинника}} \quad (2.1)$$

$$C_n = \frac{m_n + \sum(m_1^{олії} + \dots + m_{n-1}^{олії})}{V_{розчинника}}, \text{ г/л}; \quad (2.2)$$

де $m_n = \frac{m_n^{олії} \cdot V_{розчинника}}{V_{проби}}$ – маса цільового компоненту в 0,5 л чистого розчинника, г; $m_1^{олії}$, $m_n^{олії}$ – маса цільового компоненту в першій та n -ій пробі, г; C_n – концентрація цільового компоненту в n -ій пробі, г/л.

2.5. Методика досліджень кінетики екстрагування цільового компоненту з *G. imbricatus* в апараті Сокслета та визначення максимального виходу цільового компоненту з рослинної сировини

2.5.1. Методика дослідження кінетики екстрагування цільового компоненту в апараті Сокслета

Наважку рослинної сировини або висушеної калусної біомаси *G. imbricatus* поміщали у патрон з фільтрувального паперу, який завантажували екстрактор. У

колбу заливали розчинник і приєднували до екстрактора. Процес екстрагування проводився при температурі кипіння розчинника, на протязі 6 годин. Нагрів колби до температури кипіння розчинника здійснювали в термостаті дистильованою водою. Для конденсації парів та подачі конденсату в зону екстрагування до екстрактора був приєднаний зворотний холодильник. Через певні проміжки часу процес екстрагування зупиняли. Після чого колбу охолоджували, відбирали пробу фільтрату. Далі добавляли чистий розчинник в кількості відібраної проби, після чого знову нагрівали до температури кипіння розчину.

Відібрані проби фільтрували через паперовий фільтр за допомогою вакуум насоса та аналізували на вміст екстрактивних речовин. Концентрацію цільового компоненту визначали згідно поданої вище методики.

2.5.2. Визначення максимального виходу цільового компоненту з *G. imbricatus*

Наважку сировини (50 г) поміщали у патрон з фільтрувального паперу 2, який завантажувалив екстрактор 3. У колбу 1 заливали 500 мл розчинника, після чого приєднували її до екстрактора 3. Для запобігання втрат розчинника до екстрактора 3 приєднували холодильник-конденсатор 4, через який для охолодження системи пропускали потік холодної води. Процес екстрагування проводили при температурі кипіння розчинника, яку підтримували за допомогою термостата 5, який забезпечений контактним термометром 8.

Процес закінчували через 8-10 годин, до повного вилучення цільового компоненту. Одержаний екстракт фільтрували через паперовий фільтр під вакуумом, створеним водоструменевим насосом. Вміст екстрактивних речовин в розчині визначали за методикою ДФ СРСР XI видання [133].

2.6. Методика ведення в культуру *in vitro* насіння та бульбоцибулин *G.imbricatus*

Ефективним при введенні в культуру *in vitro* рослини є отримання асептичних проростків шляхом пророщування простерилізованого насіння. Перешкодою цьому

може бути стан органічного спокою насіння, умови та ступінь дозрівання, термін зберігання, тривалість стратифікації.

Для отримання асептичних проростків насіння *G.imbricatus* стратифікували у розчині гіберелової кислоти в різних концентраціях (0,1 мг/л; 0,01 мг/л; 0,001 мг/л) протягом однієї доби, потім стерилізували 98%-ним етиловим спиртом протягом 5 хв та різними стерилізаторами (розчинами гіпохлориду, пероксиду водню та сулеми) та промивали в трьох склянках дистильованої води. Далі висаджували у стерильні чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасиге-Скуга (МС). У кожную чашку Петрі окремо висаджено близько двадцяти насінин *G.imbricatus*. Насіння пророщено на світлі (2000 лк) з періодом 16 год/добу при температурі +22°C, вологості 80%, а також у термостатованих умовах при цій же температурі за відсутності освітлення.

2.7. Методика культивування біомаси *G. imbricatus*

Культивування проводили в лабораторних умовах поверхневим та глибинним методом.

Поверхнєве культивування здійснювали в ламінар-боксі типу ШЛВ-1, «Б.А.Т.», Україна, в умовах світла (2000 лк) при 16 годинному фотоперіоді та температурі 22-25 °С, в чашках Петрі на агаризованому живильному середовищі Мурасиге-Скуга з додаванням наступних фітогормонів різної концентрації: індолілоцтовою кислотою (ІОК), кінетином (Кін), 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК), гібереловою кислотою (ГК) та 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою (2,4-Д).

Вирощений таким методом калус, поміщали в ферментер, об'ємом 5 дм³ у різних модифікаціях на відповідному оптимізованому поживному середовищі. Робочий об'єм становив 2-3л. Стерилізацію ферментера проводили разом з поживним середовищем шляхом автоклавування протягом 40хв за температури 132°C.

Культури інкубували на світлі при +25-26,5°C. Їхнє субкультивування проводили через кожні 2 тижні. Культивування здійснювали за підтримки постійного значення рН (6-8). Підтримку заданого рН здійснювали додаванням 1н

розчинів NaOH та HCl. Температура культивування підтримувалась в межах 26-28°C завдяки термостатування зовнішнім змішувиком в оболонці реактора.

У процесі культивування здійснювали постійний контроль за значенням рН середовища, температурою та вмістом розчиненого кисню. Ці показники визначалися за допомогою автоматичного аналізатора «Експерт-001-4.0.1» (ООО «Еконікс-Експерт», Росія).

Перемішування маси здійснювали за допомогою магнітної мішалки MM-1000, NEW за швидкості 6 об/хв.

2.8. Математичні методи дослідження

Обробку даних виконували із застосуванням стандартних програм MathCAD. У MathCAD реалізована можливість виконання лінійної регресії загального виду. У ній задана сукупність точок наближається до функції виду:

$$F(x, K_1, K_2, \dots, K_n) = K_1 \cdot F_1(x) + K_2 \cdot F_2(x) + \dots + K_n \cdot F_n(x)$$

Таким чином, функція регресії є лінійною комбінацією функцій $F_1(x), F_2(x), \dots, F_n(x)$, при чому самі ці функції можуть бути нелінійними, що різко розширює можливості такої апроксимації та поширює її на безліч нелінійних функцій.

Для реалізації лінійної регресії загального виду використовується функція $fit(VX, VY, F)$, яка повертає вектор коефіцієнтів лінійної регресії загального виду, при яких середньоквадратична похибка наближення «хмари» вихідних точок, координати яких зберігаються у векторах VY стає мінімальною. Вектор повинен містити функції $F_1(x), F_2(x), \dots, F_n(x)$, записані у символьному виді.

Обробку даних здійснювали за методами варіаційної статистики та програми Origin 6.1.

2.9. Висновки до розділу.

1. Дано загальну характеристику об'єкту дослідження - *Gladiolus imbricatus* природної популяції та калусної біомаси з ізольованих клітин, що вирощені в стерильних умовах *in vitro*.

2. Описано методики визначення кінетики екстрагування БАР з рослинної сировини та калусної біомаси *G. imbricatus* в апараті з мішалкою та в апараті Сокслета.

3. Подано методику визначення максимального виходу БАР з рослинної сировини та калусної біомаси в апараті Сокслета.

РОЗДІЛ 3

КУЛЬТИВУВАННЯ *GLADIOLUS IMBRICATUS* В УМОВАХ *IN VITRO*

3.1. Загальна характеристика розділу

На даний час в аптеках України присутня велика кількість чужоземних препаратів. Одна з причин відсутності вітчизняних препаратів - це обмежена кількість лікарської рослинної сировини та її асортименту для їх виготовлення. Вирішення нагальних проблем лікарського рослинництва України дасть можливість суттєво збільшити обсяги заготівлі лікарської продукції, забезпечити в достатній кількості фармацевтичну промисловість якісною сировиною та створити гідну конкуренцію іноземним фармацевтичним виробникам лікувальних засобів, виготовлених на основі рослинної сировини.

Сучасні методи біотехнології пропонують шляхи вирішення проблеми, використовуючи методи вирощування клітин, тканин і органів рослин у контрольованих умовах на штучних живильних середовищах. Одержана рослинна біомаса отримується у необмеженій кількості і може бути використана як лікарська сировина, бо є екологічно чистою, не забрудненою хімічними добривами, пестицидами, гербіцидами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо.

Культивуванням рослин в умовах *in vitro* на даний час займаються в багатьох науково-дослідних та навчальних лабораторіях світу і України. У більшості випадків, культивування проводиться для одержання як нових форм рослин, так і клітинної біомаси. Зокрема, наведено конкретні результати біотехнологічних досліджень близько 300 родів лікарських рослин. Роботи в цій галузі ведуться в багатьох розвинених країнах світу і передусім тих, де було започатковано дослідження з культурами ізолюваних тканин рослин: США, Англії, Франції, Німеччині, Росії, а також у Японії, Індії, Китаї, Південній Кореї, Фінляндії, Угорщині й багатьох інших. Не останнє місце тут посідає й Україна. Деякі з таких культур накопичують у 10–30 разів більше цільового продукту, ніж природні

рослини. Відомо, що деякі речовини перевищують вміст у рослині в 100 разів, як це описано, наприклад, для клітин раувольфії зміїної, які здатні накопичувати до 20% алкалоїду аймаліну [29].

3.2. Введення в культуру *in vitro* насіння та бульбоцибулин *G.imbricatus*

Ефективним при введенні в культуру *in vitro* рослини є отримання асептичних проростків шляхом пророщування простерилізованого насіння. Перешкодою цьому може бути стан органічного спокою насіння, умови та ступінь дозрівання, термін зберігання, тривалість стратифікації.

Для отримання асептичних проростків насіння *G.imbricatus* стратифікували у розчині гіберелової кислоти в різних концентраціях (0,1 мг/л; 0,01 мг/л; 0,001 мг/л) протягом однієї доби, потім стерилізували 98%-ним етиловим спиртом протягом 5 хв та різними стерилізаторами (розчинами гіпохлориду, пероксиду водню та сулеми) та промивали в трьох склянках дистильованої води. Далі висаджували у стерильні чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасиге-Скуга (МС). У кожену чашку Петрі окремо висаджено близько двадцяти насінин *G.imbricatus*. Насіння пророщено на світлі (2000 лк) з періодом 16 год/добу при температурі +22°C, вологості 80%, а також у термостатованих умовах при цій же температурі за відсутності освітлення.



Рис. 3.1. Пророщене насіння *G. imbricatus* на агаризованому поживному середовищі Мурасиге-Скуга

Найефективнішим способом подолання спокою насіння є стратифікація насіння у розчині гіберелової кислоти у концентрації 0,1 мг/л. За таких умов перші

проростки з'являлись на 10-14 добу (рис.3.1). Відсоток проростання насіння був у жовтні та лютому. Ефективність проростання насіння була високою в усіх досліджених зразках і досягала 85,5%.

У результаті проведеної стерилізації було виявлено, що при обробці гіпохлоридом кількість життєздатних експлантів була найменшою і склала всього 66%, при використанні сулеми - показник був вищий і складав 73%. Кількість життєздатних експлантів при використанні перекисом водню (30%) складала 93%, мікробних заражень не спостерігалось (табл.3.1). Візуальний контроль проводили через 7 днів після введення насіння в культуру.

Таблиця 3.1

Ефективність стерилізації насіння *G. imbricatus* на середовищі МС

Тип стерилізатора	Трив., хв	Загальна к-сть експлантів, шт	Кількість інфікованих, шт	Кількість неінфікованих, шт	Кількість насінин, які проросли, шт	Ефективність стерилізації,%
Гіпохлорид (10%)	20	30	10	20	2	66
Перекис водню (30%)	20	30	2	28	20	93
Сулема (0,1%)	20	30	8	22	5	73

Отже, найкращим стерилізатором є перекис водню (30%), тривалість індикації 20 хв.

Відомо, що оптимальні температури для проростання насіння зазвичай відповідають тим, які характерні для ареалу досліджуваного виду рослин. Обробка гібереліном насіння рослини прискорює його проростання (рис. 3.2.).

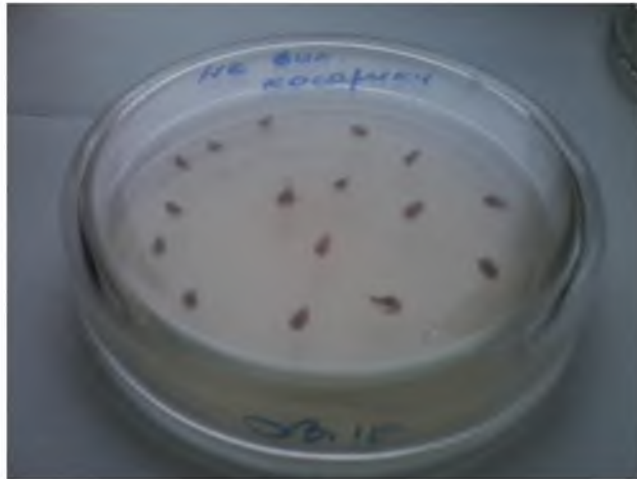


Рис. 3.2. Пророщене насіння *G. imbricatus*

Є дані, що попередня обробка насіння холодовою стратифікацією (+5-7°C) протягом 1-2 місяців, також покращує подолання спокою насіння. Отже, для успішного проростання насіння *G.imbricatus* потрібна короткотривала холодова стратифікація та обробка гібереловою кислотою. Насіння добре проростає в умовах освітленості. При відпрацюванні умов стерилізації насіння, оптимальною виявилася обробка протягом 5 хв етиловим спиртом та 20 хв 30%-им розчином перексиду водню. Ефективність стерилізації становила 93%. Аналіз результатів досліджень показав, що насіння краще проростає в умовах освітлення.

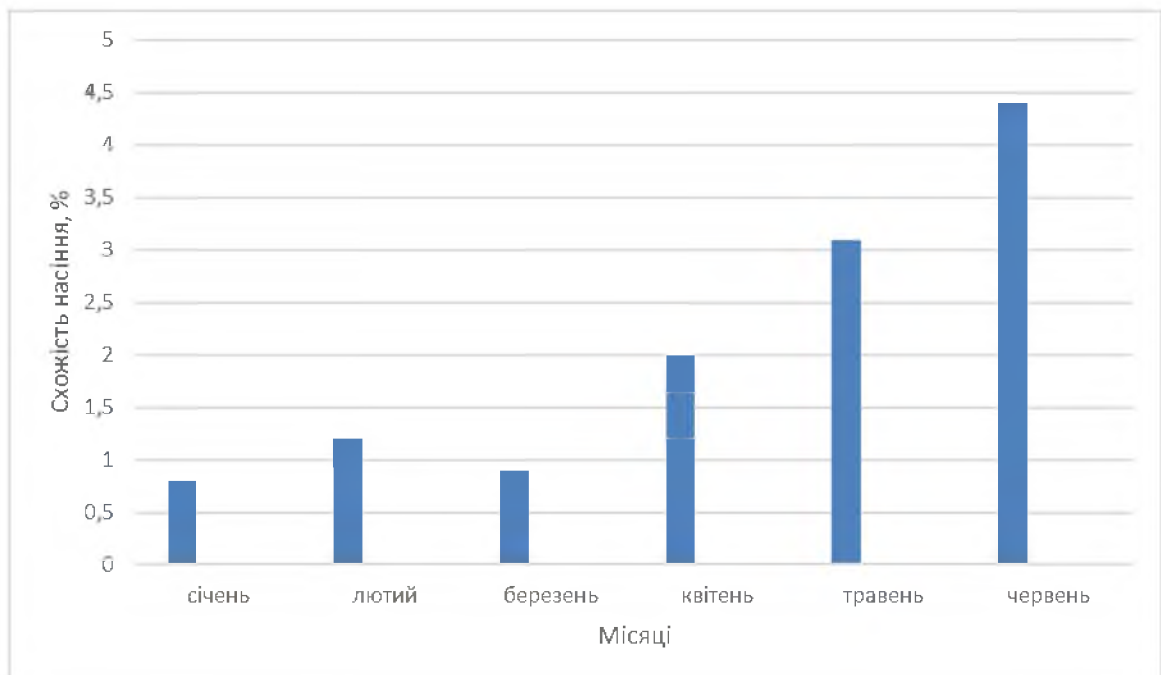


Рис. 3.3. Динаміка проростання насіння *G. imbricatus in vitro*

Використання різних варіантів передпосівної обробки насіння *G.imbricatus* у дослідженні не призводило до появи в умовах *in vitro* аномальних проростків.

Отже, завдяки поєднанню двох факторів, що порушують спокій насіння-холодової стратифікації при температурі +5-7°C протягом 1,5-2 місяців та обробки ГК концентрацією 0,1 мг/л протягом однієї доби, нам вдалося підвищити схожість насіння до 45% і отримати життєздатні проростки *G. imbricatus*.

Відзначено, що отримані з насіння асептичні 1,5-2 місячні рослини були повноцінними, мали розвинену кореневу систему і надземний пагін із 2-3 листками. Асептичні рослини розділяли на три частини – корінь, листок і черешок, які використано в подальшому як експланти.

Відомо, що для регенерації процесів калусогенезу *in vitro* необхідним є використання регуляторів росту. Для індукції калусогенезу використано експланти кореневого, листкового та черешкового походження *G. imbricatus*, які поміщали на агаризоване живильне середовище Мурасиге-Скуга, доповнене фітогормонами: індолілоцтовою кислотою (ІОК), кінетином (Кін), 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК), гібереловою кислотою (ГК) та 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою (2,4-Д).

Культури інкубували на світлі при +25-26,5°C. Їхнє субкультивування проводили через кожні 3 тижні. Отримані результати опрацьовували статично.

Використано три варіанти живильного середовища МС. Перший варіант – з НОК 0,5 мг/л, ІОК 3,0; другий варіант – з ІОК 1,0 мг/л, НОК 3,0 мг/л; третій варіант – з НОК 0,5 мг/л, ІОК 3,0 мг/л, кінетин 0,5 мг/л. Результати наведені в таблиці 3.2.

Одночасно на кожному з трьох варіантів модифікованого середовища МС проводився дослід в 9 чашках Петрі, в кожній з яких було по 12 експлантів (108 експлантів – 36 сегментів корінців, 36 сегментів черешків і 36 сегментів листків). Ознаки росту калусу спостерігаються на 15-20 день культивування. Калус був світлий, м'якої консистенції і відрізнявся невисокою інтенсивністю росту.

Частоту калусогенезу визначали через 3 тижні культивування як співвідношення кількості експлантів з калусом до загальної кількості експлантів у відсотках.

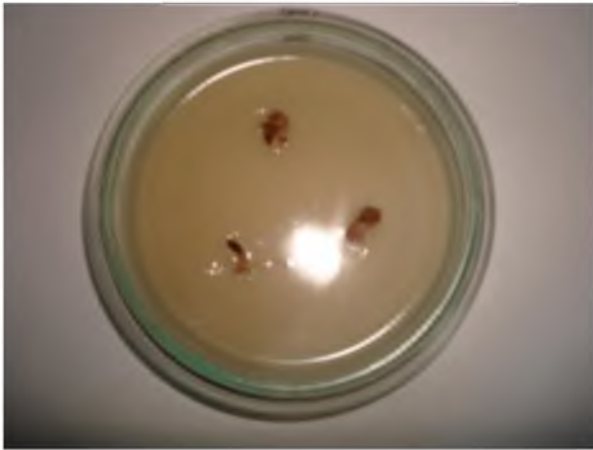


Рис.3.4. Другий пасаж калусу
G. imbricatus



Рис.3.5. Калус *G. imbricatus*
через 3 тижні (3-ій пасаж)

Таблиця 3.2

**Вплив фітогормонів на ріст калусу *G. imbricatus*
протягом 5 тижнів**

Середовище МС	Фіто гормони	К-сть життєздатних експлантів, шт					Відсоток життє- здатних експлантів, %
		1-й тижд.	2-й тижд.	3-й тижд.	4-й тижд.	5-й тижд.	
перший варіант	НОК (0,5) ІОК (3,0)	105	98	96	75	53	49,1
другий варіант	НОК (1,0) ІОК (3,0)	97	85	72	51	30	27,8
третій варіант	НОК (0,5) ІОК (3,0) кінетин (0,5)	103	95	82	71	65	60,2

Протягом п'яти тижнів культура тканин росла, структура калусу була щільна, складалась з клітинних агрегатів (глобул) розміром 2-4 мм, колір від світло-жовтого

до бурого, декілька з зеленою пігментацією. Приріст калусу залежав від концентрації фітогормонів та від походження експланта.

Максимальний відсоток життєздатних експлантів (60,2%) спостерігався на середовищі з вмістом гормонів ІОК, НОК та кінетину в концентрації 3,0 мг/л; 0,5 мг/л; 0,5 мг/л відповідно. Результати по індукції калусогенезу *G. imbricatus* з різних за типом експлантів наведено на діаграмі (рис. 3.5).

3.3. Вибір експлантів

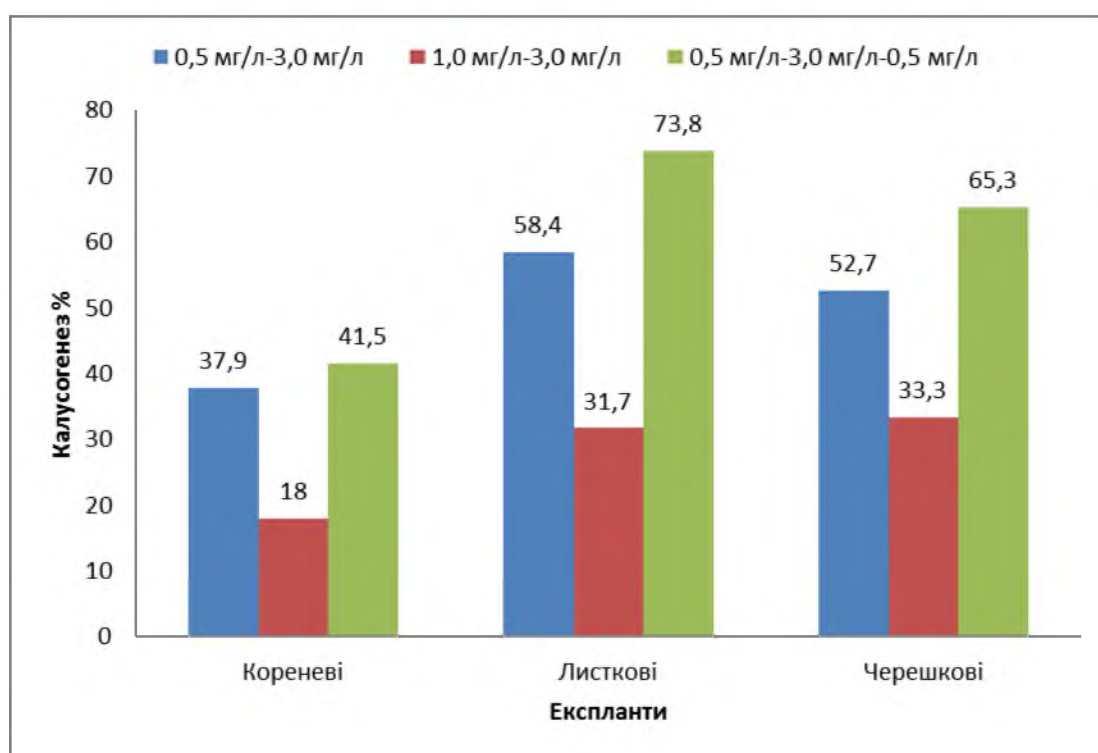


Рис. 3.6. Індукція калусоутворення з експлантів рослин *G. imbricatus* на живильному середовищі МС, доповненому різними концентраціями фітогормонів.

Особливо життєздатними виявилися листкові експланти. Із листкових експлантів спостерігалася вища частота калусогенезу та збільшення наростання калусної біомаси на 15%. З часом культивування на середовищі першого і другого варіанту кількість життєздатних експлантів зменшувалась, багато відмирало. А після 40 діб на другому варіанті середовища експланти загинули.

В результаті дослідження інтенсивності росту калусу на середовищі МС, доповненого різними фітогормонами, найвищу інтенсивність калусогенезу виявлено у випадку використання 2,4-Д (0,1-1,0 мг/л).

За умови присутності у середовищі 0,1 мг/л 2,4-Д уже на 4-5 добу на листових і черепашкових експлантах *G. imbricatus* спостерігали формування калусу. Індукція калусогенезу на корневих експлантах відбулася пізніше- через 6-8 діб. Використання підвищених (0,5 мг/л і 1,0 мг/л) концентрацій 2,4-Д було менш ефективним: калус утворювався лише на 23-25 добу. Відсоток калусогенезу на усіх типах експлантів був найвищим на живильному середовищі МС, доповненому 0,1 мг/л 2,4-Д і зменшувався із підвищенням концентрацій ауксину (рис. 3.6).

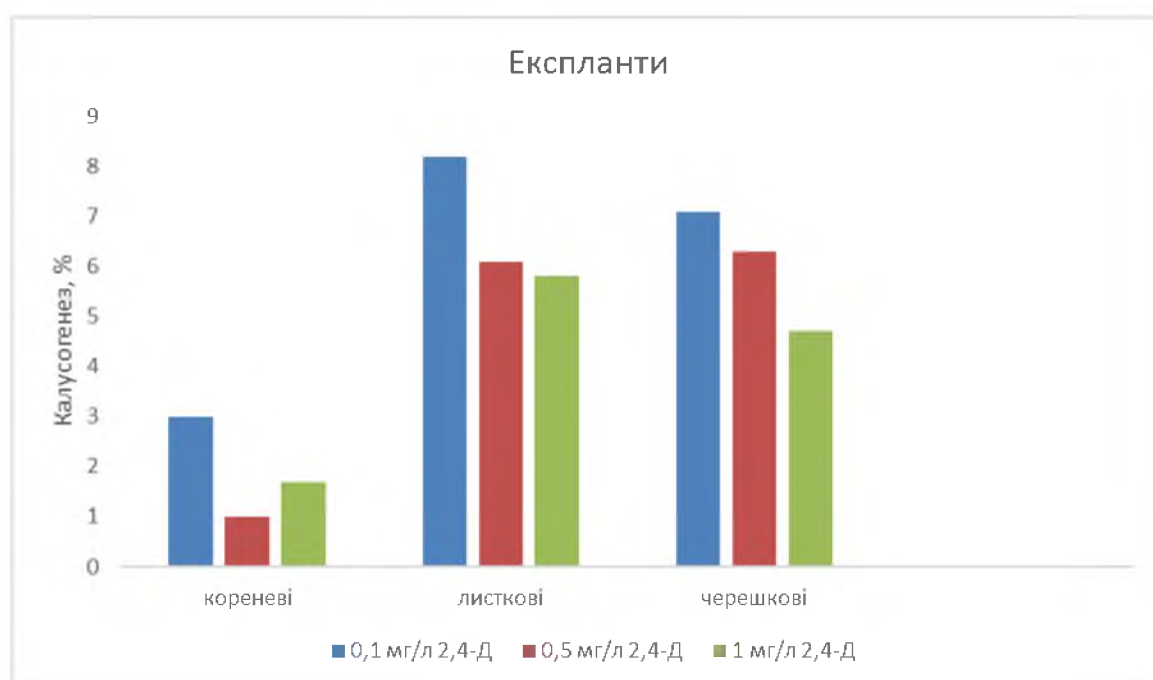


Рис. 3.7. Індукція калусоутворення з експлантів рослин *G. imbricatus* на живильному середовищі МС, доповненому різними концентраціями 2,4-Д

Доповнення середовища різними концентраціями 2,4-Д було малоефективним для калусогенезу: формування калусу проходило дуже повільно. Оптимальним серед досліджуваних фітогормонів було використання різних концентрацій НОК (2-10 мг/л) і Кін (0,2-1 мг/л). Встановлено, що усі комбінації концентрацій цих фітогормонів стимулювали утворення калусу на експлантах *G. imbricatus*. На

середовищі з нижчими концентраціями фітогормонів (2-3 мг/л НОК та 0,2-0,5 мг/л Кін) калусогенез розпочинався через 10-15 діб.

Доповнення живильного середовища 4 мг/л НОК і 1 мг/л Кін у найбільшій мірі сприяло ефективному калусогенезу. Тривалість пасажування для усіх калусів становила 3 тижні (рис.3.8).

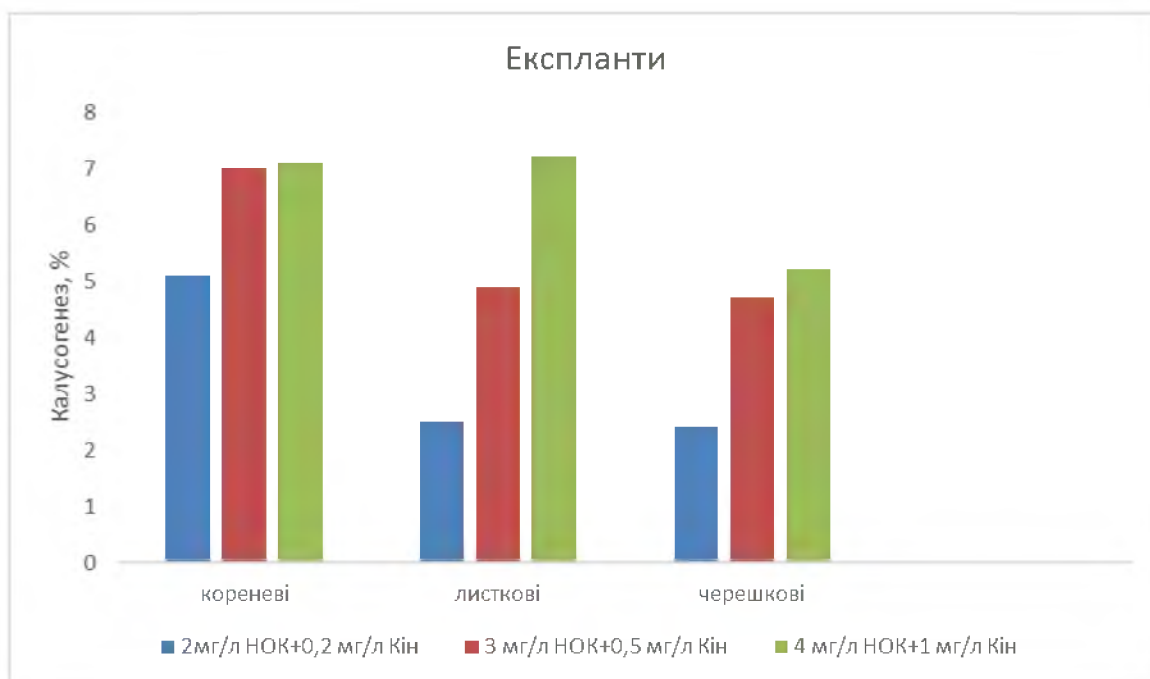


Рис. 3.8. Індукція калусоутворення з експлантів рослин *G. imbricatus* на живильному середовищі МС, доповненому різними концентраціями НОК і Кін

Введення *G. imbricatus* в культуру проводили в умовах світла (2000 лк) при 16 годинному фотоперіоді та температурі 22-25⁰С. Відносна вологість в ламінарному боксі, де росли рослини, підтримувалася на рівні 65-75%. Для поліпшення культивування фізичні фактори необхідно підбирати з врахуванням природнього ареалу проростання культивуваної рослини. Через 4-5 тижнів культивування первинний калус переносили на свіже живильне середовище такого ж складу. Протягом 5 тижнів здійснено мікробіологічний, візуальний контроль. Візуальний контроль проводили не рідше одного разу в 3 дні – відбраковували інфіковані тканини.

3.4. Калусогенез

Оптимальними ми вважали середовища, на яких у максимальній кількості експлантів спостерігалось утворення калусу, тобто була найвища частота калусогенезу. Експланти всіх типів виявились здатними до цього виду морфогенезу. Дедиференціація виявлялась для листкових експлантів у руйнуванні епідермісу, розростанні паренхімних клітин по всій поверхні листка з одночасною втратою зеленого забарвлення. Під час культивування корневих експлантів на середовищах для калусогенезу відбувалось їх потовщення, особливо помітне на кінцях сегментів, з поступовим розростанням аж до повного покривання масою первинного калусу. На стеблових експлантах ознаки дедиференціації виявлялись значно повільніше, у багатьох видів спостерігались некротичні явища; первинний калус, як правило, з'являвся на протилежному від кореня кінці сегмента стебла.

В результаті проведених досліджень визначено оптимальний склад поживного середовища для калусогенезу у *G.imbricatus* (табл. 3.3.).

Таблиця 3.3.

Компонент середовища	Концентрація , мг/л
KNO_3	1900
$CaCl_2 \times H_2O$	440
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
NH_4NO_3	1650
H_3BO_3	6.2
$CuSO_4 \times 5H_2O$	2.5
KI	83
$MnSO_4 \times 4H_2O$	2230
$CoCl_2 \times 6H_2O$	2.5

Продовж. табл.3.3.

ZnSO ₄ × 7H ₂ O	960
FeSO ₄ × 2H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O	37.3
Вітамін B ₁	0.5
Вітамін B ₆	0.5
Вітамін PP	0.5
Гліцин	2.0
Мезоінозит	100
Сахароза	30000
Агар Чапека	20000

Для хімічного аналізу на вміст флавоноїдів використовували біомасу 1-го і 2-го пасажу. Одержану калусну масу спочатку обережно знімали, потім висушували при температурі 58±2°C. Час сушіння біомаси залежить: від початкової вологості біомаси; товщини шару біомаси; температури сушіння. Суха маса повинна бути пухкою, легко розсипатись при продавлюванні між пальцями і мати забарвлення від жовтого до коричневого кольору. Залишкова вологість біомаси після висушування – не більше 12%.

3.5. Висновки до розділу.

1. Результати дослідження показали, що *G. imbricatus* здатні до калусоутворення в умовах *in vitro*. Виявлено високу ефективність проростання насіння за умов його попередньої холодової стратифікації та обробки 0,1% гібереловою кислотою.

2. Підібрано стерилізуючі агенти для експлантів (96 % етанолом 1-2 хвилини, розчином пероксиду водню (30%) 20 хвилин і промивання в трьох порціях стерилізованої води).

3. Підібрано оптимальні умови калусогенезу, а саме модифіковане агаризоване живильне середовище Мурасиге-Скуга з фітогормонами НОК (0,5 мг/л), ІОК (3,0

мг/л), кінетин (0,5 мг/л); освітлення 2000 лк при 16 годинному фотоперіоді; температура 24-28 °С. Визначено оптимальний час культивування – 5 тижнів. При цьому показана чітка залежність індукції калусогенезу від кількості фітогормонів та типу експланту.

Основні положення розділу „Культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro*” опубліковано у працях [12].

РОЗДІЛ 4

ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ЕКСТРАГУВАННЯ ЦІЛЬОВИХ КОМПОНЕНТІВ З РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ *G. IMBRICATUS*

4.1. Загальна характеристика розділу.

Оскільки структура калусу складалась з клітинних агрегатів (глобул), які мали розміри 1-4 мм, доцільно було провести дослідження кінетики екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* та з частинок калусу, культивованого в умовах *in vitro* для фракцій 1,6; 2,5 і 4 мм.

В даному розділі розглядається основні теоретичні положення пов'язані з процесами екстракційного вилучення цільових компонентів з частинок дикорослого виду *G. imbricatus*; встановлення механізму екстрагування та кінетики процесу; вибір найбільш ефективного екстрагенту; умов проведення експериментальних досліджень та ін. Що стосується природи рослини та вмісту цільових компонентів в біомасі *G. imbricatus*, то ці питання розглянуті в розділі 2.

4.2. Механізм та кінетика екстрагування

Процесу екстрагування цільових компонентів з рослинної сировини порівнянно з екстрагуванням цільових компонентів з мінеральних пористих структур є складнішим процесом, структура рослинної сировини клітинної будови і процеси пов'язані з вилученням цільових компонентів протікають дуже повільно і тривають в окремих випадках декілька діб. Ще складнішими є процеси вилучення цільових компонентів з культивованих об'єктів типу *G. imbricatus* в умовах *in vitro* розглянутих в розділі 2. Цільові компоненти в лікарських рослинах можуть знаходитись як в твердому, так і в рідкому стані, тому рівновага в процесі екстрагування буде визначатись по різному.

Якщо цільовий компонент в пористому тілі знаходиться в твердому тілі, то рівновага настає при досягненні в екстрагенті концентрації насичення C_s . Якщо цільовий компонент в пористому матеріалі знаходиться в рідкому стані, то в умовах рівноваги концентрації компонента в рідині і в пористому скелеті вирівнюються, а це залежатиме від співвідношення твердої і рідкої фаз. Оскільки рушійна сила визначається різницею рівноважної і робочої концентрації, то швидкість процесу буде визначатись по різному.

Слід підкреслити, що при вирішенні задач пов'язаних з процесами екстрагування, в першу чергу необхідно визначитись з механізмом цього процесу, тобто із встановленням найбільш повільної стадії, тому що процес екстрагування включає як внутрішній перенос цільового компонента з ядра пористого матеріалу до поверхні фазового контакту системи тверде тіло-рідина, так і зовнішній – перенос компонента від поверхні фазового контакту в ядро розчину.

Якщо відсутня хімічна взаємодія екстрагента з цільовим компонентом то процес екстрагування здійснюється за законами фізики і протікає за законами дифузії, як всередині пористого скелета, так і за межами його твердого скелету. Хоча обидва процеси являються дифузійними механізм цього переносу різний.

В залежності від природи цільового компонента і розчинника, структури пористого матеріалу, умов проведення процесу – періодичний чи безперервний, одна з названих стадій визначає швидкість всього процесу.

Тому знання найбільш повільної стадії (механізму екстрагування) дає можливість встановити найбільш ефективний процес вилучення.

Якщо в процесі вилучення цільового компонента лімітуючою стадією являється внутрішня дифузія, то для інтенсифікації процесу перемішування не дає жодного ефекту і в такому випадку з метою прискорення процесу можуть бути використані збільшення поверхні фазового контакту (подрібнення), підвищення температури, використання більш ефективного екстрагента.

Характерною особливістю процесів екстрагування цільових компонентів з ЛРС (листя, стебла, квіти, кора, плоди), які містять БАР є низький вміст цільових компонентів (0,05 – 3%). Внаслідок клітинної будови цих об'єктів, процес

екстрагування протікає дуже повільно, оскільки лімітуючою стадією є внутрішня дифузія. Тому, з метою прискорення цього процесу виникає необхідність в подрібненні матеріалу, підвищенні температури та інше [112].

З метою встановлення найбільш повільної стадії використовують переважно метод впливу числа обертів перемішуючого органу (мішалки) на швидкість процесу екстрагування. Якщо збільшення ефективності перемішування не призводить до прискорення процесу екстрагування, то вважається, що процес протікає по внутрішньо дифузійному механізму. В ряді випадків при здійсненні процесів екстрагування між екстрагентом і цільовим компонентом має місце хімічна взаємодія і процес екстрагування здійснюватиметься за іншим механізмом.

В зв'язку з труднощами пов'язаними з встановленням механізму екстрагування цільових компонентів з ЛРС, а також рослини культивованої в умовах *in vitro*, було використано просту і надійну методику, яка використовується для різних умов екстрагування цільових компонентів з пористих структур та різноманітних пористих об'єктів. Ця методика [115] базується на аналізі кінетики екстрагування з можливим варіантом хімічної взаємодії, на основі якого одержано рівняння (4.1).

$$\tau = \frac{t}{T} = \frac{1 - 3 \cdot \phi_0^2 + 2 \cdot \phi_0^3 + \frac{6}{\varepsilon} \cdot (1 - \phi_0) + \frac{2}{Bi} \cdot (1 - \phi_0^3)}{1 + \frac{6}{\varepsilon} + \frac{2}{Bi}} \quad (4.1)$$

де: t –біжучий час екстрагування; T – час повного вилучення; $\phi_0 = \frac{r_0}{R}$; r_0 - радіус внутрішньої області частинки, в якій міститься цільовий компонент; R – радіус сферичної частинки;

$$Bi = \frac{K \cdot R}{D_m} \text{ - критерій Біо ;}$$

$$\varepsilon = \frac{K_r \cdot R}{D_m} \text{ - критерій хімічної взаємодії,}$$

де D_m – коефіцієнт стислої дифузії; K_r , K - коефіцієнти хімічної реакції і масовіддачі відповідно.

При одержанні рівняння (4.1) прийнято $\Delta C = C_s - C_1$ для умов фізичного розчинення і $\Delta C = C_1$ для умов хімічної взаємодії; і $\frac{\Delta C}{\rho_T} \ll 1$.

При одержанні цього рівняння приймаються відповідні умови (форма об'єкту – сферична, відсутність опору при переміщенні компонента в середині пористого матеріалу та інше), розподіл концентрації в середині пористої кульки розраховується для умов хімічної взаємодії розчинника з компонентом або фізичного розчинення.

Згідно рівняння (4.1) можна встановити такі механізми процесу екстрагування:

1. Внутрішньо-дифузійний механізм, що відповідає $\varepsilon = \infty$; $Bi = \infty$ і рівняння (4.1) приводиться до виду

$$\Phi = \frac{t}{T} = 1 - 3 \cdot \varphi_0^2 + 2 \cdot \varphi_0^3 \quad (4.2)$$

2. Механізм хімічної взаємодії при $\varepsilon \ll 1$

$$\frac{t}{T} = 1 - \varphi_0 \quad (4.3)$$

3. Змішаний дифузійний механізм при $\varepsilon = \infty$, для якого справедливе рівняння виду

$$\frac{t}{T} = \frac{1 - 3 \cdot \varphi_0^2 + 2 \cdot \varphi_0^3 + \frac{2}{Bi} \cdot (1 - \varphi_0^3)}{1 + \frac{2}{Bi}} \quad (4.4)$$

4. Змішаний дифузійно-хімічний механізм, для якого справедливе рівняння (4.1).

В цьому методі відсутній зовнішньо-дифузійний механізм, для якого $Bi \ll 1$.

Рівняння (4.3) справедливе і для умов фізичного розчинення частинки.

Для встановлення механізму згідно даного метода слід ідентифікувати результати експериментальних досліджень кінетики з різними по формі залежностями (4.1), (4.2), (4.3) і (4.4) у виді функції $\Phi = f\left(\frac{t}{T}\right)$.

Значення безрозмірного радіуса φ_0 визначають з рівняння матеріального балансу виду :

$$M_0(1 - \varphi_0^3) = WC_1 \quad (4.5)$$

$\frac{M_0}{W} = \beta$, де M_0 - вміст цільового компонента в пористому матеріалі, W - об'єм екстрагента і рівняння (4.5) зводиться до виду

$$\beta(1 - \varphi_0^3) = C_1 \quad (4.6)$$

Відповідно φ_0 розраховують в часі за рівнянням

$$\varphi_0 = \sqrt[3]{(1 - C_1 / \beta)} = f(t) \quad (4.7)$$

Якщо допустити, що всі речовини, що витягаються, зосереджено в сфері радіуса r_o , а щільність його розподілу η , то зміна масовмісту відбувається внаслідок дифузії речовини через поверхню сфери радіуса R в основну масу рідини.

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{4}{3} \cdot \pi r_o^3 \eta \right) = D_m \cdot 4\pi R^2 \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right)_{r=R} \quad (4.8)$$

Концентраційне поле в області $r_o \leq r \leq R$ описується диференціальним рівнянням дифузії

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (4.9)$$

з крайовими умовами

$$C|_{r=r_o} = C_S; \quad C|_{r=R} = C_1 \quad (4.10)$$

Рівняння (4.8) визначає границі області $r = r_o$, яка включає в собі речовину в твердому стані в кожний момент часу t . Є можливість спростити систему рівнянь (4.8)-(4.10). Для цього слід звернути увагу на те, що екстрагування твердої речовини – повільний процес, і тому в кожний момент часу в області $r_o \leq r \leq R$ "встигає" встановитись стаціонарний розподіл концентрацій, який задовольняє рівнянню:

$$\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} = 0 \quad (4.11)$$

Розв'язок цього рівняння в граничних умовах (4.10) має вигляд:

$$\frac{C_s - C}{C_s - C_1} = \frac{1 - \frac{r_o}{r}}{1 - \frac{r_o}{R}} \quad (4.12)$$

Підстановка (4.12) в (4.8) і розв'язок отриманого при цьому диференційного рівняння приводить до кінцевого результату:

$$1 - 3 \cdot \phi_0^2 + 2 \cdot \phi_0^3 = \frac{6 \cdot (C_s - C_1) \cdot D_m \cdot t}{\eta \cdot R^2} \quad (4.13)$$

$$\text{де } \phi_0 = \frac{r_o}{R}$$

Для внутрішньо дифузійного процесу час повного екстрагування твердої речовини T при $\phi_0 = 0$ визначається з (4.13) так:

$$T = \frac{1}{6} \cdot \frac{\eta}{C_s - C_1} \cdot \frac{R^2}{D_m} \quad (4.14)$$

Для змішано дифузійного процесу час повного вилучення T визначається з рівняння виду:

$$6 \frac{C_s - C_1}{\eta} \cdot \frac{D_m T}{R^2} = \left(1 + \frac{2}{Bi}\right) \quad (4.15)$$

Для змішано дифузійного вилучення і хімічній взаємодії час повного вилучення T визначається з рівняння виду:

$$6 \frac{C_1}{\eta} \cdot \frac{D_m T}{R^2} = \left(1 + \frac{2}{Bi} + \frac{6}{\varepsilon}\right) \quad (4.16)$$

Для встановлення механізму екстрагування необхідна постановка експеримента по встановленню залежності $C = f(t)$ з наступним визначенням $\phi_0 = f(t)$. Згідно рівняння (4.2), якщо припустити внутрішньо дифузійний механізм між величинами $\Phi = 1 - 3\phi_0^2 + 2\phi_0^3$ і часом t повинна існувати лінійна залежність $\Phi = f(t)$. Тому для встановлення лімітуючої стадії необхідна постановка експерименту з встановленням залежності $\Phi = f(t)$.

Значення Φ визначається для будь якого відрізка часу правою частиною рівняння (4.2), в якому безрозмірний радіус визначається з рівняння матеріального балансу за рівнянням (4.7).

Залежність $\Phi = f(t)$ дає також можливість визначати коефіцієнт стислої дифузії D_m по тангенсу кута нахилу експериментальної залежності представленої на рис. 4.3 і 4.4.

4.3. Експериментальні дослідження кінетики екстрагування цільового компонента з частинок дикорослого виду *G. imbricatus*

Оскільки структура калусу складається з клітинних агрегатів (глобул) розміром 1-4мм, а також з метою перевірки вмісту цільових компонентів в глобулах культивованого об'єкту порівнянно з вмістом дикорослого виду *G. imbricatus* нами були проведені експериментальні дослідження кінетики екстрагування цільових компонентів спочатку з дикорослого виду.

Методика експерименту описана в розділі 2, а результати дослідження представлені в таблиці (4.1) та на рис. 4.1.

Таблиця 4.1

Експериментальні дані кінетики екстрагування з частинок дикорослого виду в апараті з мішалкою та настоювання у виді *G. imbricatus*

Вихід суми екстрактивних речовин, %								
t, ГОД	T = 40° C		T = 30° C		T = 20° C		Настоювання, T = 40° C	
	$d_c=2,5\text{мм}$	$d_c=4.0\text{мм}$	$d_c=2,5\text{мм}$	$d_c=4.0\text{мм}$	$d_c=2,5\text{мм}$	$d_c=4.0\text{мм}$	$d_c=2,5\text{мм}$	$d_c=4.0\text{мм}$
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	16.5	14.4	12.4	11.3	10.3	9.3	2.1	1.7
1	23.1	21.0	19.5	17.1	17.5	14.6	4.2	3.5
2	29.5	27.5	26.9	25.6	25.4	23.4	7.8	5.6
4	32.9	30.7	29.8	28.4	28.7	26.4	9.4	7.3
6	34.4	31.6	32.9	30.0	31.2	28.3	11.3	9.2

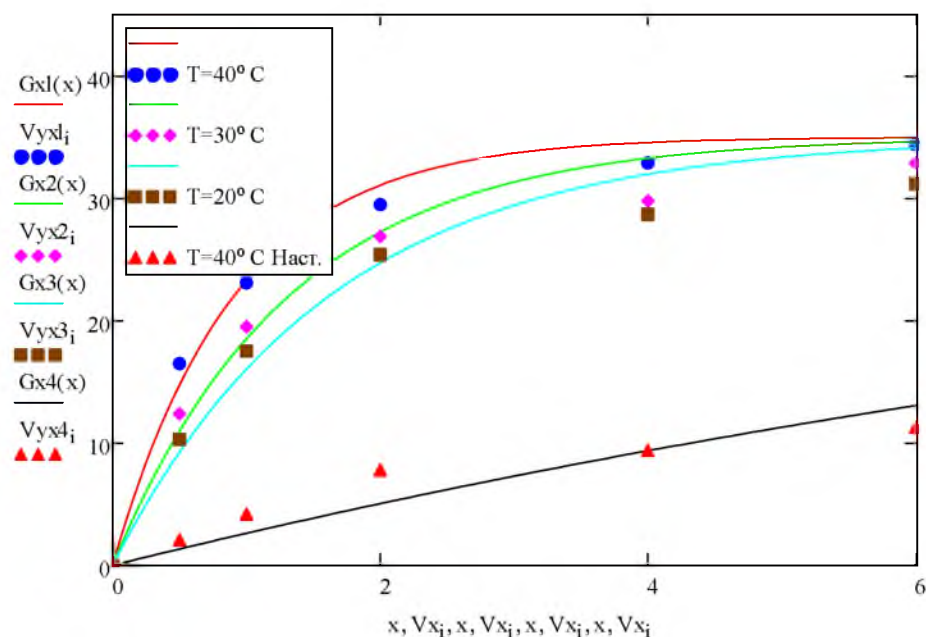


Рис. 4.1. Залежності $C_1 = f(t)$ для $d_c = 2,5$ мм

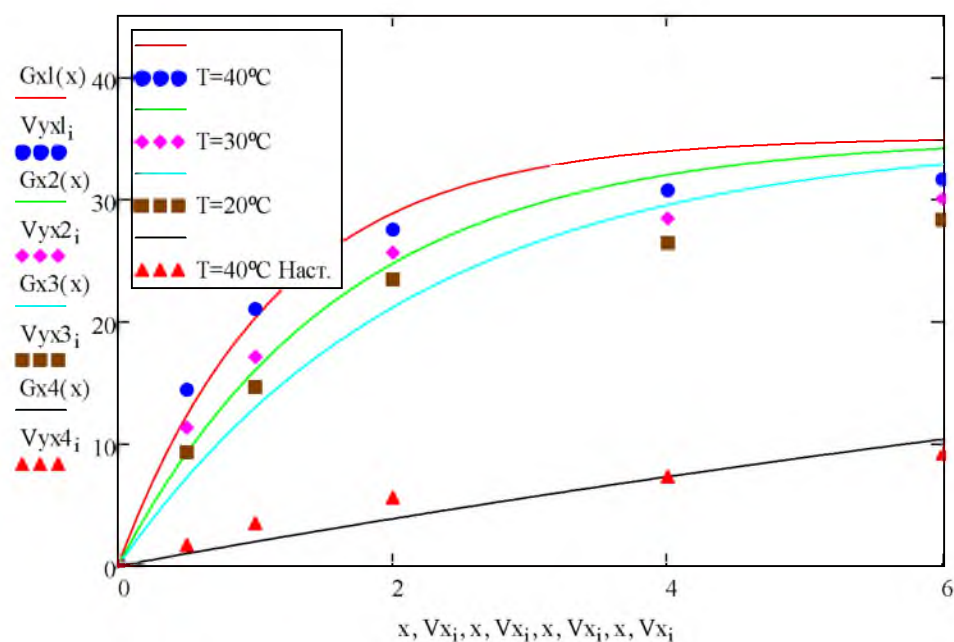


Рис. 4.2. Залежності $C_1 = f(t)$ для $d_c = 4,0$ мм

Аналіз експериментальних досліджень представлених в таблиці 4.1. і рис. 4.1 і 4.2 показав, що процес з настоюванням порівняно з перемішуванням протікає повільніше, що дає підстави стверджувати, що процес з перемішуванням є більш ефективним, оскільки вилучення цільових компонентів протікає по змішаній кінетиці – зовнішньо- і внутрішньо-дифузійній. Вплив гідродинаміки (перемішування) сприяє прискоренню процесу.

Що стосується настоювання, то цей процес більш наближений до внутрішньо-дифузійного механізму, хоча і в цьому процесі певна кількість цільового компонента вилучається за рахунок зовнішньо-дифузійного процесу внаслідок збільшення поверхні в процесі подрібнення і відкриття вільного доступу до оновленої поверхні при подрібненні. Тому і в умовах настоювання в загальному процес протікає по змішаному механізму.

Таким чином подрібнення рослинної сировини в умовах екстрагування є одним із важливих процесів, які дають можливість провести процес з внутрішньо-дифузійної області (найбільш повільної) в область зовнішньо-дифузійну, залежну від гідродинамічних параметрів.

Таблиця 4.2

Розрахунок $\Phi = 1 - 3 \cdot \phi_0^2 + 2 \cdot \phi_0^3 = f(t)$ в апараті з мішалкою при $T = 40^\circ \text{C}$

t , ГОД	C_1		$\phi_0 = \sqrt[3]{(1 - C_1 / \beta)} = f(t)$		$\Phi = f(t)$	
	$d_c = 2,5 \text{ мм}$	$d_c = 4,0 \text{ мм}$	$d_c = 2,5 \text{ мм}$	$d_c = 4,0 \text{ мм}$	$d_c = 2,5 \text{ мм}$	$d_c = 4,0 \text{ мм}$
0	0	0	1.00	1.00	0.00	0.00
0,5	16.5	14.4	0,809	0.838	0.096	0.07
1	23.1	21.0	0,680	0.737	0.242	0.171
2	29.5	27.5	0,540	0.598	0.44	0.355
4	32.9	30.7	0,391	0.497	0.602	0.504
6	34.4	31.6	0,258	0.459	0.835	0.561

Таблиця 4.3

Розрахунок $\Phi = 1 - 3 \cdot \phi_0^2 + 2 \cdot \phi_0^3 = f(t)$ в умовах настоювання $T = 40^\circ \text{C}$

t , ГОД	C_1		$\phi_0 = \sqrt[3]{(1 - C_1 / \beta)} = f(t)$		$\Phi = f(t)$	
	$d_c = 2,5 \text{ мм}$	$d_c = 4,0 \text{ мм}$	$d_c = 2,5 \text{ мм}$	$d_c = 4,0 \text{ мм}$	$d_c = 2,5 \text{ мм}$	$d_c = 4,0 \text{ мм}$
0	0	0	1.00	1.00	0.00	0.00
0,5	2.1	1.7	0.98	0.984	0.002	0.00052
1	4.2	3.5	0.96	0.965	0.0044	0.0033
2	7.8	5.6	0.92	0.944	0.0183	0.0095
4	9.4	7.3	0.90	0.925	0.028	0.0156
6	11.3	9.2	0.88	0.903	0.0399	0.0266

В розрахунках прийнято $G = 50$ г $\eta = 0.35$ $W = 0.500$ л $M_0 = G \cdot \eta$

$$\beta = \frac{M_0}{W} = \frac{50 \cdot 0.35}{0.5} = 35$$

На рис. 4.3 і 4.4 показано залежності $\Phi = f(t)$ для двох випадків – перемішування і настоювання. Значення Φ , які відповідають відповідним інтервалам часу t визначали з рівняння (4.2) з врахуванням матеріального балансу (4.7). Радіус R прийнято рівним $d_{cp}/2$. Концентрація в області, яку описує r_0 прийнято рівною концентрації насичення.

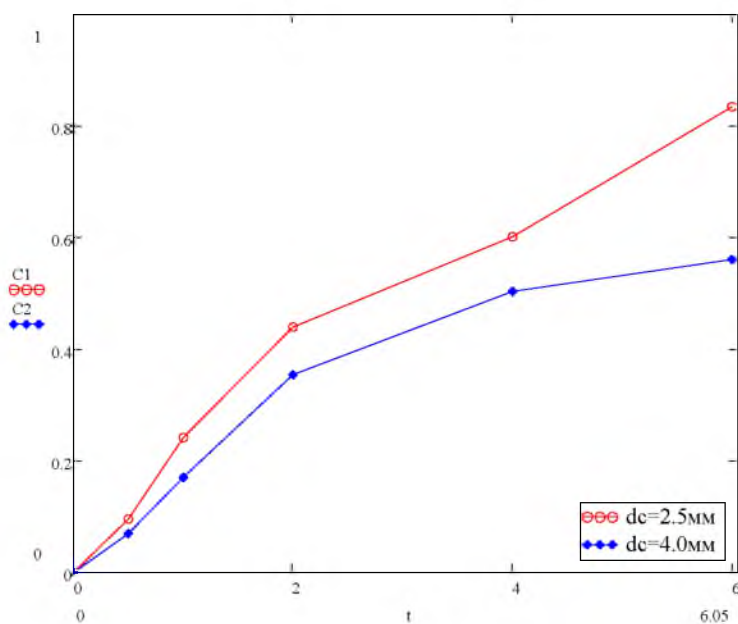


Рис. 4.3. $\Phi = f(t)$ в апараті з мішалкою при $T = 40^\circ \text{C}$

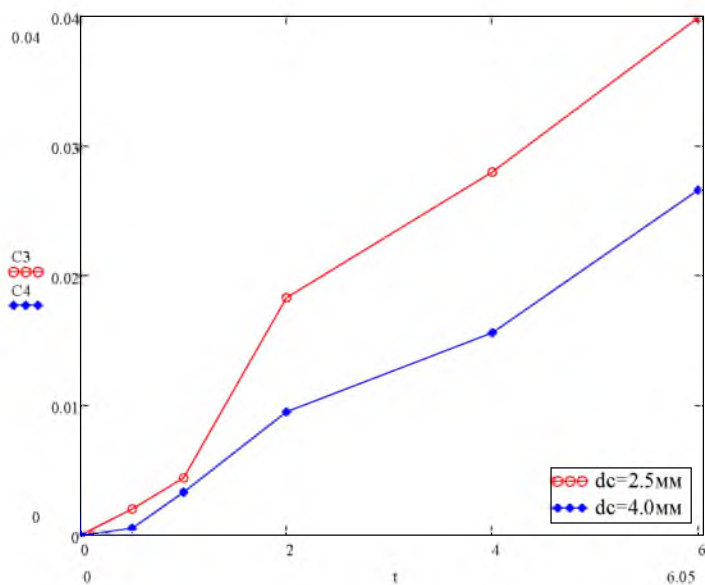


Рис. 4.4 $\Phi = f(t)$ в умовах настоювання $T = 40^\circ \text{C}$

Таким чином, в загальному внутрішньо-дифузійний процес протікає в області $r_0 - R$, а зовнішній – за межами R ; концентрації міняються в межах $C_s - C_l$ і ця різниця визначає рушійну силу процесу екстрагування.

За умов $t=0$; $C_l=0$; $\varphi_0=1$. З часом φ_0 зменшується і на момент часу повного вилучення T - значення $\varphi_0=0$. Тому φ_0 міняється в межах $\varphi_0=1$ до $\varphi_0=0$, а $C_l=C_k$ відповідає повному вилученню.

Аналіз рис. 4.3 і 4.4 підтверджує, що процес екстрагування цільових компонентів з частинок біомаси *G. imbricatus* протікає по змішаному внутрідифузійному і зовнішньо-дифузійному механізмах.

Разом з таким складним механізмом коефіцієнт стислої дифузії, як фізична константа в умовах, наближених до внутрідифузійного процесу, буде значно нижчим за коефіцієнт D_m в умовах змішаної задачі.

Таким чином з метою інтенсифікації процесу екстрагування цільових компонентів з рослинної сировини одним з найбільш впливових факторів є процес подрібнення. Разом з тим слід зауважити, що цей процес є енергоємним, тому в кожному конкретному випадку при розробці технологічного процесу необхідно здійснити техноекономічний розрахунок.

Другим важливим параметром на швидкість екстрагування є температура.

Як буде показано в розділі 4 при виконанні експериментальних досліджень кінетики екстрагування цільових компонентів з лікарської сировини частинок калусу *G. imbricatus* підвищення температури сприяє процесу вилучення, але в значній степені залежатиме від природи розчинника.

4.4. Вибір екстрагенту

Вибір оптимального екстрагенту для вилучення максимальної кількості БАР має велике значення, оскільки є одним з основних факторів, що визначає ефективність процесу в цілому. Екстрагент має виявляти вибіркову дію й максимально вилучати необхідні БАР, бути хімічно та фармакологічно індиферентним, стійким, доступним, економічним, не бути середовищем для розвитку мікроорганізмів, задовольняти вимоги техніки безпеки і т.д.

В якості екстрагенту використовували воду очищену та водно-спиртові суміші різної концентрації спирту етилового. Для екстрагування експериментальним шляхом (залежність виходу екстрактивних речовин та суми флавоноїдів від екстрагенту) був вибраний оптимальний екстрагент (табл. 4.4). Для цього, попередньо подрібнену повітряно-суху сировину (надземна частина *G. imbricatus*) екстрагували в апараті Сокслета з різними екстрагентами. Екстракцію проводили протягом 6 год. (кожна екстракція) при співвідношенні сировина / екстрагент 1:10. Після закінчення екстрагування та вивантаження охолодженої сировини витяги згущували безпосередньо в апараті Сокслета до стандартного залишкового вмісту екстрагенту (ДФУ 1.4, п. 2.4.8). Екстракти упарювали до об'єму, приблизно рівного масі узятій сировини. Вихід екстрактивних речовин визначали за методикою ДФСРСР XI видання [133]. Для порівняльного аналізу суми флавоноїдів в одержаних екстрактах застосовували метод фотоколориметрії за ступенем комплексоутворення з хлоридом алюмінію [9].

Таблиця 4.4

**Вихід екстрактивних речовин та суми флавоноїдів
(в перерахунку на кверцетин) в залежності від виду екстрагенту**

Екстрагент	Вміст сполук у перерахунку на повітряно-суху сировину, %	
	Екстрактивні речовини	Сума флавоноїдів (в перерахунку на кверцетин)
H ₂ O	31,92±2,05	1,17±0,12
40%- C ₂ H ₅ OH	33,43±2,12	3,34±0,11
50%- C ₂ H ₅ OH	29,21±1,77	3,75±0,14
60%- C ₂ H ₅ OH	29,86±1,75	4,31±0,18
70%- C ₂ H ₅ OH	34,93±3,02	5,73±0,17
80%- C ₂ H ₅ OH	32,96±1,30	4,61±0,20
96%- C ₂ H ₅ OH	19,47±1,57	2,86±0,19

Таким чином в якості оптимального екстрагенту, який вилучає максимальну кількість БАР був обраний спирт етиловий 70%.

4.5. Вибір співвідношення Т/Р та визначення умов рівноваги

Співвідношення фаз сировина/екстрагент (Т/Р) впливає на вихід екстрактивних речовин, на кінцеву концентрацію в розчині, кінетику процесу. Із зменшенням співвідношення фаз сировина/екстрагент (Т/Р) відбувається зменшення концентрації цільових речовин в основному об'ємі екстракту – C_{Ip} , що в кінцевому результаті приводить до зростання рушійної сили процесу: $\Delta C = C_C - C_{Ip}$ і виходу продукту. Проте, якщо процес екстрагування проводити при якомога менших значеннях (Т/Р), тобто при значних об'ємах екстрагенту, матимемо велику кількість екстракту з низьким вмістом цільових речовин. Як підсумок викладеного, для кожного конкретного випадку, завдання полягатиме в тому, щоби знайти оптимальне значення співвідношення Т/Р, при якому буде вилучатися та кількість цільової речовини, яка визначатиметься вартістю сировини та якістю кінцевого продукту виробництва (при значній вартості сировини, слід брати мале значення Т/Р і навпаки).

Дослідження залежності впливу виходу екстрактивних речовин та суми флаваноїдів від співвідношення фаз (Т/Р) були проведені по методиці, описаній вище в 2.3, результати яких представлені в табл. 4.5.

Таблиця 4.5.

Вихід екстрактивних речовин в залежності від співвідношення фаз сировина/екстрагент (Т/Р)

Співвідношення Т/Р	Вміст сполук у перерахунку на повітряно-суху сировину, %	
	Екстрактивні речовини	Сума флаваноїдів (у перерахунку на кверцетин)
1:5	32,32±2,05	3,43±0,20
1:10	34,93±3,02	6,13±0,19
1:15	32,54±1,65	5,45±0,14
1:20	33,59±1,25	5,36±0,12

Представлені в табл. 4.5. показують умови досягнення рівноваги в процесі екстрагування в залежності від співвідношення фаз сировина/екстрагент (Т/Р).

Перехід речовини із твердої фази у рідку відбувається лише до досягнення стану рівноваги між фазами, яка розглядається, як кінцевий етап екстракційного процесу. За умов рівноваги концентрації цільових речовин в екстракті, що заповнює вільний простір твердої фази C_p повинна відповідати певна рівноважна концентрація цих речовин в основному об'ємі екстрагенту C_{Ip} . Величина рівноважної концентрації C_{Ip} визначатиметься початковим вмістом цільових речовин у рослинній сировині C_{co} , внутрішньою структурою твердої частинки, а також фізичними властивостями, хімічною будовою цільових речовин і природою екстрагенту.

Особливістю твердих тіл рослинного походження, в найбільш загальному випадку є те, що їх внутрішня структура включає наявність двох середовищ, клітинного і міжклітинного. Такі тіла в процесі контакту з екстрагентом набухають, що призводить до збільшення їх лінійних розмірів. Крім цього, під час розчинення у внутрішньому об'ємі цільових речовини і вологи, яка завжди там присутня, вільний простір також буде зростати. За таких обставин, об'єм екстрагенту, який поглинається твердою частинкою рослинного походження значно більший від вільного простору, який має суха сировина. У зв'язку з викладеним вище та згідно традиційних представлень про перебіг екстракційного процесу рівноважну концентрацію цільових речовин в екстракті - C_{Ip} можна зв'язати з концентрацією цих же речовин у твердій фазі рівнянням матеріального балансу:

$$GC_{co} = VC_p + (W - V)C_{Ip}; \quad (4.17)$$

де: G - маса екстрагованої рослинної сировини; W - об'єм екстрагенту; V - об'єм екстрагенту, що міститься у вільному просторі твердої фази (клітинному та міжклітинному середовищі).

За умови; $C_p = C_{Ip}$, що означає, при досягненні рівноваги концентрація цільових речовин в екстракті, який знаходиться в клітинному та міжклітинному середовищі твердої фази - C_p рівна концентрації цих же речовин в основному об'ємі екстракту - C_{Ip} , рівняння (4.17) трансформуватиметься у вираз (4.18):

$$GC_{co} = W C_{1p}; \quad (4.18)$$

Звідки (4.18) можна переписати і у такому вигляді;

$$C_{1p}/v = C_{co} = const \quad (4.19)$$

де: $v = G/W$.

Оскільки початкова концентрація цільових речовин у рослинній сировині є постійною, то при зміні співвідношення фаз β , (сировина-екстрагент), повинна пропорційно змінюватися концентрація екстракту C_{1p} . За таких умов рівноважна залежність (9.3) має лінійний характер:

$$C_{1p}/v = f(C_{1p}); \quad (4.20)$$

Для перевірки відповідності рівноважної залежності рівнянню (4.20) слід провести експериментальні дослідження кінетики процесу при різних співвідношеннях Т/Р, маючи на увазі, що міжфазова рівновага настає при значному часі екстрагування.

4.6. Експериментальні дослідження кінетики екстрагування цільового компоненту в апараті Сокслета

Проведено експериментальні дослідження впливу розміру частинок на швидкість процесу екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* в апараті Сокслета. В експериментальних дослідженнях використовувались фракції дикоростучого виду (надземна частина) *G. imbricatus* з середнім діаметром частинок 1,6, 2,5, 4 мм.

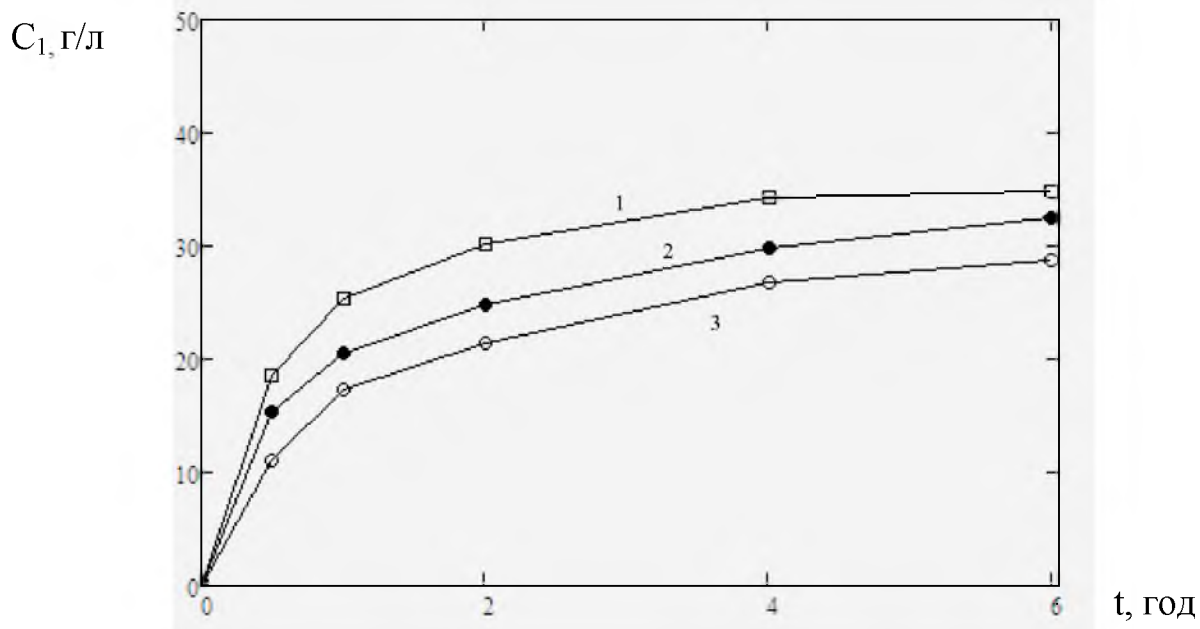
За результатами досліджень в табл. 4.6. приведені кінетичні залежності екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* у виді функції $C_1 = f(t)$, отримані при Т:Р=1:10, температурі кипіння 70% розчину етанолу $t_{кип} = 80,1^\circ C$ для трьох фракцій досліджуваного матеріалу.

Аналіз цих залежностей показує, що зменшення розміру частинок позитивно впливає на швидкість процесу екстрагування, де спостерігається швидке наростання концентрації.

Таблиця 4.6.

**Концентрація цільового компоненту, одержаної екстрагуванням з частинок
дикорослого виду *G. imbricatus***

Час, <i>t</i> , год	Концентрація цільового компоненту в розчині <i>C</i> , г/л		
	$d_c=1.6$ мм	$d_c=2.5$ мм	$d_c=4$ мм
0	0	0	0
0,5	18.5	15.4	12.1
1	25.3	23.5	21.3
2	30.1	27.9	25.4
4	33.8	30.8	29.1
6	34.9	33.9	31.8



1 – $d=1.6$ мм; 2 – $d=2.5$ мм; 3 – $d=4$ мм

Рис. 4.5. Кінетичні залежності екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* при температурах кипіння в апараті Сокслета

Аналіз залежностей представлених в таблиці 4.4. і рис. 4.5 показав, що температура впливає на кінетику процесу – прискорює його. Однак підвищення температури пов'язане з вибором відповідного розчинника і має обмеження пов'язані з впливом високих температур на якість цільових компонентів.

4.7. Визначення коефіцієнту дифузії

Для визначення коефіцієнту дифузії існує ряд рівнянь і методик. В одній із методик [113] для визначення коефіцієнту дифузії при екстрагуванні цільових компонентів з дикорослої маси використаємо рівняння Г.Е. Аксельруда виду :

$$\frac{C_p - C_1}{C_o - C_n} = \sum_{n=1}^{\infty} B_n \cdot e^{-\mu^2 n \tau} \quad (4.21)$$

де $B_n = \beta \cdot A_n$; $\tau = \frac{D \cdot t}{R^2}$,

C_p, C_1, C_n – рівноважна, біжуча і початкова концентрації в розчині,

C_o – початкова концентрація в твердій фазі,

R -характерний розмір (радіус кулі).

В умовах рівноваги β розраховується за рівнянням

$$\beta = \frac{C_p}{C_o - C_p} \quad (4.22)$$

Для даних експериментів $\beta = 0.495$

При $Bi = \infty$ (внутрішньо дифузійний режим) для частинок сферичної форми система рівнянь приводиться до виду

$$A = \frac{6}{\mu^2 + 9\beta(1 + \beta)} \quad (4.23)$$

$$\operatorname{tg} \alpha = \mu^2 \cdot \frac{D}{R^2} \quad (4.24)$$

$$\operatorname{ctg}(\mu) = \frac{1}{\mu} + \frac{\mu}{3\beta} \quad (4.25)$$

μ – корінь характеристичного рівняння (4.25).

Оскільки рівняння (4.21) має вигляд степеневої залежності, то обмежуючись в правій частині рівняння першим членом ряду, отримаємо після логарифмування

$$\ln\left(\frac{C_p - C_1}{C_o}\right) = \ln B - \mu^2 \cdot \frac{D}{R^2} t \quad \text{або} \quad y = a_0 + a_1 \cdot t \quad (4.26)$$

На рис. 4.6 і приведені дослідні дані у вигляді функції (4.26). З рис. 4.6 видно, що при $t \geq t_{кр} = 1$ год., всі криві мають лінійний характер, тобто згідно теоретичних уявлень спостерігаємо регулярний режим.

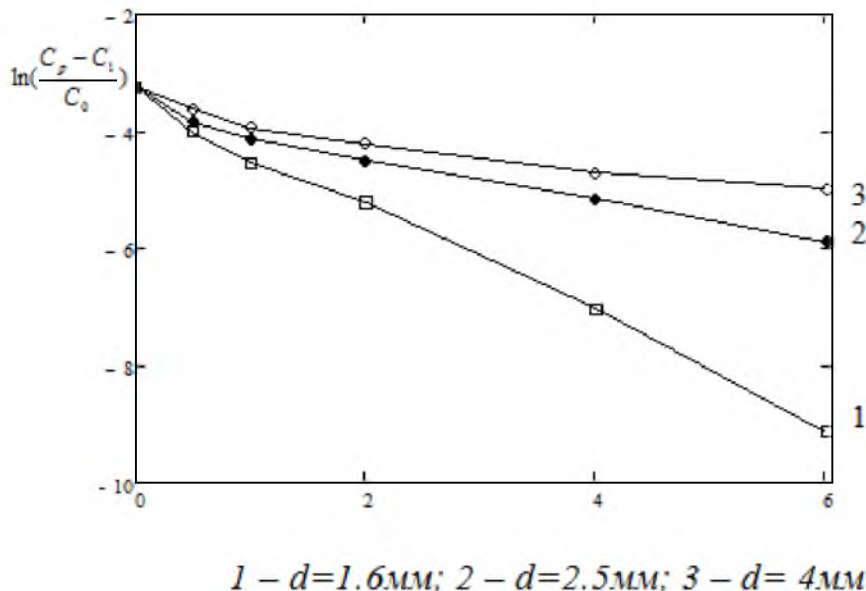


Рис. 4.6. Залежність $\ln\left(\frac{C_p - C_1}{C_0}\right) = f(t)$ в умовах екстрагування з частинок дикорослого виду *G. imbricatus*

Для визначення невідомих коефіцієнтів a_0 і a_1 , що входять в рівняння (4.26) використовуємо універсальну математичну систему MathCAD. Дослідні дані в області регулярного режиму апроксимуємо лінійною залежністю за допомогою функцій $\text{slope}(VX, VY)$ та $\text{intercept}(VX, VY)$.

Отримані числові значення коефіцієнтів a_0 і a_1 для досліджених фракцій зведені в таблицю 4.7.

Повертаючись до рівняння (4.26) одержимо

$$B = e^{a_0} \qquad D = -a_1 \frac{R^2}{\mu^2} \qquad (4.27)$$

Числове значення μ визначене з рівняння (4.25) за допомогою функції $\text{root}(f(x), x)$ в системі MathCAD і для $\beta = 0,495$ дорівнює $\mu = 0,36$. Значення коефіцієнтів B та D , розраховані за рівнянням (4.27) і приведені в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Коефіцієнти В та D для частинок дикорослого виду *G. imbricatus* при температурі кипіння, Т:Р=1:10 70% розчином етанолу.

№	Фракція	a_0	a_1	B_p	$D \cdot 10^{10} \text{ м}^2/\text{с}$
1	$d=2.5 \text{ мм}$	-3.413	-0.937	0.033	0,369
2	$d=4 \text{ мм}$	-3.551	-0.402	0.029	0,503
3	$d=8 \text{ мм}$	-3.503	-0.271	0.030	0,942

Одержані таким чином коефіцієнти дифузії було використано для встановлення відповідності кінетичних залежностей шляхом співставлення розрахункових та дослідних даних, представлених у таблиці 4.6. Розрахунок біжучої концентрації в розчині C_1 проводили за формулою (4.28), одержаної з (4.21) шляхом деяких перетворень

$$C_1 = C_p - C_0 \cdot B_p \cdot e^{-\frac{\mu^2 D \cdot t}{R^2}} \quad (4.28)$$

Таблиця 4.8

Експериментальні та розрахункові значення концентрації цільового компоненту в розчині, одержані екстрагуванням з частинок дикорослого виду *G. imbricatus*, г/л.

Час, год	$d=1,6 \text{ мм}$		$d=2,5 \text{ мм}$		$d=4 \text{ мм}$	
	$C_{\text{екс}}$	$C_{\text{розн}}$	$C_{\text{екс}}$	$C_{\text{розн}}$	$C_{\text{екс}}$	$C_{\text{розн}}$
0,5	18.5	16.432	14.4	13.868	12.1	11.337
1	25.3	23.375	18.5	17.717	15.3	14.332
2	30.1	30.443	25.9	23.439	20.4	19.233
4	33.8	34.3	30.8	29.827	26.1	25.824
6	34.9	34.892	33.9	32.685	30.8	29.66

Аналіз результатів наведених в таблиці показав, що значення концентрацій, одержаних експериментальним шляхом задовільно узгоджуються з розрахунковими, це дає можливість використовувати рівняння Аксельруда [113] для прогнозування

кінетики для інших об'єктів, пов'язаних з процесами екстрагування цільових компонентів.

4.8. Висновки до розділу.

1. Наведені результати дослідження кінетики екстрагування цільових компонентів з дикорослого виду *G. imbricatus* з метою визначення наявності цільових компонентів, їх кількісного складу та їх властивостей з метою порівняння їх з біомасою *G. imbricatus*, культивованого в умовах *in vitro*.

2. Встановлено механізм екстрагування з дикорослого виду *G. imbricatus* в умовах настоювання і в умовах перемішування. Показано, що процес екстрагування протікає по змішаному механізму – внутрішньо-дифузійному та зовнішньо-дифузійному.

3. Показано, що процес екстрагування в умовах перемішування протікає більш ефективно, порівняно з настоюванням, що пов'язано з переводом процесу екстрагування з внутрішньодифузійного в область зовнішньодифузійну.

4. Показано, що використана методика по встановленню механізму екстрагування задовільно узгоджується з експериментальними даними по кінетиці процесу – рівняння (4.2).

5. Досліджена кінетика вилучення цільових компонентів з сировини *G. imbricatus* в умовах різних температур (20, 30, 40 і 80°C) та різних розмірів частинок.

6. Показано, що зменшення розмірів частинок і підвищення температури сприяє більш ефективному вилученню цільових компонентів.

7. Визначені коефіцієнти дифузії на основі рівнянь наведених в [113] Г.А. Аксельруда.

РОЗДІЛ 5

МЕХАНІЗМ ТА КІНЕТИКА ВИЛУЧЕННЯ ЦІЛЬОВИХ КОМПОНЕНТІВ З КАЛУСНОЇ БІОМАСИ *G. IMBRICATUS*, ВИРОЩЕНОЇ В УМОВАХ *IN VITRO*

5.1. Загальна характеристика розділу

В розділі 4 розглядався механізм і кінетика процесу вилучення цільових компонентів з дикорослої сировини *G. imbricatus*, характеристика якої наведена в розділі 2. Використання екстрактів дикорослих трав має широке застосування при виготовленні ліків тому, на сьогоднішній день привертає особливу увагу метод одержання біомаси вирощеної в умовах *in vitro*. Така біомаса має ряд переваг над біомасою, одержаною з дикорослих рослин, оскільки її можна одержати в необмежених кількостях і вона не пов'язана з труднощами, які виникають з приготуванням біомаси з диких рослин. Перевагою даного методу являється одержання екологічно чистого продукту при великій продуктивності. Інформація щодо культивування *G. imbricatus* в умовах *in vitro* є недостатньо висвітлена в оглядовій літературі.

Тому в даному розділі дається методика одержання біомаси з рослинної сировини *G. imbricatus* в умовах *in vitro*.

5.2. Одержання біомаси *G. imbricatus* для екстрагування та фітохімічного аналізу

В результаті культивування культури калюсу за методикою, описаній в 2.7 у рідкому рухомому середовищі утворювалась гетерогенна суспензія, яка містила агрегати клітин від 1 до 4 мм. Далі культуральну рідину фільтрували, використовуючи вакуум-фільтр через фільтрувальний папір, сушили в сушильній шафі при температурі 40 ± 1 °C до сталої маси. Висушений калюс зберігали в повітронепроникних пляшках.

Для екстрагування висушений каллюс просіювали через сита 1-6,3мм та отримували фракції 1,6; 2,5 та 4мм. Екстрагування в апараті Сокслета та фітохімічний скринінг проводили аналогічно до описаних вище методик (2.3, 2.4,2.5).

5.3. Дослідження кінетики екстрагування цільового компонента з *G. imbricatus* в апараті Сокслета та визначення виходу цільових компонентів в екстракті

Для вивчення кінетики екстрагування та визначення максимального виходу цільових компонентів *G. imbricatus* використовували апарат Сокслета, зображений на рис. 5.1.

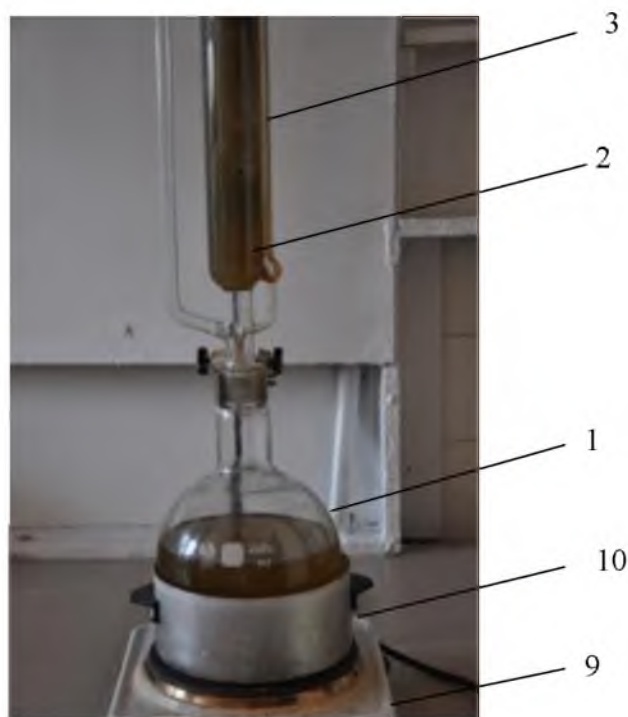
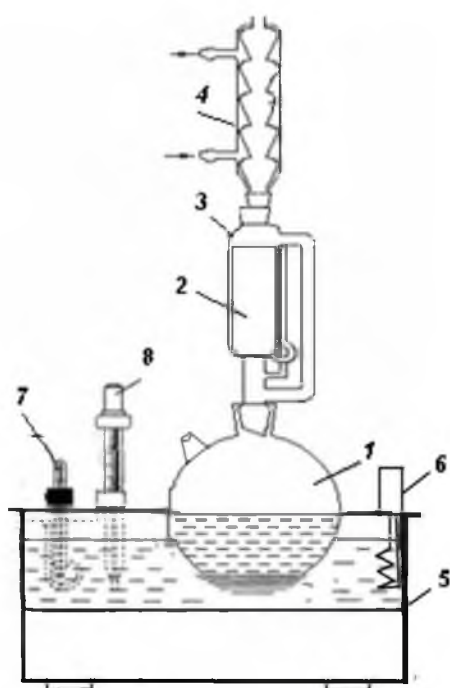


Рис 5.1. Схема апарату Сокслета:

1 – круглодонна колба ємністю 1000 мл; 2 – патрон із подрібненим насінням; 3 – екстрактор до апарату Сокслета; 4 – зворотний водяний холодильник; 5 – термостат; 6 – тен; 7 – контрольний термометр; 8 – контактний термометр; 9 – електроплитка; 10 – водяна баня.

Наважку висушеної калусної біомаси *G. imbricatus* (50 г) поміщали у патрон з фільтрувального паперу 2, який завантажували в екстрактор 3. У колбу 1 заливали 500 см³ розчинника для підтримки співвідношення Т:Р=1:10 і приєднували до екстрактора 3. Процес екстрагування проводився при температурі кипіння розчинника. Процес екстрагування проводили на протязі 6 годин до повного вилучення цільового компоненту. Нагрів колби до температури кипіння розчинника здійснювали в термостаті дистильованою водою. Для конденсації парів та подачі конденсату в зону екстрагування до екстрактора був приєднаний зворотний холодильник. Для одержання функції (зміна концентрації в часі) процес екстрагування в апараті Сокслета проводили на протязі певного часу. Через певні проміжки часу (120, 240, 360, 480, 600 хв) процес екстрагування зупиняли. Після чого колбу охолоджували, відбирали пробу фільтрату. Далі добавляли чистий розчинник в кількості відібраної проби, після чого знову нагрівали до температури кипіння розчину. Відібрані проби фільтрували через паперовий фільтр за допомогою вакуум насосу та аналізували на вміст екстрактивних речовин. Концентрацію цільового компоненту визначали згідно поданої вище методики.

На рис.5.2 представлені кінетичні криві екстрагування в апараті Сокслета, побудовані на основі даних наведених в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1.

Концентрація цільового компоненту, одержаної екстрагуванням з частинок калусу, культивованого в умовах *in vitro* при температурі кипіння, Т:Р=1:10 70% розчином етанолу , г/л.

Час, <i>t</i> , год	Концентрація цільового компоненту в розчині <i>C</i> , г/л		
	<i>d_c</i> =1.6 мм	<i>d_c</i> =2.5 мм	<i>d_c</i> =4 мм
0	0	0	0
0,5	19.4	16.1	14.1
1	26.4	19.6	16.4
2	31.3	26.8	21.4
4	34.4	31.7	27.1
6	34.9	33.8	31.2

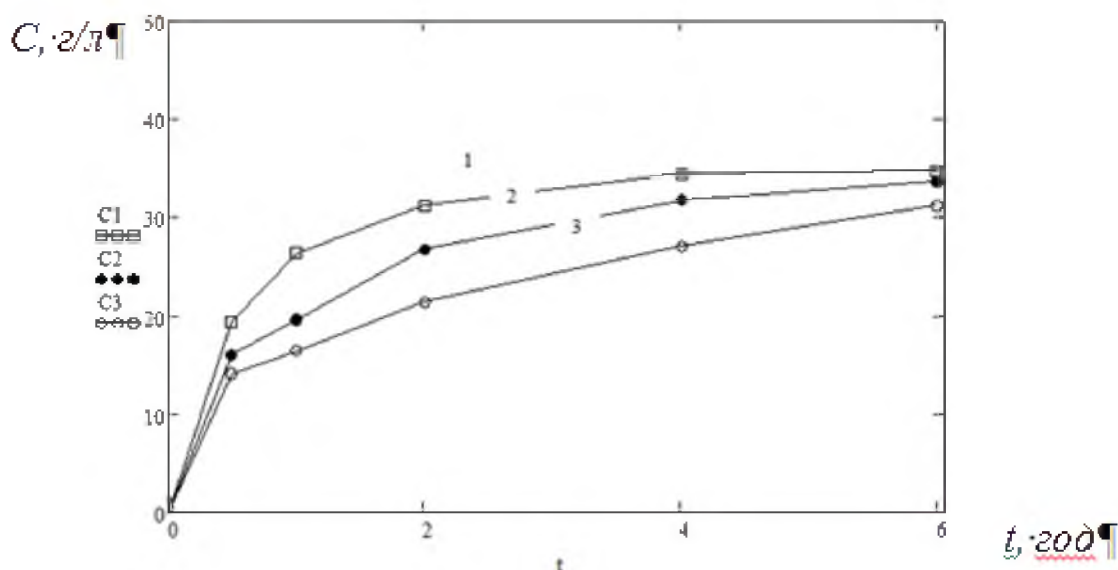


Рис. 5.2. Кінетичні залежності екстрагування цільового компонента з частинок калусу *G. imbricatus* при температурах кипіння в апараті Сокслета

1 – $d=1.6$ мм; 2 – $d=2.5$ мм; 3 – $d=4$ мм

Аналіз експериментальних досліджень кінетики екстрагування із частинок калусу *G. imbricatus*, культивованого в умовах *in vitro* показав вплив розміру частинок на кінетику процесу (залежності 1,2,3).

Аналіз цих залежностей показав, що зменшення розміру частинок інтенсифікує процес. Збільшення розміру частинок призводить до сповільнення швидкості процесу екстрагування, що пов'язує вплив на процес екстрагування стадії внутрідифузійного вилучення цільових компонентів.

Таким чином на основі експериментальних досліджень кінетики процес екстрагування при температурі кипіння екстрагенту протікає по змішаному механізму внутрідифузійному і зовнішньо-дифузійному механізмах.

5.4. Дослідження процесу екстрагування цільових компонентів з частинок калусу *G. imbricatus* в апараті з мішалкою

Як уже зазначалося, структура частинок калусу *G. imbricatus*, культивованого в умовах *in vitro* складалася з клітинних агрегатів (глобул) розміром 1-4мм, доцільно було провести експериментальні дослідження на предмет порівняння кінетичних закономірностей та виходу цільових компонентів із екстрактів

дикорослого виду та калусу *G. imbricatus*, культивованого в умовах *in vitro*, при одних і тих же умовах екстрагування. З цією метою, дослідження кінетики проводили в апараті з мішалкою при різних температурах та розмірах частинок за методикою, описаною в розділі 2. Експерименти проводили співвідношенні фаз 1:10. Визначення концентрації, яка відповідала моментам часу τ здійснювали по методиці згідно вимог Державної Фармакопеї України [11]. В якості екстрагенту використовували 70% розчин етилового спирту.

Результати досліджень наведені в табл. 5.2. та на рисунку 5.3.

Таблиця 5.2

**Експериментальні дані кінетики екстрагування з частинок калусу
G. imbricatus, культивованого в умовах *in vitro***

t , год	T = 40° C		T = 30° C		T = 20° C	
	$d_c=2,5\text{мм}$	$d_c=4.0\text{мм}$	$d_c=2,5\text{мм}$	$d_c=4.0\text{мм}$	$d_c=2,5\text{мм}$	$d_c=4.0\text{мм}$
0	0	0	0	0	0	0
0,5	15.3	13.3	12.3	11.3	10.2	8.1
1	22.1	20.1	18.3	18.3	15.3	14.4
2	29.6	26.6	26.5	25.5	24.4	22.6
4	32.7	30.9	30.3	30.3	28.6	27.5
6	33.4	32.0	32.0	31.0	30.4	29.3

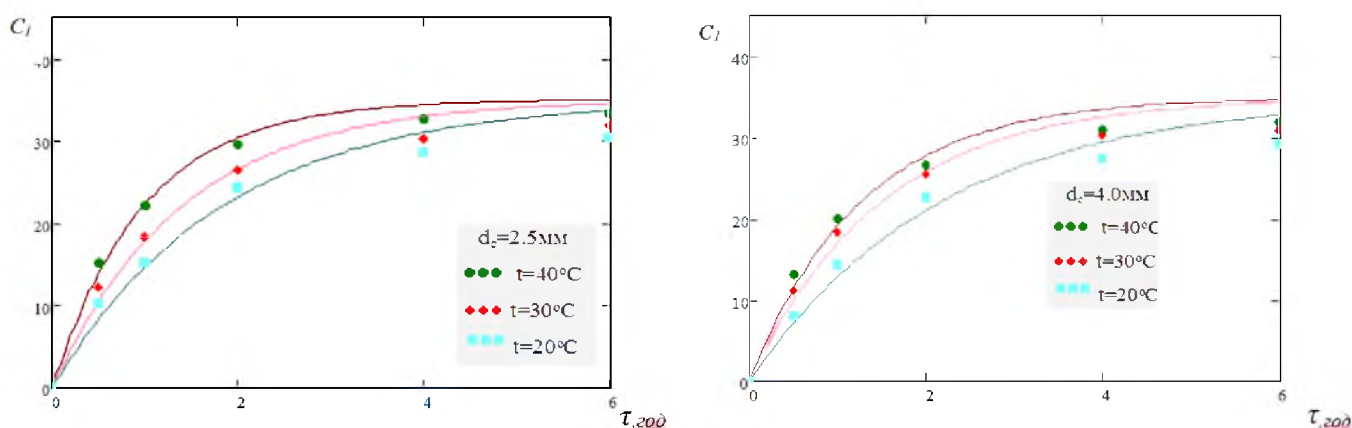


Рис. 5.3. Кінетичні криві $C_1 = f(\tau)$ кінетики екстрагування з частинок калусу *G. imbricatus*

Аналіз результатів експериментальних досліджень кінетики екстрагування цільових компонентів з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* і культивованого в умовах *in vitro* показав, що другим важливим фактором, який сприяє інтенсифікації

процесу вилучення цільових компонентів є температура і співвідношення фаз (Т/Р). що стосується вилучення цільових компонентів, то вони в кількісному і якісному відношенні близькі між собою, що дає можливість стверджувати, що глибинне культивування *G. imbricatus* в умовах *in vitro*, являється найбільш економічно вигідним процесом одержання екологічно чистої біомаси. Таким чином культивування *G. imbricatus* в умовах *in vitro* відповідає вимогам сьогодення.

5.5. Дослідження компонентного складу *G.imbricatus* та одержаної калусної маси

У результаті проведених досліджень вперше було визначено кількісний вміст окиснюваних фенолів, гідроксикоричних кислот, катехинів (спектрофотометричним методом), флавоноїдів (за методикою ДФУ I видання), дубильних речовин (за методом комплексометрії), аскорбінової кислоти, органічних кислот та полісахаридів в досліджуваній сировині. Визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти (в розрахунку на аскорбінову кислоту) та суми органічних кислот (в розрахунку на яблучну кислоту) проводили за методиками, викладеними в ст. 38 «Плоди шипшини» ДФ СРСР XI видання [133].

Для визначення суми фенольних сполук відповідно до результатів, одержаних згідно методики 2.3.4. будували стандартну криву (рис 5.4).

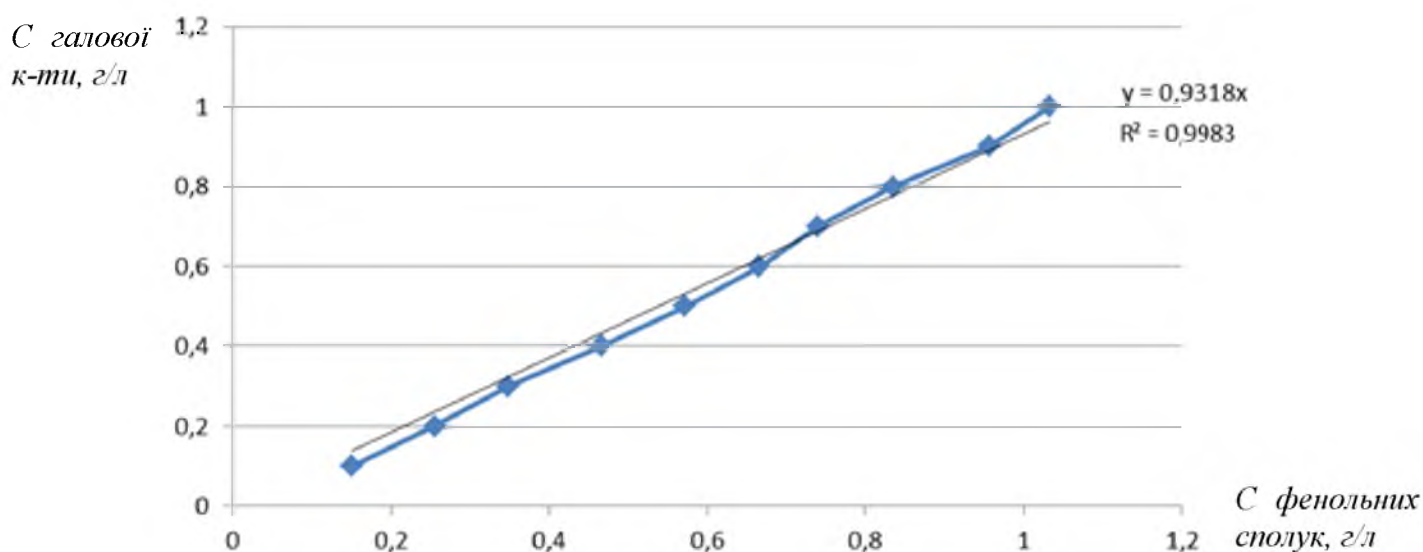


Рис. 5.4. Крива співвідношення концентрації галлової кислоти до оптичної густини.

Розрахунки проводили за наступним рівнянням, виходячи з стандартної кривої: $y=0,9318x$.

Таблиця 5.3.

Кількісне визначення ряду груп БАР в екстрактах *G. imbricatus* (у %, в перерахунку на абсолютно сухий залишок)

№ з/п	Група БАР, що визначалася	Вміст в субстанції з			
		цибулин и	трава	квіти	біомаса
1.	Сума окиснюваних фенолів	2,54±0,40	4,93±0,40	3,15±0,40	4,67±0,06
2.	Сума гідроксикоричних кислот в розрахунку на кислоту хлорогенову	1,05±0,06	3,67±0,08	1,98±0,08	3,98±0,17
3.	Сума флавоноїдів в розрахунку на кверцетин	3,96±0,08	5,73±0,17	4,78±0,03	5,54±0,01
4.	Дубильні речовини, в розрахунку на галотанін	1,45±0,03	2,34±0,03	1,87±0,03	3,04±0,02
5.	Сума катехінів, в розрахунку на(+)-катехін	1,86±0,03	1,65±0,03	0.8±0,03	2,01±0,15
6.	Аскорбінова кислота	1.67±0,03	4,65±0,14	3,42±0,23	1,45±0,14
7.	Сума органічних кислот (в розрахунку на яблучну кислоту)	4,43±0,01	7,85±0,17	2,36±0,17	6,78±0,03
8.	Сума полісахаридів	4,03±0,02	6,65±0,15	1,94±0,16	6,54±0,16

За допомогою хромато-мас спектрометричного аналізу нами було одержано піки, які свідчать про наявність певних груп БАР (рис. 5.5-5.14). Ідентифікацію сполук проводили шляхом порівняння одержаних мас-спектрів хроматографічного піку з мас-спектрами еталонних сполук з найбільшою вірогідністю ідентифікованих програмою розпізнавання на масиві спектрів бази даних. Кількісний вміст розраховували за відношенням площі піків компонентів до суми площ усіх піків на хроматограмі (метод нормалізації). В результаті серед БАР, що містяться в хлороформному екстракті дикоростучого виду *G. imbricatus*, ідентифіковано 9 сполук, в основному представлені вуглеводами та жирними кислотами (табл. 5.4).

На хроматограмі хлороформного екстракту біомаси *G. imbricatus*, знайдено 14 та ідентифіковано 12 сполук, які представлені вуглеводами, жирними кислотами та похідними терпеноїдів (табл. 5.5). Серед БАР, що містяться в екстракті бульбоцибулин *G. imbricatus* ідентифіковано 5 сполук – вуглеводні, аміни та жирні кислоти (табл. 5.6).

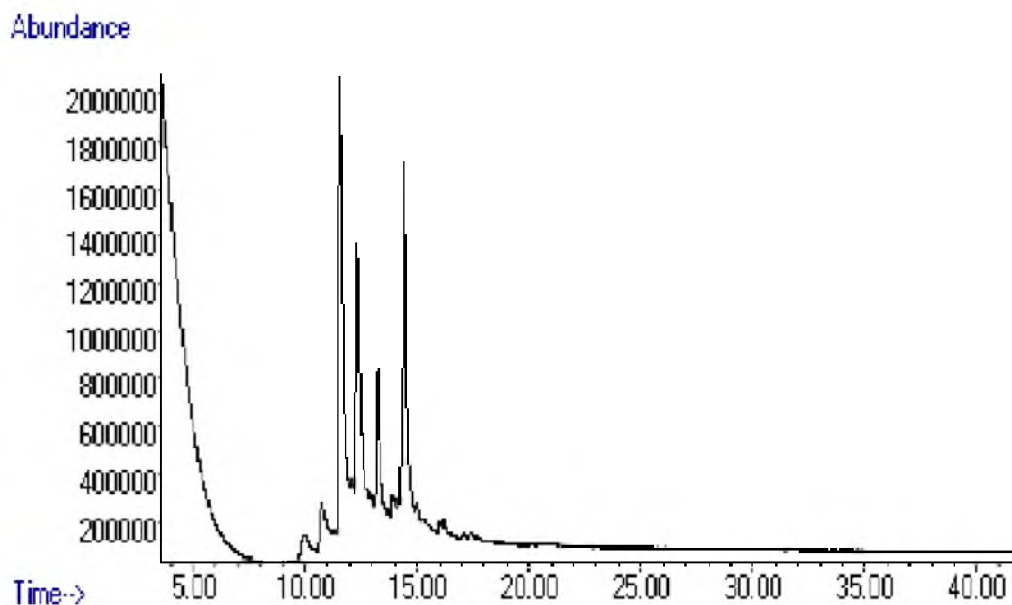


Рис. 5.5. Хроматограма хлороформного екстракту дикоростучого виду *G. imbricatus*.

Таблиця 5.4.

Компонентний склад хлороформного екстракту *G. imbricatus*.

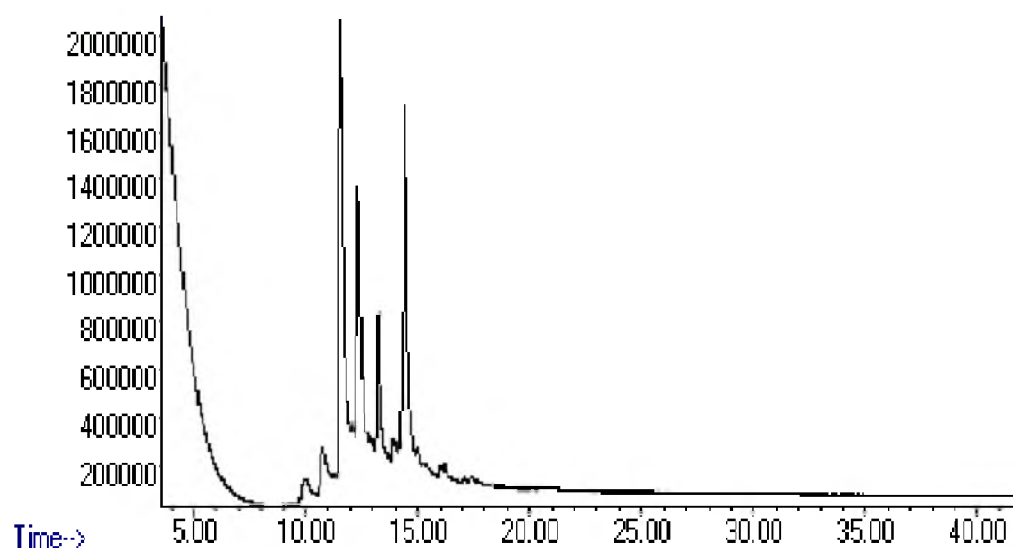
№ з/п	Назва сполуки	Формула	Характеристика		К-ть, % від суми всіх реч.
			MW	t _R , хв.	
Жирні кислоти					
1.	Пальмітинова кислота	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	414	13,209	10,8%
2.	Лауринова кислота	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	274	11,522	29%
3.	Мірістин	C ₂₁ H ₃₈ O ₆	386		19,8%
Терпени					
4.	(2S,3R)-2-децил-3-(5-метилгексил)оксиран	C ₁₉ H ₃₈ O	282	17,399	3,3%
Вуглеводні					
5.	Ейкозан	C ₂₀ H ₄₂	282	16,193	3,4%

Продовження табл.5.4.

6.	1-[п-Бромовеніл]-4-нітро-1,3-бутадиєн	$C_{10}H_8BrNO_2$	253	13,910	2,6%
7.	1,2-біс(гексилокси)-4-нітро бензин	$C_{18}H_{29}NO_4$	323	10,760	5,1%
8.	Піперазин	$C_4H_{10}N_2$	282	9,947	3,0%
9.	Нонакозан	$C_{29}H_{60}$	408	14,415	22,5%

Ейкозан, присутній в одержаних екстрактах, застосовується в косметичній промисловості як пластифікатор, диспергує пігменти і утримує вологу в шкірі [104].

Abundance

Рис. 5.6. Хроматограма хлороформного екстракту біомаси *G. imbricatus*

Таблиця 5.5.

Компонентний склад екстракту біомаси *G. imbricatus*

№ з/п	Назва сполуки	Формула	Характеристика		К-ть, % від суми всіх реч.
			MW	t_R , хв.	
Спирти					
1.	2-гексилдеканол-1-ол	$C_{16}H_{34}O$	242	18,763	2,7%
Жирні кислоти					

Продовження табл.5.4.

2.	Лауринова кислота	$C_{12}H_{24}O_2$	274	11,52	4,1%
3.	Лінолелаїдінова кислота	$C_{18}H_{32}O_2$	354	22,636	44,8%
4.	Трибутил ацетил цитрат	$C_{20}H_{34}O_8$	402	11,333	5,4%
5.	Олеїнова кислота	$C_{18}H_{34}O_2$	282	31,058	4,1%
Терпени					
6.	Фарнезол (3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триєн-1-ол)	$C_{15}H_{26}O$	222	13,986	4,6%
Вуглеводні					
7.	Нонакозан	$C_{29}H_{60}$	408	14,408	3,8%
8.	1,9-ейкозадієн	$C_{20}H_{38}$	278	18,168	9,0%
9.	1,13-тетра декадієн	$C_{14}H_{26}$	194	15,726	3,1%
10.	1-нонадецен	$C_{14}H_{38}$	266	16,570	4,4%
11.	Ейкозан	$C_{20}H_{42}$	282	16,148	5,9%
12.	Інден	C_9H_8	264	24,301	4,0%
13.	Нонадекан	$C_{19}H_{40}$	282	13,187	4,1%

Доцільно пов'язати фармакологічну властивість рослини з її хімічним складом. Так, в'яжучу, тонізуючу та заспокійливу дії екстракту *G. imbricatus* можна пояснити присутністю в ньому жирних кислот, таких, як олеїнова, лауринова, лінолелаїдінова, пальмітинова та мірестину [103]. Ці жирні кислоти є цінними вихідними хімікатами для одержання корисних хімічних продуктів. З них можна отримати епоксиди для пластифікаторів та компоненти для полімерів, здатні до біоруйнування адгезиви і полімери для медицини. Наприклад, окиснення олеїнової кислоти веде до утворення епоксидів та дигідроксисполук. Окиснювальне розщеплення — озоноліз — відбувається з деструкцією молекули з утворенням суміші альдегідів, спиртів та гідроксикислот. З рицинолевої кислоти — головного компонента рицинової олії — можна одержати себацінову кислоту, яку використовують у виробництві нейлону.

Активно ведуться дослідження реакцій метатезису вищих жирних кислот, унаслідок яких одержують нові функціонально заміщені ненасичені сполуки [91].

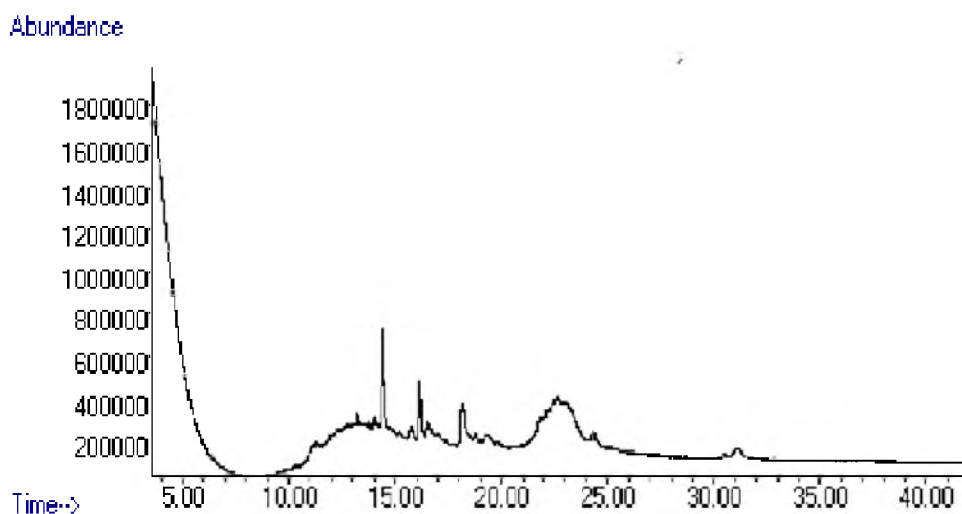


Рис.5.7. Хроматограма хлороформного екстракту бульбоцибулин *G. imbricatus*.

Таблиця 5.6.

Компонентний склад екстрактів бульбоцибулин *G. imbricatus*

№ з/п	Назва сполуки	Формула	Характеристика		К-ть, % від суми всіх реч.
			MW	t _R , хв.	
Аміни					
1.	N-(3-амінопропіл)-1,4-бутандіамін (спермідин)	C ₇ H ₁₉ N ₃	145	11,356	8,1%
Вуглеводні					
2.	Ейкозан	C ₂₀ H ₄₂	282	13,240	25,8%
3.	Октадецен-1-сульфоніл хлорид	C ₁₈ H ₃₇ ClO ₂ S	352	16,194	18,4%
Жирні кислоти					
4.	Транс-9-тетрадеканова кислота	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	18,236	10,2%
5.	Z-7-тетрадеканова кислота	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	226	23,329	15,8%

Аналізуючи дині таблиць, можна зробити висновок, що з різних частин дикорослого виду ширший і багатший діапазон БАР містить трава *G. imbricatus*, а калусна маса нічим не поступається по своєму компонентному складу від сировини, зібраної з природного фітоценозу.

Отже, можна констатувати біологічну цінність екстрактів *G. imbricatus* та прогнозувати їх використання в якості косметичних препаратів

Підтвердження наявності флаваноїдів проводили методом тонкошарової хроматографії за методикою 2.3.2.

На хроматограмах екстракту калусної маси косариків черепитчастих виявлені галангін, 3-гідроксибензойна кислота, кверцетин, кемферол, 3,4-гідроксибензойна кислота, рутин, що відповідали відповідним розчинам стандартних зразків за значенням Rf (табл. 5.7.).

Таблиця 5.7

ТШХ-ідентифікація БАР у екстракті біомаси *G. imbricatus*

Значення Rf після обробки хроматографа розчином Се-Р-Мо			Флуорисценція в УФ світлі при 254 нм			Ідентифікація БАР
Станд. зразки	Екстракт трави	Екстракт калусу	Станд. зразки	Екстракт трави	Екстракт калусу	
0,85	0,88	0,86	коричнева	коричнева	коричнева	Галангін
0,46	0,46	0,45	голуба	світло голуба	голуба	3-гідроксибензойна кислота
0,73	0,73	0,73				кверцетин
0,83	0,8	0,82	яскраво рожева	яскраво рожева	рожева	Кемферол
0,99	0,97	0,98	рожева	рожева	рожева	3,4-гідроксибензойна кислота
0,04	0,05	0,05	коричнева	коричнева	коричнева	рутин

Загалом у рідкому екстракті з дикорослого виду *G. imbricatus* на основі використання методу вискоєфективної рідинної хроматографії вперше було виявлено 19 речовин фенольної природи, з яких ідентифіковано 5.

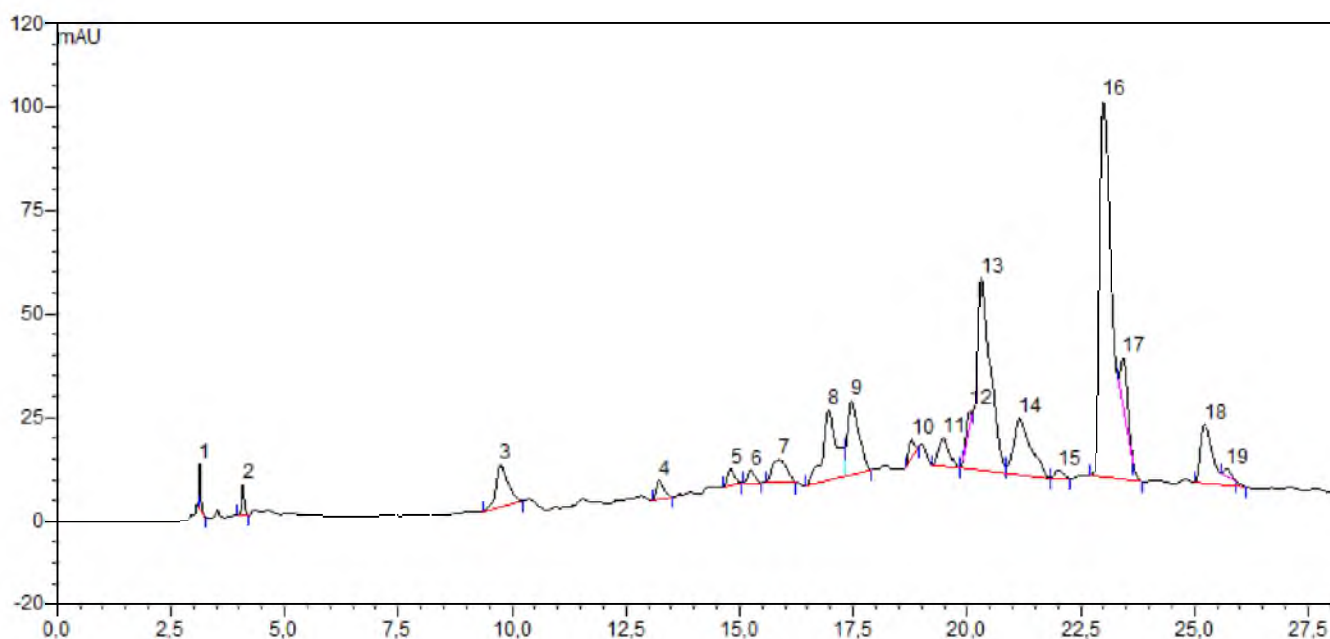


Рис. 5.8. Схема хроматограми фенольних сполук трави *G. imbricatus*

Основними компонентами екстракту з дикорослого виду *G. imbricatus* є: кавова кислота (3), морін (7), лютеолін (8), кемферол (10), галангін (14), піноцембрин (17).

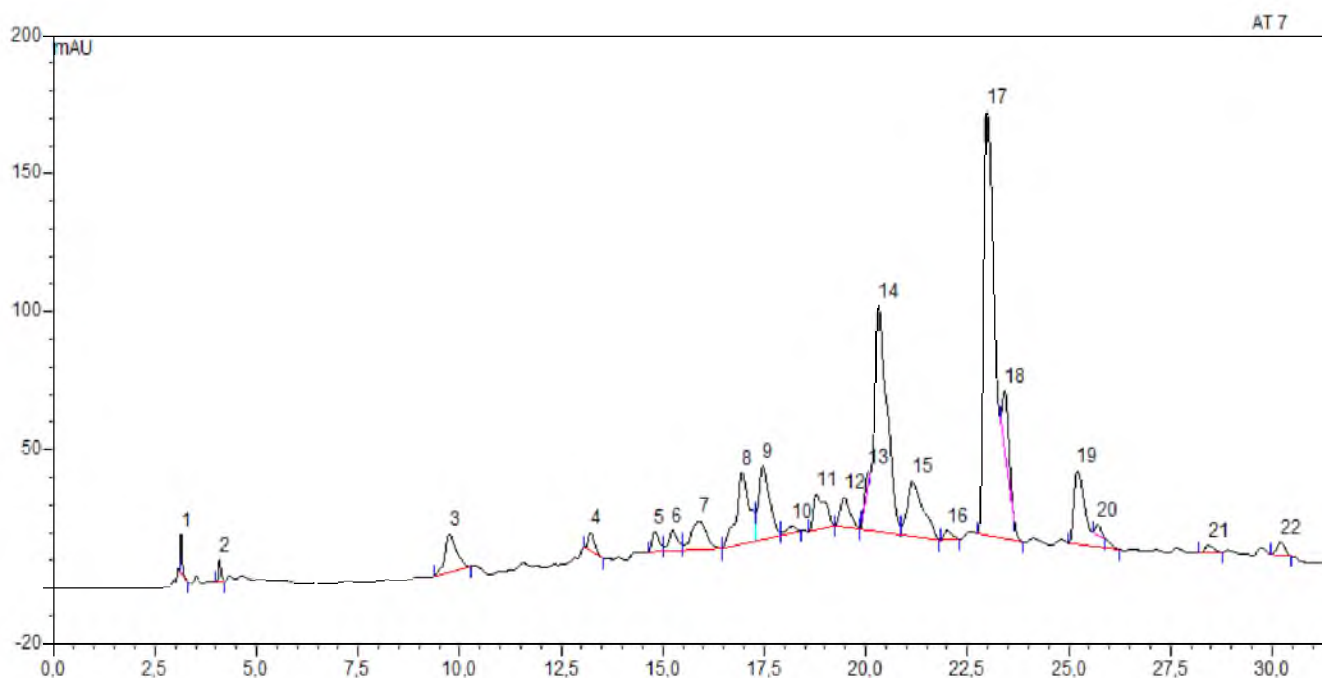


Рис. 5.9. Схема хроматограми фенольних сполук калусу *G. imbricatus*

Основними компонентами екстракту з калусу *G. imbricatus* є: мірицитин (5), морін (6), кверцетин (7), лютеолін (8), кемферол (11), наргенін (12), апігенін (13), піноцембрин (18).

5.6. Інтенсифікація процесів екстрагування зрідженими газами

В даний час привертає увагу методи, які сприяють більш ефективному вилученню цільових компонентів. Оскільки екстрагування рідкими екстрагентами пов'язане з великими енергозатратами (подрібнення, витрати тепла та ін.), до методів, які інтенсифікують процес на сьогодні відносяться екстрагування рідкими газами, екстрагування в умовах попередньої обжарки, екстрагування в полі електромагнітних сил, процеси екстрагування в умовах вібрації та ін. З цією метою для вибору іншого методу цікавим для нас було виявлення більш ефективного методу, до якого належить метод екстрагування зрідженими газами. В зв'язку з відсутністю необхідної апаратури, калусна біомаса *G. imbricatus* була передана для якісного і кількісного аналізу цільових компонентів, що знаходяться в ній. Одержані дані приведені в табл. 5.8. здійсненні по схемі, яка приведена на рис. 5.10.

Сучасна промислова екстракція повинна використовувати розчинники – екстрагенти, які володіють високою вибірковою здатністю і які відповідають вимогам сучасних стандартів якості і гігієни. Одним з вирішенням даної проблеми є використання перспективної технології одержання біологічно активних речовин (БАР) - екстрагування зрідженими газами та екстракція надкритичними флюїдами (НКФ). При використанні як екстрагента зріджених газів таких, як бутан, пропан, азот, амоніак, діоксид вуглецю, фреони, аргон із температурою кипіння нижче кімнатної, процеси окислення, розкладання, втрати цінних речовин та зміна їх властивостей при випаровуванні не відбудеться, оскільки дані екстрагенти випаровуються при кімнатній температурі. Одержані витяжки зберігаю всі екстраговані речовини в їх природному стані [80].

CO₂ – екстракт порівняно з екстрактами, які отримані з використанням інших розчинників, мають ряд переваг:

- максимально зберігають всі БАР і є абсолютно натуральним і екологічно чистим продуктом;
- є стерильними і діють бактерицидно на мікрофлору продукту, в який її вносять;
- передають смак і аромат сировини, з якої вони отримані;

- мають тривалий термін придатності (екстракт в герметичній упаковці може зберігатися не менше 2х років);
- містить комплекс природніх консервантів і антиоксидантів, які допомагають при зберіганні продукту, тим самим виключаючи застосування синтетичних консервантів;
- CO₂ – екстракти – готові продукти для безпосереднього використання для різних областей застосування, які не потребують додаткової обробки з метою видалення залишків розчинника;
- надкритичний CO₂ (Тк =31,1°C, Рк=7,38МПа) володіє фізичними властивостями, які межують з властивостями рідини і газу. Варіювання термодинамічних умов дозволяє суттєво змінювати фізичні властивості екстрагента (густина, дифузійну здатність іт.д.), тим самим змінювати селективність виділення компонентів суміші органічних речовин;
- CO₂ як розчинник не горюча і не вибухова речовина;
- може бути одержаний у великій кількості для промислових потреб, відносно недорогий.

Надкритична CO₂ – екстракція є ефективним, екологічно чистим методом виділення природніх БАР з натуральної сировини [81].

В даному експерименті наводяться результати дослідження перспективи використання метода екстракції надкритичним діоксидом гідрогену для вилучення комплексу БАР з лікарської рослинної сировини (ЛРС).

Для екстракції ми взяли одержаний екстракт біомаси *G. imbricatus*.

Мета екстракції - дослідити можливість вилучення окремих фракцій з екстракту біомаси *G. imbricatus*. за допомогою надкритичної флюїдної екстракції.

Надкритичну CO₂ – екстракцію біомаси *G. imbricatus* проводили на лабораторній установці надкритичної флюїдної екстракції УНФЕ-1. Блок- схема установки наведена на рис.5.8., основні технологічні параметри наведені нижче.

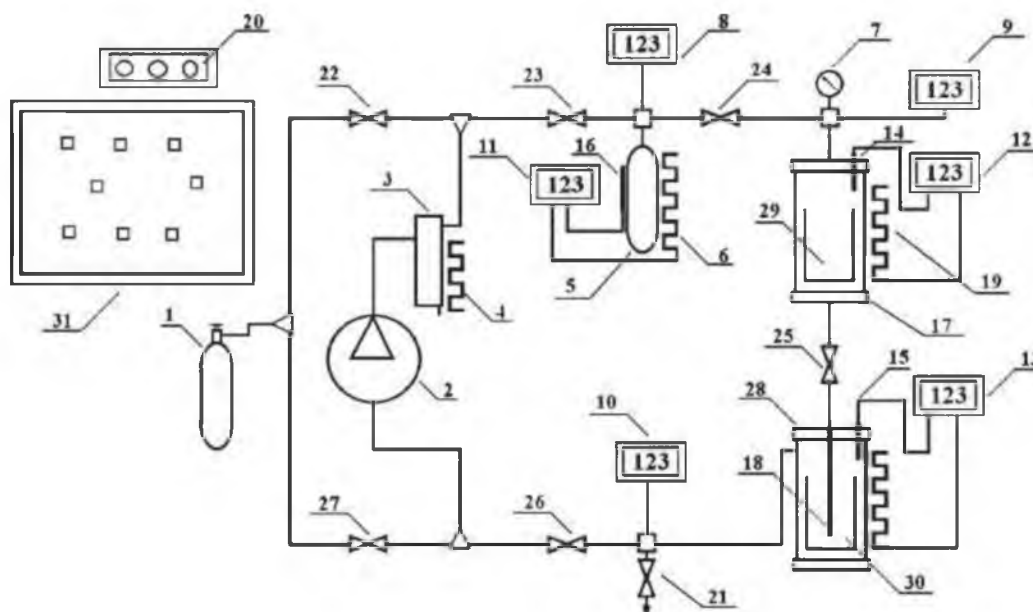


Рис. 5.10. Блок- схема установки надкритичної екстракції.

Об'єм ресивера екстракційної камери – 1100см³

Режим роботи – однократна екстракція; багатократна по замкнутому циклу з необмеженою кількістю циклів екстракції

Робочий тиск – 0,1-20 МПа

Максимальний робочий тиск екстракції – 22МПа

Контроль температури – цифрові програмовані управляючі терморегулятори з термопарами Т-типу

Комутація газових потоків – електромагнітними клапанами

Встановлення температури та тиску – ручна і автоматична

Температура рестриктора – 20-100°C

Максимальна температура екстракції - 80°C

Максимальна подача CO₂ – 500 моль/хв

Температура випарювача – 20-80°C

Температура вологомасловідділювача – 20-90°C

Об'єм екстракційної камери – 10-100 мл

Температура ресивера – 20-90°C

Споживана потужність – до 1 кВт

Мінімальний робочий тиск - % МПа

Час екстрагування – 1год

При проведенні одного циклу екстракції вуглекислий газ з балону (1) через пропускний клапан (27) поступає на компресор (2) і далі через вологомасловідділювач (осушувач повітря) (3) поступає в ресивер (5). За допомогою нагрівача ресиверу (6), а також за допомогою цифрових програмованих регуляторів тиску (8) і температури (11) створюється робочий тиск вуглекислого газу. Досягнувши параметрів надкритичного стану, надкритичний CO_2 поступає в реактор (17), в який завантажено певну кількість сировини, де саме і відбувається процес надкритичної екстракції. Температура флюїду в екстракторі вимірюється хромель-алюмелевою термопарою (14), яка введена безпосередньо в досліджуване середовище через корпус реактора із застосуванням спеціального ущільнюючого пристрою. Тиск надкритичного CO_2 в екстракторі вимірюється механічним манометром (7), а також цифровим баростатом (9) з датчиком Honeywell (USA).

В залежності від технологічних задач обладнання дозволяє, не розгерметизовуючи систему, проводити необмежену кількість циклів екстракції. Для цього закриттям електромагнітного клапану (27) перекривається доступ вуглекислого газу, який поступав з балону (1). Відкриттям клапана (26) на вхід компресора (2) переводиться в режим циклу вуглекислого газу. У випадку однократної екстракції клапан (26) перекривається і через випускний клапан (21) CO_2 випускається з випарювача у атмосферу.

Вилучення отриманого елюенту з випарювача (28) здійснюється після досягнення атмосферного тиску в ньому. При цьому спрацьовує контрольний індикатор залишкового тиску в системі (20). Цей самий індикатор використовується при промиванні (витиснення повітря із системи) вуглекислим газом при надлишковому тиску до 0,3 МПа- поріг спрацювання індикатора (20). Система температурного контролю забезпечує точність підтримки температури $\pm 1,0^\circ\text{C}$. Блок управління (31) дозволяє проводити роботу в ручному та напівавтоматичному режимах.

Продукти екстракції уловлювалися в абсорбуючому модулі при барботуванні продуктів екстракції в ємність з відповідним об'ємом гексану (хроматографічно чистий). Аналітичні дослідження складу отриманої фракції проводилось хромато-

мас спектрометричним методом на хроматографі Agilent Technology HP6890 GC з мас-спектрометричним детектором 5973N.

Схема хроматограм CO₂-екстракту біомаси *G. imbricatus* наведена на рис. 5.9.

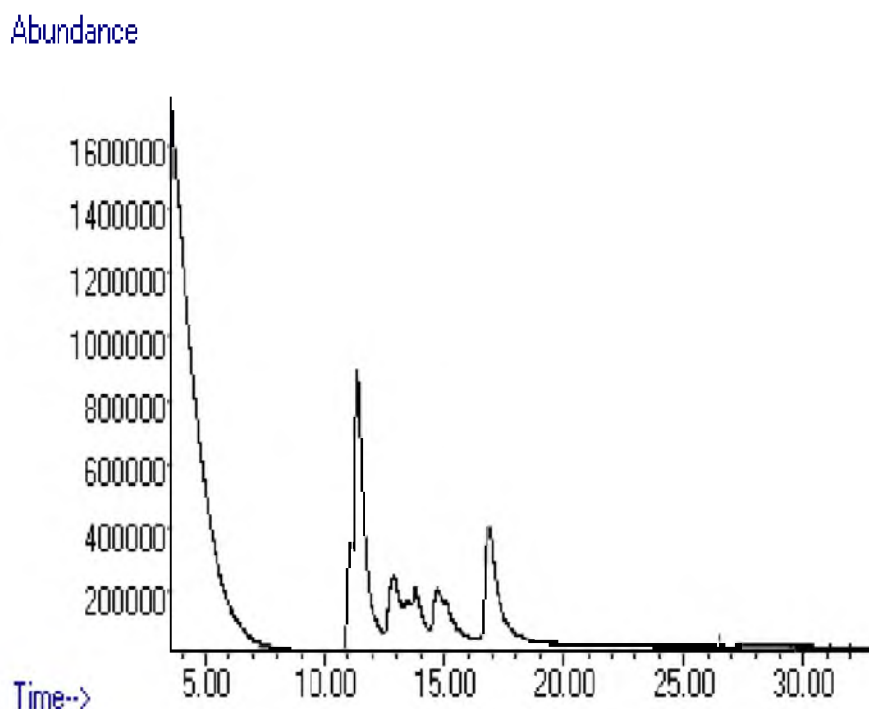


Рис. 5.11. Хроматограма CO₂-екстракту біомаси *G. imbricatus*

Таблиця 5.8.

Компонентний склад CO₂- екстракту біомаси *G. imbricatus*

№ з/п	Назва сполуки	Формула	Характеристика		К-ть, % від суми всіх реч.
			MW	t _R , хв.	
1.	Аконітова кислота	C ₆ H ₆ O ₆	174	11,145	11,26%
2.	Трибутил ацетил цитрат	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	402	11,348	52,07%
3.	9-Октадеценамід (амід олеїнової кислоти)	C ₁₈ H ₃₅ NO	281	12,878	7,9%
4.	13-докосенамід (амід ерукової кислоти)	C ₂₂ H ₄₃ NO	337	14,724	3,69%
5.	Амід бензойної кислоти	C ₇ H ₇ NO	121	16,819	6,6%
6.	2,4-дифтор-бензойна кислота	C ₇ H ₄ F ₂ O ₂	158	16,864	17,45%

Порівнюючи дані з раніше отриманими можна зробити висновок, що надкритичною флюїдною екстракцією можна вилучити ширший діапазон

компонентів екстракту (органічні кислоти та їх амід), проте вилучення цільових компонентів краще проводити водно-спиртовою сумішшю.

5.7. Висновки до розділу

1. Досліджено вихід екстрактивних речовин та суми флавоноїдів (в перерахунку на кверцетин) в залежності від виду екстрагенту. В якості оптимального екстрагенту, який вилучає максимальну кількість БАР був обраний спирт етиловий 70%, а співвідношення сировина-екстрагент 1:10 вихід екстрактивних речовин становив $34,93 \pm 3,02$.

2. Встановлено, що механізм екстрагування (лімітуюча стадія) є внутрішньо дифузійним. Визначені кінетичні закономірності процесу, вибрано необхідні математичні моделі процесу екстрагування, перевірено їх на адекватність.

3. Досліджено вплив таких параметрів як температура процесу та розмір частинок і показано, що зменшення розміру частинок та підвищення температури в значній мірі інтенсифікує процес екстракційного вилучення БАР з дикорослої рослини та калусної маси *G. imbricatus*.

4. Визначено константи екстрагування, знання яких необхідне для прогнозування процесу екстрагування в умовах виробництва.

5. Встановлено якісний та кількісний склад екстрактів з дикорослої рослини та калусної маси *G. Imbricatus*. Результаті проведених досліджень свідчать, що *G. imbricatus* є перспективною лікарською сировиною.

6. Хромато-мас-спектрометричним методом визначено компонентний склад екстрактів дикорослого виду *G. imbricatus* та екстрактів з культивованого в умовах *in vitro*. Ідентифіковані сполуки належать до таких класів БАР : вуглеводні, жирні кислоти, спирти, терпени та аміни. Було виявлено, що по компонентному складу біомаса не відрізняється від *G. imbricatus* зібраного з природнього джерела проростання.

РОЗДІЛ 6

ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ БІОМАСИ *GLADIOLUS IMBRICATUS* (СХЕМА ПРОЦЕСУ)

5.1. Загальна характеристика розділу.

В даному розділі розглядається питання пов'язані з розробкою складного технологічного процесу одержання БАР з культивованої біомаси *G. imbricatus*. Даний процес є надзвичайно складним, оскільки здійснюється не з рослинної сировини безпосередньо, а з культури клітин. На сьогоднішній день одержання екстракту може здійснюватись без технологічної переробки ЛРС, що значно зменшить витрати на виготовлення відповідних ліків. Цей процес складається з таких окремих стадій:

1. Стадія підготовки посівного матеріалу.
2. Приготування поживного середовища.
3. Культивування біомаси.
4. Екстрагування.

На основі даних, одержаних в пунктах 1-4 буде представлений необхідний матеріал для розрахунку цих складних процесів.

Також проведений процес оптимізації глибинного культивування *G. imbricatus*, який складався з серії дослідів, в яких вирішувалось завдання отримання цільового продукту у вигляді вирощеної біомаси з максимальним вмістом БАР в ній.

На основі розрахункових даних буде розроблена і представлена технологічна схема на основі експериментальних досліджень.

6.2. Суспензійне культивування біомаси *G. imbricatus*

Глибинне культивування має ряд переваг в порівнянні з поверхневим: може бути економічно більш вигідним, надає можливість масштабування біотехнологічного процесу та керування ним. Культура клітин розвивається в

однакових повністю контрольованих умовах. Крім того, аерація і механічне перемішування середовища, яке значно прискорює дифузію речовин, сприяють максимальному росту біомаси і накопиченню продуктів метаболізму в ній. Все це дозволяє скоротити тривалість процесу, підвищити вихід продукту з сировини та отримувати однорідну стандартизовану продукцію високої якості із заданими властивостями, що гарантує ефективність та безпечність одержуваних цільових компонентів [13-16, 25].

Культивування культури проводили в лабораторних умовах глибинним методом у ферментері, який обладнаний магнітною мішалкою, що дозволяє м'яко перемішувати культуральну рідину. Ферментер обладнаний термометром та барботером. Культивування відбувалося за температури 24-28°C, відносної вологості повітря 80-85%, на стандартному глюкозо-пептонному поживному середовищі Мурасиге-Скуга з фітогормонами НОК (0,5 мг/л), ІОК (3,0 мг/л), кінетин (0,5 мг/л) при постійному перемішуванні.

Суспензійну культуру ініціювали з глобулярних калусів крихкої структури, одержаних в попередніх дослідах. Посівний матеріал брали в кількості 10% від об'єму поживного середовища.

Субкультивування проводили один раз в п'ять днів. Через 3 місяці була отримана мілкоагрегована, морфологічно однорідна суспензія, активна в рості.

Процес культивування ведуть доти, доки триває інтенсивний синтез цільового продукту і доки не будуть вичерпані поживні речовини середовища. При визначенні кінця культивування необхідно враховувати дані мікроскопічного контролю стану культури, відсутність сторонньої мікрофлори, концентрацію основних поживних речовин, рН поживного середовища, біомаси тощо.

У процесі культивування *G. imbricatus* кожні 4 –6 год, відбирали зразки культуральної рідини. Кількість біомаси визначалася ваговим методом після її відділення від культуральної рідини фільтруванням та висушуванням до сталої маси при 105 °С; кількість флаваноїдів визначали спектрофотометричним методом.

Крива росту отриманої суспензійної клітинної культури за безперервного вирощування наближається до типової S-подібної форми (рис. 6. 1).

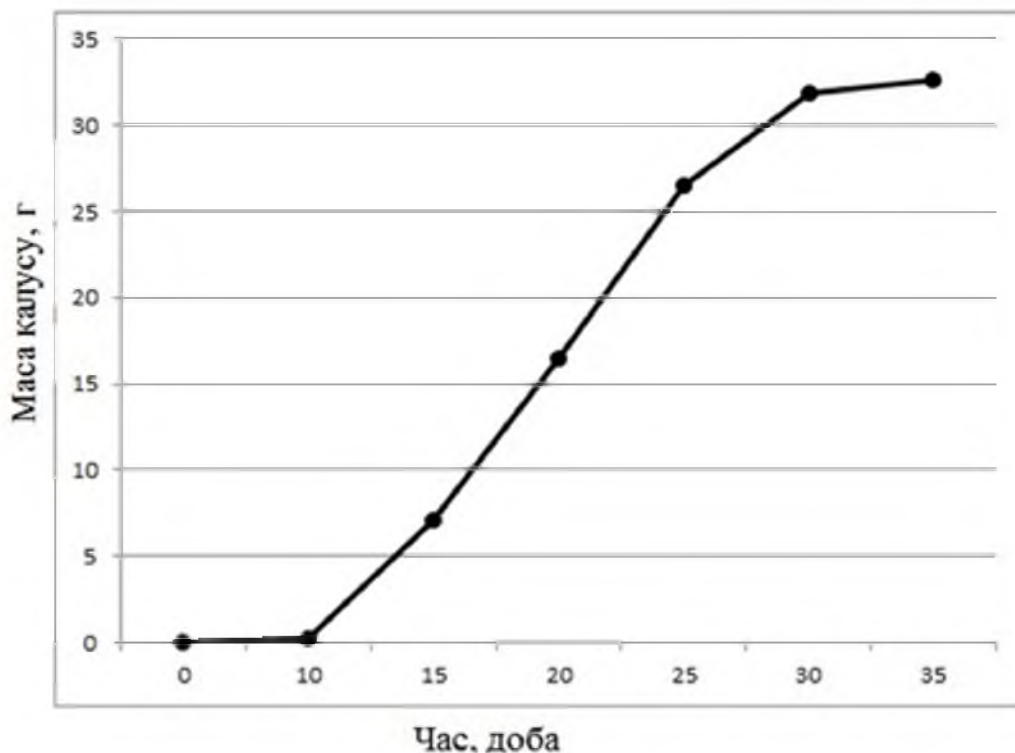


Рис. 6.1. Крива росту суспензійної культури клітин *G. imbricatus*

У результаті досліджень було встановлено, що фаза ростового циклу тривала наступні проміжки часу. Лаг-фаза тривала 4 дні, логарифмічна – 6 днів, лінійна – 3 дні, потім відбувався вихід кривої на плато (фаза сповільненого росту) після якої спостерігалась поступов загибель клітин у суспензії.

Важливим фактором, який впливає на накопичення біомаси і культуральній рідині є кількість обертів при перемішуванні. Адже інтенсивне перемішування може призвести до руйнування клітин та припинення їх росту. Повільне перемішування може навпаки, сповільнити процес в результаті недостатнього надходження поживних речовин. Тому важливим є підбір оптимальної кількості обертів мішалки.

Для експерименту вибрано три позиції кількості обертів магнітної мішалки :

- 50 об/хв.;
- 80 об/хв.;
- 120 об/хв..

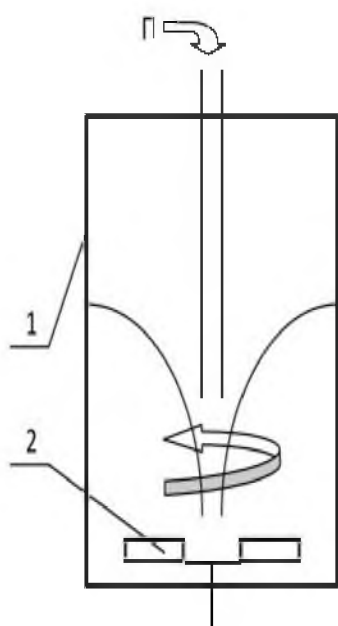


Рис. 6.2. Схема реактора



Рис. 6.3. Лабораторна установка



Рис. 6.4. Біореактор

Досліджено процес нагромадження біомаси та флавоноїдів при різних обертах мішалки. Одержані дані представлені на рис. 6.5.-6.7.

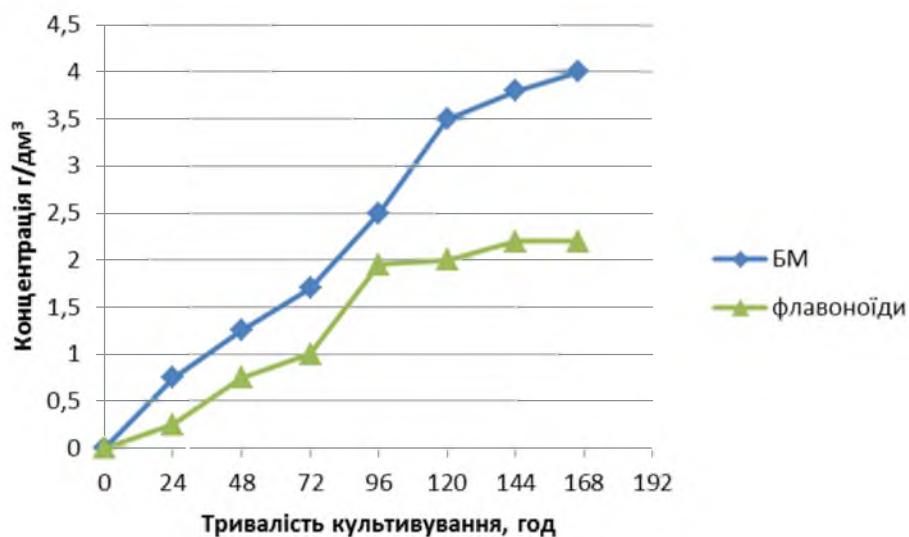


Рис. 6.5. Динаміка нагромадження біомаси *G. imbricatus* та флавоноїдів (50 об/хв)

Незначні оберти перемішуючого пристрою сприяють накопиченню біомаси, при цьому флавоноїди синтезується у незначній кількості. Більш інтенсивне перемішування призводить до посилення синтезу вторинних метаболітів (рис. 6.6.).

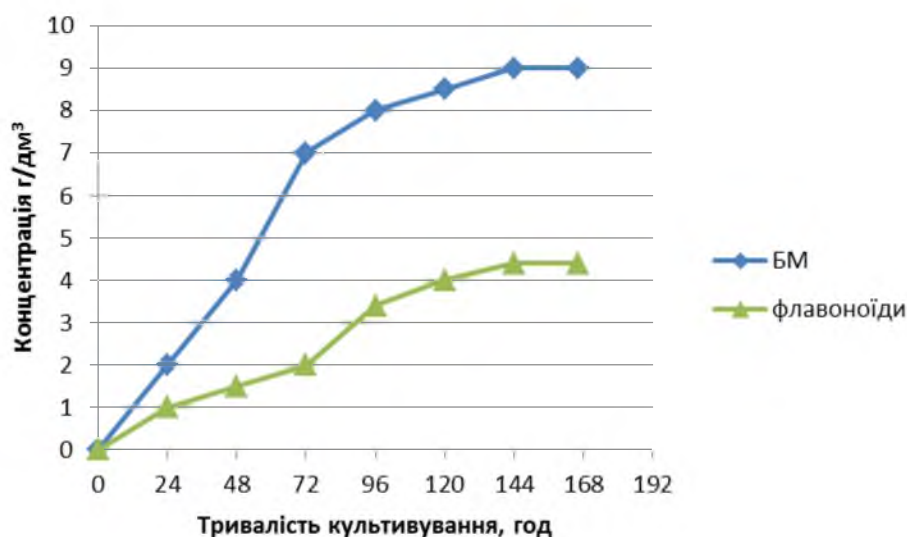


Рис. 6.6. Динаміка нагромадження біомаси *G. imbricatus* та флаваноїдів (80 об/хв)

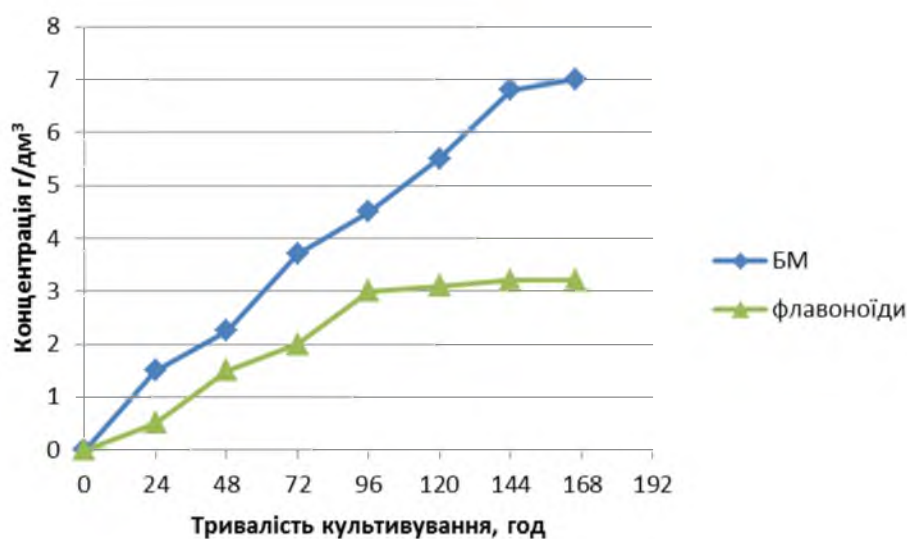


Рис. 6.7. Динаміка нагромадження біомаси *G. imbricatus* та флаваноїдів (120 об/хв).

При дослідженні впливу перемішування на накопичення біомаси та флаваноїдів при культивуванні *G. imbricatus* на рідкому глюкозо-пептонному поживному середовищі, що здійснювали при 50 об/хв та 80 об/хв та 120 (рис. 6.5.-6.7.), встановлено, що максимальна кількість флаваноїдів синтезується при перемішуванні 80 об/хв — $4,4 \pm 1,1$ г/дм³, що на 50 % більше, ніж при перемішуванні 50 об/хв. і на 27 % більше ніж при 120 об/хв.

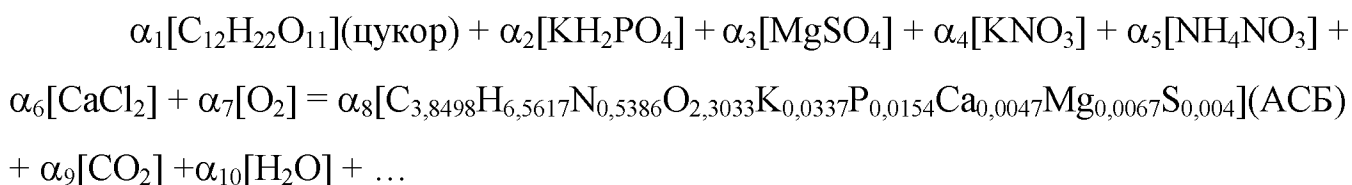
6.3. Розрахунок процесу культивування

Недоліки відомих способів одержання біологічно активних сполук екстракцією з рослинної сировини усуваються при отриманні їх з біомаси клітин рослин шляхом вирощування клітин рослин в культурі.

В культуру вводять клітини з різних органів рослини: кореню, листа, черешка, стебла, квітконоса і т.д. Доведена здатність культур рослинних клітин до синтезу речовин, властивих інтактній рослині, при цьому деякі рослинні клітини продукують їх у кількостях навіть більших, ніж дикоросла рослина. Тому культури клітин рослин становлять інтерес як джерело отримання різних речовин для фармацевтичної, парфумерно-косметичної, харчової та хімічної промисловостей.

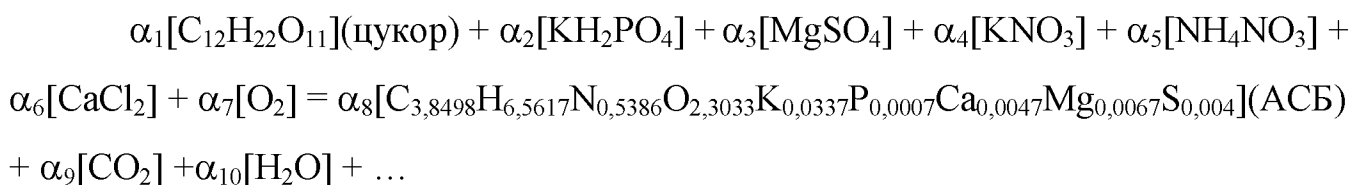
Після дослідження динаміки росту та синтезу БАР культурою клітин *G. imbricatus* на поживному середовищі Мурасіге і Скуга розраховано інтегральне стехіометричне рівняння процесу для визначення матеріального балансу при масштабуванні процесу накопичення біомаси *G. imbricatus*.

Для розрахунків прийняли наступне стехіометричне рівняння:



Як і для інших культивованих рослин, прийmemo брутто-формулу АСБ *G. imbricatus*: $\text{C}_{3,8498}\text{H}_{6,5617}\text{N}_{0,5386}\text{O}_{2,3033}\text{K}_{0,0337}\text{P}_{0,0337}\text{Ca}_{0,0047}\text{Mg}_{0,0067}\text{S}_{0,004}$ (мол. маса 99,99).

Незакінчене стехіометричне рівняння процесу культивування можна записати як:



Довільно прийmemo $\alpha_1 = 1$. Використовуючи рецептурні співвідношення знаходимо:

$$\frac{342}{\alpha_2 \cdot 136} = \frac{3}{0,017}. \quad \text{Звідси } \alpha_2 = 0,0143$$

$$\frac{342}{\alpha_3 * 120} = \frac{3}{0,037}$$

$$\text{Звідси } \alpha_3 = 0,0351$$

$$\frac{342}{\alpha_4 * 101} = \frac{3}{0,19}$$

$$\text{Звідси } \alpha_4 = 0,2145$$

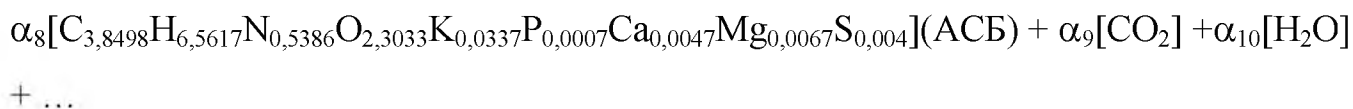
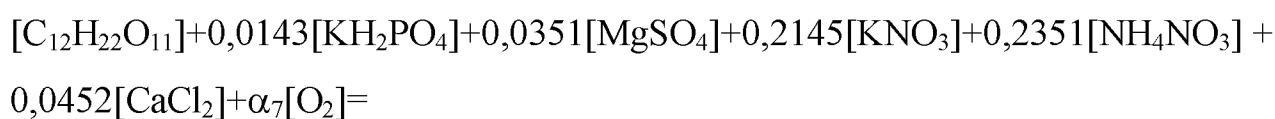
$$\frac{342}{\alpha_5 * 80} = \frac{3}{0,165}$$

$$\text{Звідси } \alpha_5 = 0,2351$$

$$\frac{342}{\alpha_6 * 111} = \frac{3}{0,044}$$

$$\text{Звідси } \alpha_6 = 0,0452$$

Стехіометричне рівняння набуває вигляд:



Таблиця 6.1

Модифіковане середовище Мурасіге і Скуга

№ з/ч	Інгредієнт	Концентрація, мг/л	Концентрація, мас.%
1	Сахароза	30000	3
Макроелементи			
2	KH ₂ PO ₄	170	0,017
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	0,037
4	KNO ₃	1900	0,19
5	NH ₄ NO ₃	1650	0,165
6	CaCl ₂	440	0,044
Мікроелементи			
7	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,000025
8	H ₃ BO ₃	6,2	0,00062

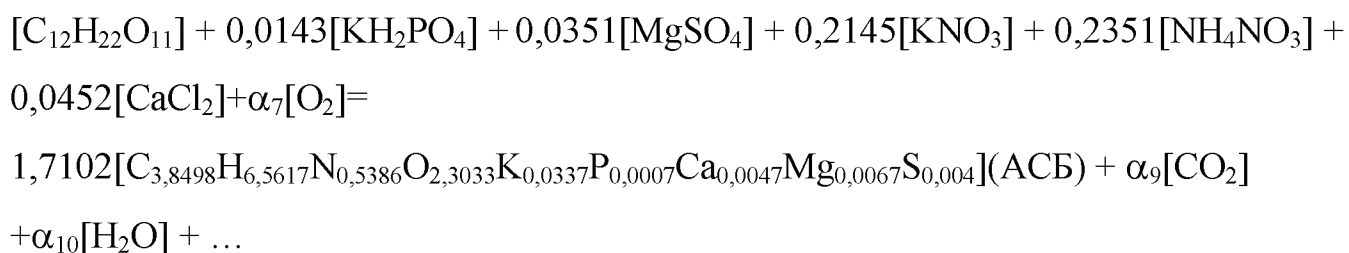
Продовження табл.6.1.

9	MnSO ₄ ·5H ₂ O	22,3	0,00223
10	KI	0,83	0,000083
11	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,00086
12	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0000025
13	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0000025
14	Хелат заліза: Na ₂ EDTA FeSO ₄ ·7H ₂ O	37,3 27,8	0,00373 0,00278
Інші речовини			
15	Мезоінозит	100	0,01
16	Гліцин	2	0,0002
17	Рібофлавін (B ₂)	0,1	0,00001
20	Піридоксин (B ₆)	0,5	0,00005
22	Нікотинамід (PP)	0,5	0,00005
23	Кобаламін (B ₁₂)	0,0015	0,00000015

У відповідності з “нормальною” витратою вуглецьмісного субстрата (цукру) з 2 кг сахарози утворюється 1 кг АСБ.

$$\text{Отже, } \frac{342}{\alpha_8 * 98,96} = \frac{2}{1}. \quad \text{Звідси } \alpha_8 = 1,7102$$

Стехіометричне рівняння приймає вигляд:



Баланс за атомами магнію

Нестача іонів магнію дорівнює $0,0351 - 0,0115 = 0,0236$. Додаємо магній сульфат.

Складаємо баланс за атомами сірки

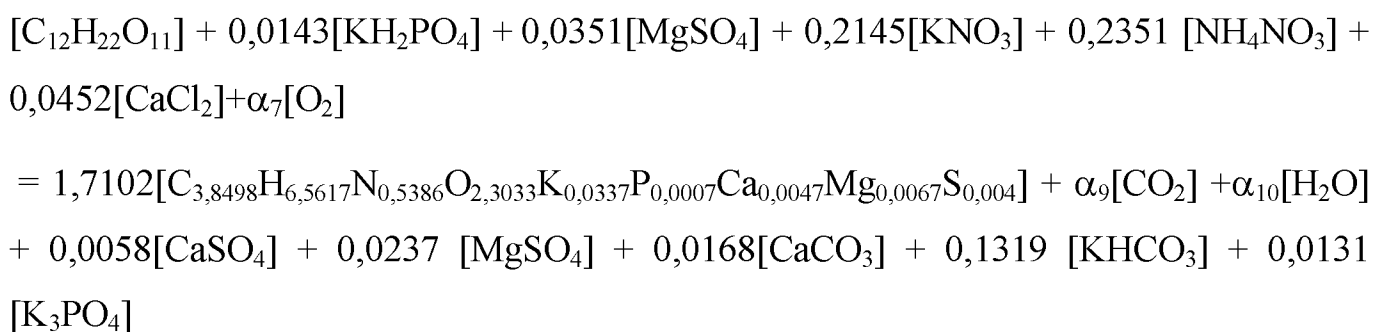
Надлишок сірки становить $0,0351 - 0,0068 = 0,0283$. Вільна сірка буде виділятися у вигляді сульфатної кислоти.

Баланс за атомами калію

Нестача атомів калію дорівнює $0,2287 - 0,0576 = 0,1712$. Цей надлишок утворить кислий вуглекислий калій.

Баланс за атомами фосфору

Надлишок за фосфором становить $0,0143 - 0,0012 = 0,0131$. Цей надлишок перетвориться у фосфорну кислоту. Три моля вуглекислого калію реагують з одним молем фосфорної кислоти з утворенням $0,0131$ фосфату калію. Рівняння приймає вигляд:

*Складаємо баланс за атомами азоту*

Дефіцит азоту дорівнює $0,6847 - 0,9211 = 0,2364$. На цю, але половинну, величину збільшуємо стехіометричний коефіцієнт при нітраті амонію.

Баланс за атомами кальцію

Надлишок іонів кальцію становить $0,0452 - 0,0080 = 0,0372$. Надлишок, взаємодіючи з сульфатною кислотою, утворить сульфат кальцію (0,0046 молів), решта надлишку утворить CaCO_3 (0,0326 молів).

Баланс за атомами карбону речовин з відомими коефіцієнтами

Надлишок вуглецю дорівнює $12 - 6,7784 = 5,2516$ (α_9).

Баланс за атомами водню речовин з відомими коефіцієнтами

Надлишок водню дорівнює $23,4418 - 11,2947 = 12,1471$. Таким чином, коефіцієнт $\alpha_{10} = 12,1471/2 = 6,0735$.

Баланс за атомами кисню

Недолік атомів кисню становить $21,1542 - 12,901 = 8,2532$. Цей недолік компенсується аераційним киснем. Отже, коефіцієнт $\alpha_7 = 8,2532/2 = 4,1266$.

Таблиця 6.2

Матеріальний баланс біосинтезу суспензійної культури *G. imbricatus*

Взято, кг				Одержано			
Речовина	Мол. маса	Стехіометричний коефіцієнт	Маса, кг	Речовина	Молекулярна маса	Стехіометричний коефіцієнт	Маса, кг
Глюкоза	342	1	342,0000	АСБ	99,99	1,7102	171,0029
KH_2PO_4	136	0,0143	1,9448	CO_2	44	5,2516	231,0704
MgSO_4	120	0,0351	4,212	H_2O	18	6,0735	109,323
KNO_3	101	0,2145	21,6645	CaSO_4	136	0,0046	0,6256
NH_4NO_3	80	0,3533	28,262	Mg SO_4	84	0,0237	1,9908
CaCl_2	111	0,0452	5,0172	CaCO_3	100	0,0326	3,26
O_2	32	4,1266	132,0512	KHCO_3	120	0,1319	15,828
				K_3PO_4	212	0,0131	2,0594
		Разом	535,1517			Разом	535,1601

Приймаємо, що ступінь конверсії субстратних речовин становить 90%. Матеріальний баланс з врахуванням ступеня конверсії становить:

Таблиця 6.3

Неузгоджений з проектною потужністю матеріальний баланс біосинтезу суспензійної культури *G. imbricatus* з урахуванням ступеню конверсії

Взято, кг		Одержано, кг	
Г	342	АСБ $171,00 \cdot 0,9 =$	153,9
KH_2PO_4	1,94	$\text{CO}_2 231,07 \cdot 0,9 =$	207,95
MgSO_4	4,21	$\text{H}_2\text{O} 109,32 \cdot 0,9 =$	98,39
KNO_3	21,66	$\text{CaSO}_4 0,63 \cdot 0,9 =$	0,57
$\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 0,9$	25,43	$\text{MgSO}_4 1,99 + 4,21 \cdot 0,1$	2,41
CaCl_2	5,02	$\text{CaCO}_3 3,26 \cdot 0,9 =$	2,93
$\text{O}_2 132,05 \cdot 0,9$	118,85	$\text{KHCO}_3 15,83 \cdot 0,9 =$	14,25
		$\text{K}_3\text{PO}_4 2,05 \cdot 0,9 =$	1,84
		Цукор $342 \cdot 0,1 =$	34,2
		$\text{KH}_2\text{PO}_4 1,94 \cdot 0,1 =$	0,19
		$\text{KNO}_3 21,66 \cdot 0,1 =$	2,12
		$\text{CaCl}_2 5,02 \cdot 0,1 =$	0,50
Разом	519,11	Разом	519,67

Одержані числові значення можуть бути використані для розрахунку проекту виробництва БАР з культивованої біомаси *G. imbricatus*, який представлений в Додатку Б.

Після дії 70 %-го етанолу живі клітини культури гинуть, їх мембрани втрачають напівпроникність, об'єм клітин зменшується в 1,5...2 рази (прийmemo в 1,5 рази). При цьому здатні до екстракції речовини частково виходять в рідку фазу екстракту, частково залишаються в клітинній масі.

На екстракцію беруть 70 %-й етанол у об'ємному співвідношенні до клітинної маси 10:1.

Густина клітинної маси приблизно дорівнює $0,67 \cdot 1000 + 0,33 \cdot 1300 = 1099$ кг/м³. Первинний об'єм клітинної маси $513,18 / 1099 = 0,47$ м³. Після оброблення її спиртом об'єм маси зменшується до $0,47 / 1,5 = 0,31$ м³.

Об'єм органічної основи маси дорівнює $0,33 \cdot 513,18 / 1300 = 0,13 \text{ м}^3$. Об'єм порожнин клітинної маси, який заповнюється екстрактом, становить $0,31 - 0,13 = 0,18 \text{ м}^3$.

На екстракцію потрібно взяти $0,47 \cdot 10 = 4,7 \text{ м}^3$ 70 об.%-го спирту. Густина спиртового розчину становить 846 кг/м^3

Відтак, маса 70 об. %-го спирту, який потрібно взяти на екстракцію, становить $4,7 \cdot 846 = 3976,2 \text{ кг}$, при цьому масовий вміст абсолютного спирту буде становити $0,7 \cdot 4,7 \cdot 780 = 2566,2 \text{ кг}$, а об'єм – $0,7 \cdot 4,7 = 3,29 \text{ м}^3$.

Загальний об'єм розбавленого спирту повинен становити $3,29 + 1,19 = 4,48 \text{ м}^3$, а об'ємний вміст спирту в цьому розчині – $3,39 \cdot 100 / 4,48 = 75,7 \text{ об. \%}$.

Приймемо, що в екстракт переходить 95 % екстрактивних речовин. Відтак, маса екстракту, не відділеного від шроту, буде становити $0,95 \cdot 8,6 + 3976,2 = 3984,4 \text{ кг}$ ($4,71 \text{ м}^3$).

Шрот після відділення екстракту буде утримувати $0,18 \text{ м}^3$ екстракту. Отже, в дійсності ми одержимо $4,71 - 0,18 = 4,53 \text{ м}^3$ екстракту ($4,53 \cdot 3984,4 / 4,71 = 3832,13 \text{ кг}$).

Таблиця 6.4.

Неузгоджений з проектною потужністю баланс екстракції біомаси

Взято, кг		Одержано, кг	
Вологий осад	738,11	Непромийтий шрот	660,75
75,7 об.%-й етанол	3754,77	Екстракт	3832,13
Разом	4492,88	Разом	4492,88

Узгодження матеріальних балансів з проектною потужністю

Тривалість ферментації триває 14 діб. Додатковий час становить 2 доби, отже, повний цикл триває 16 діб. При ресурсі робочого часу 330 діб за рік можна провести $330 / 16 = 21$ цикл.

Припустимо, що для лікувальних цілей *G. imbricatus* потребує кожний сотий українець. Тоді річна потреба в екстракті буде становити 321750 л/рік (із запасом – $350 \text{ м}^3/\text{рік}$).

За один цикл потрібно виробляти $350/21 = 16,67 \text{ м}^3$ екстракту.

Згідно з попередніми розрахунками за цикл одержують $4,53 \text{ м}^3$ екстракту.

Відтак, усі цифри попередніх балансів потрібно збільшити в $16,67 / 4,53 = 3,68$ разів.

Всього $KP \ 11328,9 \cdot 3,68 / 1099 = 37,93 \text{ м}^3$, а повний об'єм ферментера при коефіцієнті завантаження 0,7 дорівнюватиме $54,19 \text{ м}^3$.

6.4. Розроблення технологічної схеми виробництва біомаси *G.imbricatus*

Проведення теоретичних і експериментальних досліджень по вивченню кінетичних закономірностей дали змогу визначити необхідні умови процесу екстрагування. Підібрані математичні моделі дали можливість вивчити найбільш повільну стадію, яка визначає швидкість всього процесу. Разом з тим, виникла необхідність визначити умови проведення процесу у виробництві, підібрати необхідну апаратуру та інше.

Проведені дослідження є основою для розробки технологічної схеми процесу екстрагування, які б дали можливість одержати більш надійні параметри проведення процесу. Експериментальні дослідження дали можливість підібрати найбільш ефективний екстрагент, який відповідав би необхідним вимогам.

Вивчення процесу починали з дослідження певних технологічних параметрів культивування (температура, освітленість, інтенсивність перемішування, склад середовища, рН та ін.), які лежать в основі розробки раціональної біотехнології більшості методів вирощування культури клітин в умовах *in vitro*.

Поживне середовище – основний фактор культивування ЛР, який впливає на калусоутворення. Основою усіх живильних середовищ є мінеральні солі, необхідні рослині: макроелементи – N,P,K,Ca,Mg; мікроелементи – B,Mn,Zn,Cu,Co,Mo,I,Fe. Важливим фактором, що регулює диференціацію і морфогенез ізольованих тканин, є наявність в ПС регуляторів росту – ауксинів, цитокінінів, гіберілінів.

В технологічній схемі для процесу культивування БАР передбачено використання апарата, який має корпус у вигляді циліндричної обичайки, всередині

якої на валу обертається касета в порожнині якої знаходяться носії іммобілізованих клітин, наприклад нерегулярні насадки – кільця Рашига.

Насадки засипаються між стінками касети так, що забезпечується нерухомість носіїв моношару клітин і це унеможливорює механічне ушкодження біомаси. При культивуванні під час обертання касети поживне середовище повільно перетікає через поверхню носіїв іммобілізованих клітин, що знаходяться в касеті. Аерація іммобілізованого клітинного шару забезпечується за рахунок дифузії кисню повітря з газової фази в рідину та під час занурення шару насадки у культуральній рідині (КР).

Частота занурення у КР і знаходження частини касети у газовій фазі регулюється швидкістю обертання валу і є регульованим параметром культивування, що визначає оптимальний рівень гідродинамічного стану КР.

Дане технічне рішення ферментеру виключає прямий контакт клітин з бульбашками газової фази і виключає контакт клітин моношару з потоками від перемішувача і аераційною газовою фазою, що дозволяє сформувати моношар клітин з концентрацією клітин з 10^6 до 10^8 .

Блок - схема виробництва:

- 1- вирощування посівного матеріалу (ПМ);
- 2- приготування ПС;
- 3- суспензійне культивування *G. imbricatus*;
- 4- фільтрування КР;
- 5- екстрагування висушеної біомаси;
- 6- розлив та фасування екстракту.

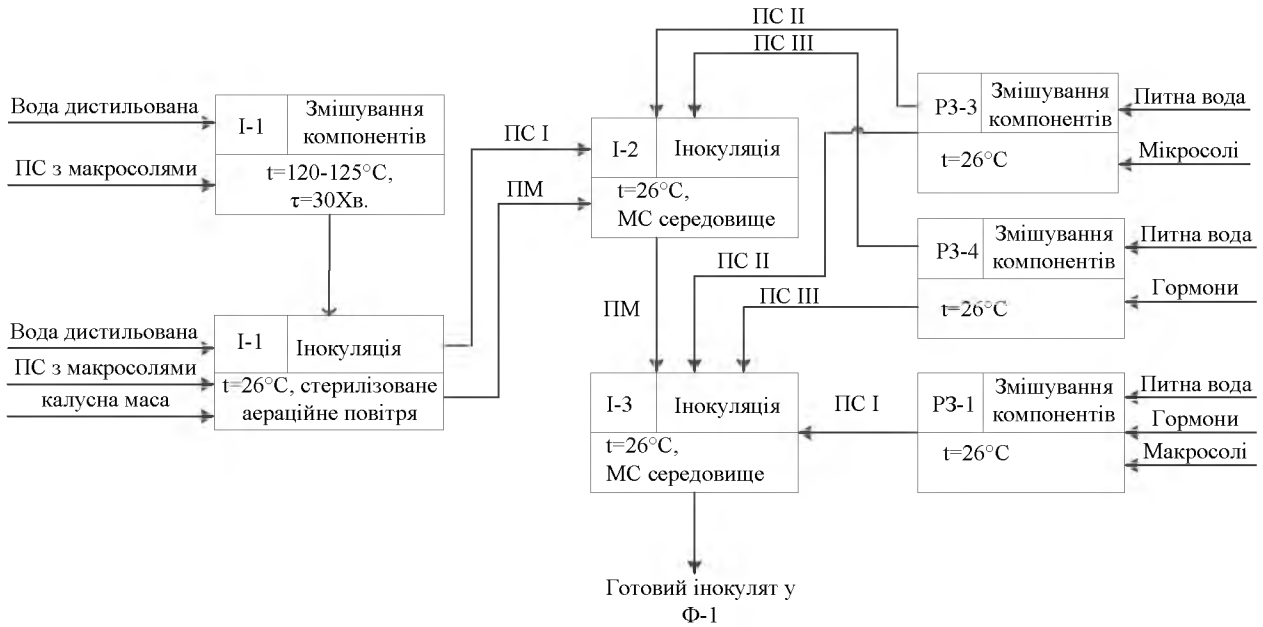


Рис. 6.5. Етап виготовлення ПМ і ПС I, II, III для робочої ферментації.

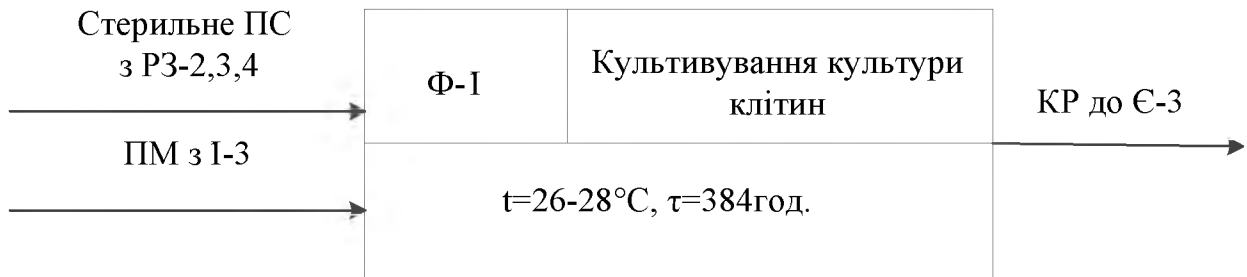


Рис. 6.6. Етап культивування.

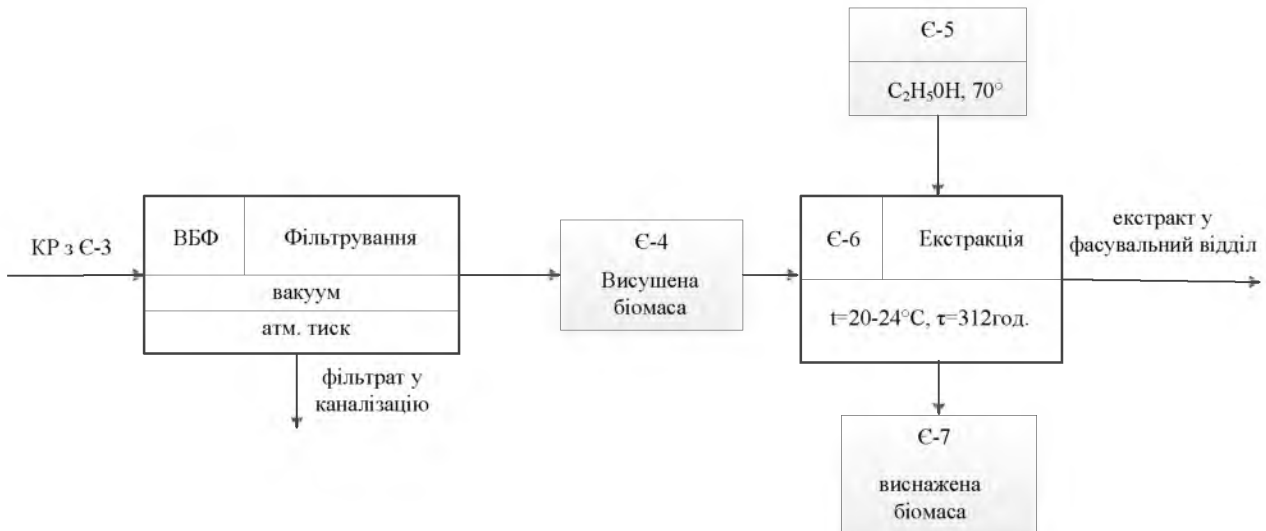


Рис. 6.7. Етап фільтрування КР та одержання екстракту.

6.5. Опис технологічного процесу виробництва біомаси *G.imbricatus*

Приготування посівного матеріалу

Калусну масу *G. imbricatus* вирощували і зберігали в лабораторних умовах. Посівний матеріал вирощували у три стадії.

В ферментер 9 завантажували дистильовану воду, розчин макроелементів. В оболонку апарата подавали глуху пару. Апарат герметизували. Суміш, перемішуючи, нагрівали до 120-125⁰С. З метою стерилізації витримували її 30 хв. Конденсат водяної пари, який є перегрітою водою, спрямовували у лінію спецканалізації через холодильник для зниження тиску конденсату до атмосферного і зниження його температури до 30...50⁰С. У простерилізований апарат, що містить стерильний розчин макроелементів, додавали стерильні розчини мікросолей і вітамінів та гормонів. В оболонку подавали охолоджувальну (зворотну) воду, за рахунок чого стерильне поживне середовище охолоджується до температури культивування 26⁰С. Після досягнення відповідної температури апарат з'єднували з атмосферою через індивідуальний фільтр. Готовий інокулят стерильним повітрям перетискали з 9 у середній інокулятор, в якому вже знаходиться стерильне поживне середовище (ПС) ПС I, ПС II та ПС III далі проводили аналогічний процес культивування.

Для 22 ПС I готували в окремому реакторі-змішувачі 16. Підготовлене нестерильне ПС I готове нестерильне ПС насосом 2 постійним потоком подавали у нагрівач 18, в який одночасно подавали гостру пару. Гаряче ПС спрямовували в змійовик – витримувач 19, в якому власне відбувається стерилізація ПС. Далі гаряче стерильне середовище проходило крізь холодильник типу “труба в трубі” 20, охолоджується до температури культивування 26⁰С і надходило у попередньо простерилізований великий інокулятор 22. Додавали ПС II та ПС III, апарат засівали посівним матеріалом з 11.

Приготування поживних ПС II і ПС III

Приготування ПС II і ПС III для інокуляції та культивування проводили паралельно з вирощуванням посівного матеріалу в інокуляторах.

Розчин мікроелементів повітряно-мембранним насосом 17 подавали в 32 через блок мікрофільтрування. Стерильне ПС II насосом 3 подавали у відділення чистої культури і робочий ферментер 9.

Етап культивування

Для культивування біомаси поживне середовище готували в реакторі-змішувачі 5. Стерилізацію проводили перепускаючи через лінію УНС-20 у простерилізований ферментер за схемою: 5, тоді насосом 6 подавали в рекуператор, далі у нагрівач 18, витримувачі 19, рекуператор і, холодильник, у інакулятор 9. Одночасно в нагрівач 18 подавали гостру пару під тиском 3 атм з температурою 132,9°C, а в холодильник – охолоджувальну воду. На виході середовище повинно становити 26...28°C.

Після завантаження у ферментер 9 ПС і посівного матеріалу, подавали стерильне аераційне повітря. Проводять культивування, підтримуючи температуру 26...28°C подачею охолоджувальної води або пари в оболонку ферментера 9.

Стерильне аераційне повітря одержували в глибинному фільтрі 23. На виході з фільтра потік повітря розгалужується і спрямовується крізь індивідуальні фільтри в 9 і 22. По закінченні вирощування біомаси культуральну рідину (КР) за 9 годин перекачували насосом 27 у буферну ємність 28. Конденсат водяної пари спрямовували у лінію зворотної каналізації через конденсаційний горщик. Використовували водяний фільтр де відбувається очистка газових викидів після аерації, який періодично наповнювали водою і з якого періодично забруднену воду дренали в каналізацію.

Фільтрування КР

З буферної ємності 28 насосом 29 КР спрямовували на фільтрування у барабанний вакуум-фільтр закритого типу. Одержана біомаса накопичувалася в бункері 31, а з нього поступала в сушильну шафу 49, а звідти в перколятор 37.

Одержання екстракту

Після завантаження біомаси в перколятор 37 з ємності 39 подавали розбавлений етанол. Перемішування при цьому здійснювали насосом 40, який працював в режимі рециркуляції. Екстрагент, що просочується крізь шар біомаси в

43, періодично повертали з 43 за допомогою насосу 45. Екстракт зливали в ємність 43. Залишок в перколяторі промивали чистою водою. Відкривали днище перколятора, промитий залишок вивантажували у відкриту ємність 44, встановлену на пересувний транспортний засіб за допомогою якого виснажену і промиту біомасу транспортували на звалище.

6.6. Висновки до розділу

1. Базуючись на даних, отриманих в лабораторних умовах, встановлено, що для промислового культивування доцільно використовувати глибинний, аеробний, напівбезперервний метод вирощування біомаси, оскільки він дозволяє одержати екстракт з культури клітин рослин з максимальним вмістом комплексу БАР.

2. Запропонований спосіб аерації шляхом дифузії кисню повітря з газової фази в рідину дозволяє зменшити механічне пошкодження біомаси.

3. Була розроблена промислова технологія одержання комплексу БАР, враховуючи основні фактори впливу на повноту та швидкість екстрагування.

4. Для вилучення максимальної кількості БАР обраний метод перколяції. Оптимізовано умови екстрагування (метод безперервної екстракції в апараті Сокслета, екстрагент 70% спирт етиловий, співвідношення сировина-екстрагент 1:10, час одного екстрагування – бгод, вихід екстракту надземної частини *G. imbricatus* становив 19-35%).

5. Встановлено ефективність використання інтегрального стехіометричного рівняння культивування для складання матеріального балансу та розрахунку критеріїв масштабування процесу вирощування *G. imbricatus* та отримання БАР з культуральної рідини.

6. На основі одержаних результатів розраховано теоретичну потребу культури в кисні

7. Розроблено технологічну схему одержання екстракту *G. imbricatus*. Дана технологічна схема виробництва – контрольована і автоматизована, що забезпечує вихід якісного продукту. Отриманий екстракт може служити цінною сировиною для виготовлення препаратів косметичної та фармацевтичної промисловості.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Базуючись на огляді та аналізі науково-технічної і патентної літератури, вивчення досвіду промислового виробництва, аналітичних, експериментальних та розрахункових досліджень розроблено процес одержання біологічно активних речовин при культивуванні *G.imbricatus*.
2. Проведені теоретичні та експериментальні дослідження процесу екстрагування БАР з дикоростучого виду *G.imbricatus* та його калусної біомаси. Встановлено, що процес масопередачі протікає за внутрішньо дифузійним механізмом.
3. Експериментально досліджено кінетику екстрагування біологічно активних речовин при *G.imbricatus* різними екстрагентами. Оптимізовано процес екстракції БАР з одержаної в результаті глибинного культивування біомаси *G. imbricatus*. Визначений оптимальний екстрагент – 70% етиловий спирт при співвідношенні сировина/екстрагент = 1:10. При цьому вилучається максимальна кількість екстрактивних речовин.
4. Методи інтенсифікації процесу екстрагування цільових компонентів із сировини *G. imbricatus* полягають у попередньому подрібненні та підвищенні температури.
5. Вперше встановлений якісний та кількісний склад екстрактів дикоростучого виду *G.imbricatus* та його культивованої біомаси. В одержаних екстрактах ідентифіковані такі групи БАР: жирні кислоти, вуглеводні, спирти, терпени, флавоноїди, полісахариди, дубильні речовини, вітамін С.
6. Підібрані математичні моделі на основі спрощених фізичних моделей з біомаси калусної культури *G.imbricatus*, які описують процес екстракційного вилучення БАР і дають можливість прогнозувати процес екстрагування в умовах виробництва. За цими моделями визначено основні кінетичні константи процесу, необхідні для розрахунку процесу екстрагування.
7. У біотехнології відомі способи одержання біомаси калусних тканин деяких лікарських рослин - продуцентів БАР: ломиносу виноградолистого (*Clematis*

vitalba), женьшеню (*Panax zingiberensis*), діоскопеї (*Dioscorea*), княжика сибірського (*Clematis alpina*), гінкго дволопатевого (*Ginkgo biloba*), плюща (*Hedera helix*), полісцеас кущовий (*Polyscias fruticosa*), та ін. Проте, для кожного виду рослин біотехнологія отримання калусної маси є унікальною. Розроблена технологія культивування в умовах *in vitro* калусної культури дикоростучого виду *Gladiolus imbricatus* допоможе у вирішенні таких важливих питань, як збереження генофонду рослин, поповнення сировинної бази для фармацевтичної, харчової, косметологічної та інших галузей промисловості, оскільки відомо, що ця рослина занесена до Червоної книги України, а її біомаса є джерелом цінних БАР. Для цього вперше введено в культуру *in vitro* *G.imbricatus* шляхом підбору умов стерилізації, культивування та оптимізації складу поживного середовища.

8. Визначено оптимальні умови калусогенезу, а саме модифіковане агаризоване живильне середовище Мурасиге-Скуга з фітогормонами: НОК (0,5 мг/л), ІОК (3,0 мг/л), кінетин (0,5 мг/л); освітлення 2000 лк ; температура 23-25 °С; час культивування – 3 тижні. При цьому показана чітка залежність індукції калусогенезу від кількості фітогормонів та типу експланту.
9. На основі експериментальних даних встановлено, що для промислового культивування доцільно використовувати глибинний, аеробний, напівбезперервний процес вирощування біомаси, оскільки він дозволяє одержати екстракт з культури клітин рослин з максимальним вмістом комплексу БАР.
10. Розроблена методика розрахунку процесу культивування та розрахунку критеріїв масштабування процесу накопичення біомаси *G.imbricatus*.
11. Розроблена технологічна схема одержання БАР з біомаси калусної культури *G. imbricatus*, що забезпечує вихід якісного продукту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. А.П. Викторов. Фитопрепараты: рациональный подход к медицинскому применению / Фітотерапія. Часопис. - 2011. - №3. - С. 3 – 12.
2. Романюк Б. П. Лікарські рослини та їх сировина, які містять біологічно активні речовини / Б.П. Романюк, В.М. Фролов, Я.А. Соцька // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. - 201. - С. 46-64.
3. Briskin D.P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health./ Briskin D.P. // Plant Physiol. - 2000. - №124. - pp. 507-514.
4. Шершова С.В. Вивчення гормоноподібної активності екстракту ехінацеї блідої / Біологічний вісник МДПУ. - 2013. - №2. - С. 237-247.
5. Малий В.В. Визначення кількісного вмісту ряду груп БАР в субстанціях клену ясенolistого / В.В. Малий, Ю.А. Федченкова, О.П. Хворост // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. - 2010 - №1 : Т. 23. - С. 64-65.
6. Potricus I. Golden rice and beyond / I.Potricus. - Plant Physiology, 2001.- Vol. 125, № 3. - P.1157–1161.
7. Ziv M., A.H. Halevy and R. Shilo. Organs and plant let regeneration of gladiolus through tissue culture/ Annals of Botany. - 1970. - №34(3). - pp. 671-676.
8. Яворська В.К. Регулятори росту на основі природної сировини та їх застосування в рослинництві / В.К. Яворська, І.В. Драговоз, Л.О. Крючкова. – К.: Логос, 2006. – 176 с.
9. Вишнеvsька Л.І. Валідаційні характеристики методики кількісного визначення флавоноїдів методом УВ-спектрофотометрії у настойці складній "Бронхофіт" / Вишнеvsька Л.І., Євтефєєва О.А., Гарна С.В. (та ін.) // Український медичний альманах. - 2010. - №1 : Т. 13. - С. 33-35.

10. Дейнеко Е.В. Генетически модифицированные растения – продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2012. - №2 (18). - С. 41–51.
11. Державна фармакопея України. Доповнення 2. - 1-е вид. - Харків : Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр", 2008.- 617с.
12. Krvavych A.S. Phytochemical research of plant extracts and use *in vitro* culture in order to preserve rare wild species *Gladiolus imbricatus* / Krvavych A.S., Konechna R.T., Petrina R.O., Kurka M.S., Zayarnuk N.L., Gulko R.M., Stadnytska N.E., Novikov V.P. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – V.5 (1). – P. 240-246. ДГСТ 4565-79 «Лист сумаха» / В зб.: «Лекарственное растительное сырье» / Под.ред. В.С.Бабкиной. – М.: Изд-во стандартов, 1960. –С.42-49.
13. Матвеева Н.А. Салат-латук (*Lactuca sativa* L.) як об'єкт біотехнологічних досліджень та продуцент рекомбінантних протеїнів / Н.А.Матвеева // Біотехнологія. - 2010. - №1 : Т. 3. - С. 9-17.
14. Пороннік О. О., Шаблій В. А., Кунах В. А. Одержання культури тканин синяка подорожникового (*Echium plantagineum* L.) – продуцента шиконінових пігментів.
15. Матвеева Н.А. Синтез інуліну в «бородатих коренях» цикорію, трансформованого *Agrobacterium rhizogenes* / Н.А. Матвеева, О.М. Кіщенко, А.М. Шаховський, М.В. Кучук // Біотехнологія. - 2011. - 3 : Т. 4. - сс. 56-63.
16. Матвеева Н.А. Створення та вивчення культури трансгенних коренів *Althaea officinalis* з геном інтерферону $\alpha 2\text{В}$ людини / Н.А.Матвеева Ю. Й. Кудрявець О.М. О. А. Ліхова, О. Ю. Кваско, А.М. Шаховський // Biotechnologia Acta. - 2013. - №2 : Т. 6. - С. 74-79.

17. Кириченко О. В., Волкогон М. В. Вплив аглютиніну зародків пшениці при передпосівній обробці насіння на рівень цитокінінів і ауксинів у листі рослин // Доповіді НАНУ. – 2010. – №6. – С. 144-151.
18. Гарна С.В. Оптимізація технології екстракції ліпофільних комплексів з лікарської рослинної сировини. 1. Вибір екстрагенту / С.В. Гарна, П.П. Ветров, О.І. Русинов (та ін.) // Запорожский медицинский журнал. - 2010. - 3 : Т. 12. - сс. 92-94.
19. Саламаха В.В. Розробка методів виділення рутину і кверцетину із квіток софори японської / В.В.Саламаха, О.О. Протункевич, К.О. Присяжнюк // Праці Одеського політехнічного університету. - 2012. - №1(38). - С. 286-290.
20. Сметаніна К.І. Рослинні ліки. Проблеми розробки лікарських засобів рослинного походження / Фарм. Часопис. - 2011. - №2. - С. 95-98.
21. Сидоров Ю.І. Розрахункові моделі виробництва гексоз з деревини кислотним і ензиматичним способами та їх порівняння / Ю. І. Сидоров, Т. О. Дрога, Р. Й. Влязло // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». - 2005. - 536 с.
22. Я.В. Степневська Л.П. Циганок. Розробка методики визначення суми флавоноїдів і вивчення умов їх виділення з рослинної сировини *Humulus lupulus* // Вопросы химии и химической технологии. - 2011. - №1. - С. 90-93.
23. Wu J., Zhong J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects // Journal of Biotechnology. – 1999. – V.68. – P. 89–99.
24. Костюк Р.В. Розвиток інноваційної діяльності біотехнологічних підприємств у сучасних умовах // Актуальні проблеми економіки. – 2009. – №8 (98). – С. 79-84.

25. George E.F. Plant propagation by tissue culture // The Technology. — 2000.— P.302-335.
26. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. — Киев : Наук.думка, 1992.—228с.
27. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіоло-біохімічні основи.—К.: Логос, 2005.—730с.
28. Кунах В.А., Можилевская Л.П., Губарь С.И. Особенности получения и изменчивость суспензионных культур и клеточных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina in vitro* // Биотехнология.—2001.—№4.-с.9-21.
29. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко В.О. Основы біотехнології рослин. — К., 2000. — 247с.
30. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.— К.: Наук. думка, 1990.—280с.
31. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основы проектування: Навчальний посібник. — Львів : «Інтелект-Захід», 2008. — 736с.
32. Ziv, M. 1990. The effect of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured *Gladiolus* plants. Acta Hort. (ISHS) 280:207-214pp.
33. Пат. 2101934 Рос. Фед. МПК А 01 Н 4/00, С 12 N 5/00. Способ выращивания биомассы женьшеня / Кольцов Ю.В., Королев В.Н., Кусакин С.А., Золотарев В.Г.; заявл. 21.11.1995; опубл. 20.01.1998.
34. Rakosy-Tican, E., Bors, B., Szatmari A.M. In vitro culture and medium-term conservation of the rare wild species *Gladiolus imbricatus* // African J. Biotech. — 2012. — №11. — P. 14703–14712.

35. Мельничук М.Д. Основи біотехнології рослин / Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко В.О. - К., 2000. - 247с.
36. Аксельруд Г. А., Альтшулер М. А. Введение в капиллярно-химическую технологию. – М.: Химия, 1983. – 264 с.
37. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. — СПб.: Издво СПбГУ, 2003. — 227 с.
38. Белобородов В. В. Основные процессы производства растительных масел. – М.: Пищевая пром-сть, 1966. – 479 с.
39. Доброхотов Г. Н. Гидрометаллургические процессы и аппараты. – Л.: ЛГИ, 1980. – 103 с.
40. Антонюк В.О., Дубицкий О.Л. Вивчення вуглеводної специфічності пектинів рослин роду *Artemisia* // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74, № 4. - С. 114.
41. Романков П. Г., Фролов В. Ф. Массообменные процессы химической технологии. – Л.: Химия, 1990. – 384 с.
42. Лысянский В. М. Процесс экстракции сахара из свеклы. Теория и расчет. – М.: Пищевая пром-сть, 1987. – 186 с.
43. Семенишин Є. М., Троцький В. І., Федорчук–Мороз В. І. Математична модель кінетики екстрагування олії з насіння амаранту // Вісн. нац. ун-ту “Львів. політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2005. – № 529. – С. 199–203.
44. Каухова Н.Е. Особенности экстрагирования БАВ двухфазной системой экстрагентов при комплексной переработке лекарственного растительного сырья / Н.Е. Каухова // Растительные ресурсы. – 2006. – Вып. 1. – С. 82-90.
45. Wongkittipong R. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants— Experimental study, kinetic reaction and model / R. Wongkittipong, L. Prat, S. Damronglerd, C. Gourdon // Sep. Purif. Technol. – 2004. – Vol. 40. – P. 147–154.

46. Application of a simplified method based on regular regime approach to determine the effective moisture diffusivity of mixture of low molecular weight sugars and maltodextrin during desorption / B. Adhikari, H. Howes, B. R. Bhandari, S. Yamamoto, V. Truong // *J. Food Eng.* – 2002. – Vol. 54. – P. 157–165.
47. Adamou H. H.-O. Comparison of Kinetic Models for the Aqueous Solid-Liquid Extraction of Tilia Sapwood in a Continuous Stirred Tank Reactor / H. H.-O. Adamou, H. Fauduet, C. Porte, Y.-S. Ho // *Chem. Eng. Comm.* – 2007. – Vol. 194. – P. 537–552.
48. ESCOP Monographs. The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. — 2nd ed. — 2003.
49. Вітенько Т.М. Дифузійні константи процесу екстрагування валеріани при попередній кавітаційній обробці екстрагенту / Т.М. Вітенько // *Вопросы химии и химической технологии.* – Днепропетровск, 2007. – №3. – С. 147–150.
50. Вітенько Т.М. Інтенсифікація масообміну в системі капілярно-пористе тіло-рідина / Т.М. Вітенько // *Вопросы химии и химической технологии.* – Днепропетровск, 2006. – №3. – С. 153–156
51. Т.М. Антонюк, О.А. Оканенко, Н.Ю. Таран. Динаміка накопичення стероїдних глікозидів у листках представників роду *Rhododendron L.* протягом онтогенезу / *Физиология и биохимия культ. растений.* 2010. – Т. 42. – № 3 – С. 240 – 245.
52. Дячок В.В. Математична модель процесу екстрагування із рослинної сировини / В.В. Дячок // *Хімічна промисловість України.* – 2001. – №4. – С. 52–55.
53. Вітенько Т.М. Исследование механизма активирующего действия гидродинамической кавитации на воду / Т.М. Вітенько, Я.М. Гумницкий // *Химия и технология воды.* – Киев, 2007. – №5. – С. 422–432

54. Патент України № 51429 А Україна, 7В01J8/18 Масообмінний апарат для системи тверда фаза-рідина. Венгер Л.О., Гумницький Я.М., Юрим М.Ф.- №2002042539, заявл. 01.04.02, опубл. 15.11.02.- Бюл. №11
55. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites / John Wallace // Proceedings of the Nutrition Society (2004), 63, pp. 621–629.
56. Демьяненко В.Г. Исследование процесса экстракции корней барбариса и плодов шиповника сжиженными газами / В.Г. Демьяненко, Самер Жехжах, Д.В. Демьяненко // Ліки України. – 2005. – №9. – С. 36–40.
57. Biological activities and distribution of plant saponins. S.G. Sparg, M.E. Light, J. van Staden / Journal of Ethnopharmacology. – V. 94, Issues 2–3. – 2004. – pp. 219–243.
58. Chaiyasit K. Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in capsicum frutescens on decreasing plasma glucose level / K. Chaiyasit, W. Khovidhunkit, S. Wittayalertranya // J. Med. Assoc. Thai. — 2009. — Vol. 92, № 1. — P. 108-112.
59. Касьянов Г.И. До- и сверхкритическая экстракция: достоинства и недостатки / Г.И. Касьянов, О.Н. Стасьева, Н.Н. Латин // Пищ. пром-сть. – 2005. – №1. – С. 36–38.
60. Baser K., Buchbauer G. Handbook of Essential Oils - science, technology and applications. –2010. – CRC Press. – 994p.
61. Особенности химического состава видов рода *Salvia L.* / В. С. Доля, С. Д. Тржецинский, В. И. Мозуль, Н. И. Третьяк // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики (2013), №3 (13). – С. 83-85.
62. Бурдо О.Г., Ряшко Г.М. Экстрагирование в системе «кофе-вода». Одесса, 2007.-176 с.
63. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal. Polish J. of Environ. Stud, 2006; 15(4): 523–530.

64. Arora A., Byrem T., Nair M., Strasburg G. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000; 373: 102–109.
65. Вплив іонів важких металів і регулятора росту трептолеми на загальний вміст фенольних сполук у рослинах ріпаку та соняшнику / В. Гащишин, О. Грохольська, О. Пацула, О. Терек // *Біологічні Студії / Studia Biologica*. - 2012. - Том 6-№1. - С. 109–116.
66. Ярних, Т. Г. Вибір оптимальних технологічних параметрів отримання густого екстракту з кори дуба / Т. Г. Ярних, Н. В. Хохленкова, В. М. Чушенко // *Вісник фармації*. - 2007. - № 3. - С. 27-29.
67. А.І. Денис, Т.А. Грошовий. Обґрунтування вибору допоміжних речовин для створення таблеток на основі екстракту листя тополі китайської / *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*(2012), №1 (8). – С. 58-62.
68. Розробка антисептичного кровоспинного пластиру з густим екстрактом кори дуба / Н.В.Хохленкова, Т.Г.Ярних, О.М.Купріянова // *ВІСНИК ФАРМАЦІЇ* 2(70)2012. – С. 14-16.
69. Кожух І.О. Фармакогностичне вивчення рослин роду бадан : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук : спец. 15.00.02 «фармацевтична хімія та фармакогнозія» / І.О. Кожух. – Харків, 2002. - 20с.
70. Зав'ялов В.Л., Малезик І.Ф. Дослідження зовнішнього масообміну в умовах віброекстрагування із рослинної сировини. // *Наук. пр. Одес. нац. акад. харчових технологій*. – 2012. – Вип. 41. – Т. 1. – С. 95–98.
71. Зав'ялов В.Л., Лобок О.П. Місюра та інш. Математичне моделювання структури потоків в екстракторах безперервної дії колонного типу з вібруючою системою розділення фаз. // *Наук. пр. Одес. нац. акад. харчових технологій*. – 2013. – Вип. 43. – Т. 2. – С. 26–29.

72. Математичне моделювання масообміну при віброекстрагуванні із рослинної сировини в умовах комбінованої дії механічних коливань різної частоти / В. Л. Зав'ялов, В. С. Деканський, О. П. Лобок, Т. Г. Мисюра // Наукові праці НУХТ. – 2015. – Т. 21, № 1. – С. 161-168.
73. Вашека О. М. Перспектива використання рослинних харчових добавок для виробництва молочних продуктів функціонального призначення / О. М. Вашека, Т. О. Рашевська // Продукты и ингредиенты. – 2005. – № 11 (20). – С. 61–62.
74. Бреусова С.В. Розробка складу та технології сиропу на основі фенольного комплексу із суцвіть липи серцелистої : автореф. дис.на здобуття наук. ступеня канд. фармацевт. наук : спец. 15.00.05 «технологія ліків та організація фармацевтичної справи»/ С.В. Бреусова. - Х., 2010. - 22 с.
75. Дем'яненко Д. В. Вивчення технологічних властивостей суцвіть липи серцелистої / Д. В. Дем'яненко, С. В. Бреусова, В. Г. Дем'яненко // Вісник фармації. – 2009. – № 3. – С. 41-45.
76. Сидоров Ю. І. Розрахункові моделі виробництва гексоз з деревини кислотним і ензиматичним способами та їх порівняння / Ю. І. Сидоров, Т. О. Дрога, Р. Й. Влязло // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». – 2005. – № 536 : Хімія, технологія речовин та їх застосування. – С. 87-94.
77. Ковальова Т.М. Розробка технології та дослідження противиразкового засобу – густого екстракту листя горіху грецького : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фармацевт. наук : спец. 15.00.01 «Технологія ліків та організація фармацевтичної справи» / Т.М. Ковальова. – Харків, 2002. -22с.
78. Вишневська, М. С. Розробка складу та технології крапель «Урохол» для застосування в урології : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук : 15.00.01 / М. С. Вишневська. - Х., 2012. - 30 с.

79. Кошовий О. М. Оптимізація процесу екстракції біологічно активних речовин листя евкаліпту: кратність екстракції / О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, А. М. Ковальова, А. М. Комісаренко, О. В. Винник, Ю. Г. Шолом // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. - 2010. - Вип. 23, № 1. - С. 47-49.
80. О. В. Дишкантюк, О. М. Москвічова. Використання гліцерину для вдосконалення процесу екстракції антоціанів / Харчова наука і технологія. - 1(26). – 2014. – С. 92-95.
81. Головач І.Р. Аналіз інформативних параметрів і розробка автоматичної системи керування процесом екстракції : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук : спец. 05.13.07 «Автоматизація технологічних процесів» / І.Р. Головач. – Львів, 2004. - 20с.
82. Быстрый способ ультразвуковой экстракции гинсенозидов из растительного сырья и продуктов на основе женьшеня для ВЭЖХ-МС/МС анализа / А.Н. Ставрианиди, И.А. Родин, А.В. Браун, О.А. Шпигун // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 4. – С. 459-464.
83. Особливості побудови систем керування ультразвуковими резонансними приводами / Луговський О. Ф., Фесіч В. П., Мовчанюк А. В. // Вібрації в техніці та технологіях. - № 4 (56).- 2009. – С. 39-44.
84. Слива Ю.В. Розроблення способу одержання дифузійного соку з використанням електроіскрових розрядів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук : спец. 05.18.05 «Технологія цукристих речовин та продуктів бродіння» / Ю.В. Слива. - Київ, 2007. - 21с.
85. Підвищення якості дифузійного соку завдяки застосуванню електротехнологій / [М.П. Купчик, Н.О. Шейко, О.І. Сидорченко, І.М. Рудь] // Наукові праці Національного університету харчових технологій. - 2005. - № 16. - онлайн ресурс.

86. Дем'яненко Д. В. Вивчення процесу екстракції коренів *Berberis vulgaris* зрідженими газами / Д. В. Дем'яненко // Фітотерапія. - 2011. - № 3. - С. 62-66.
87. Зилфикаров И.Н. Сравнительное фитохимическое исследование эфирного масла и сверхкритического флюидного CO₂ экстракта из листьев эвкалипта прутовидного / И.Н.Зилфикаров, А.М.Алиев // Сверхкритические Флюиды: Теория и практика. – 2008. – Т.3, №2. – С.43–51.
88. Коляновська Л.М., Бандура В.М. Аналіз сучасних методів та факторів, що впливають на процес екстрагування / Збірник наук. Праць ВНАУ. – №2 (85). – 2014. – С. 130-135.
89. IPGRI, <http://www.ipgri.cgiar.org>.
90. Біоресурси – потенціально сировина для промислового органічного синтезу / В.П. Кухар// Катализ и нефтехимия. — 2007. — № 15. — С. 1-15.
91. Расторгуев С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений: монография/ С.Л. Расторгуев. – Мичуринск: Изд-во Мичуринского ГАУ, 2009. – 170 с.
92. Концентрирование селена каллусными культурами *Astragalus dasianthus (pall.)* / Юркова И.Н., Тайкова В.П., Бугара И.А., Теплицкая Л.М. // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. - Том 23 (62). 2010. № 4. С. 239-244.
93. Співак, М. Я. Імунобіотехнологія: оптимізація розвитку / М. Я. Співак, О. В. Карпов // Вісник НАН України. – 2004. - №1. – С. 46-57.
94. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants // Eds. Walter K.S. & H.G.Gilett. Gland (Switzerland) and Cambridge (UK), 1998. 862 p.
95. Европейский Красный список животных и растений, находящихся под угрозой исчезновения во всемирном масштабе. Нью-Йорк: ООН, 1992. 167 с.

96. Конвенція про охорону дикої флори і фауни та природних середовищ існування в Європі. К. 1998. 76 с.
97. Конвенція про міжнародну торгівлю видами дикої фауни і флори, що перебувають під загрозою зникнення // Збірник законодавчих актів України про охорону навко- лишнього природного середовища. Т.4. Чернівці: Зелена Буковина, 1999. С. 293 – 312.
98. A revised infrageneric classification for *Gagea* Salisb. (Tulipeae; Liliaceae): insights from DNA sequence and morphological data / M Zarrei, P Wilkin, MJ Ingrouille, MW Chase / *Phytotaxa* 15 (1), - P. 44-56.
99. Инюткина А. Г., Егорова Н. А. Влияние некоторых факторов на каллусогенез *Artemisia dracunculus* в культуре *in vitro* / Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2009. Вып. 20. С. 94–99.
100. Бугара І.А. Індукований морфогенез і клональне мікророзмноження перспективних сортів м'яти : автореф. дис. на здобуття наук.ступеня канд. біол. Наук : спец. 03.00.20 «біотехнологія» / І.А. Бугара. - Ялта: Нікітський ботан. сад, 2006. - 16 с.
101. Phirke S.S. *In vitro* callus induction from leaf explants of *Lawsonia inermis* L. used as herbal dye / S.S. Phirke, M. Saha, N. Chandra // *Asian J. Exp. Biol. Sci. Spl.* – 2010. – Vol. 1, №1. – P. 118–120.
102. Adediwura and Kio. Antidiabetic activity of *Gladiolus psittascinus* in alloxan induced diabetic rats / *Afr. J. Trad. CAM* (2008) 5 (2): 154 – 157.
103. Олійник Л.Б. Розробка технології хлорофільно-каротиноїдних барвників для консервованих продуктів і напоїв : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техню наук : спец. 05.18.13 «Технологія консервованих продуктів» / Л.Б. Олійник. - Одеса, 2000. - 21с.

104. Грибова Н.Ю. Дослідження впливу фізико-хімічних умов на екстрагування фенольних сполук рослин та антирадикальних властивостей отриманих екстрактів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. хім. наук. 02.00.04 – фізична хімія «фізична хімія» / Грибова Н.Ю. – Донецьк, 2009. - 21 с.
105. Аналіз процесів концентрування та очищення пектинових екстрактів / Г.В. Дейниченко, З.О. Мазняк, В.В. Гузенко // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі. - В.1. – № 21. – 2013. – С.135-141.
106. Каталог раритетних рослин ботанічних садів і дендропарків України. Довідковий посібник / За ред. А. П. Лебеди. – К.: Академперіодика, 2011. – 184 с.
107. Hänel, S.; Müller, F.: Distribution, phytosociology and ecology of *Gladiolus imbricatus*L. in Saxony. – *Hercynia N. F.* 39 (2006): 69 – 87.
108. Mosyakin S. L. Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural checklist / Editor S. L. Mosyakin. – К: –1999. – 345 p.
109. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 2. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. - 11-е изд. - М.: Медицина, 1989. - 400с.
110. Т.М. Литвиненко. Сучасний стан асортименту супозиторних основ і фактори їх вибору / Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки і практики. – 2014. – №1(14). – С. 35-38.
111. A consumer's dictionary of cosmetic ingredients / Ryth Winter. – 7th ed. – New York, 2009– P.565.
112. Аксельруд Г. А., Лысянский В. М. Экстрагирование. Система твердое тело – жидкость. – Л.: Химия, 1974. – 256 с.
113. Аксельруд Г. А. Массообмен в системе твердое тело – жидкость. – Л.: Изд-во Госун-та, 1970. – 187 с.

114. Semenishyn E. M., Trotsky V. I., Bodnar P. N. The problem of the desired components extraction from vegetable raw and minerals // ISECOS-92conferens papers Voroneg Technological Institute. – 1992. – Vol.2.– P. 83–84.
115. Семенишин Е. М. Теоретические основы экстрагирования твердой фазы из пористых структур: Дис. ... д-ра техн. наук / Львов, 1983. – 367 с.
116. Semenishyn E., Huglich J., Trocki W., Broda O. Model matematyczna procesu ekstrakcji w aparatach odzialanyuciaglym // Materialy XV OGOLNOPOLSKA konferencja naukova inzynerii chemicznej i procesowej. – Gdansk, 1995. – Ch. III. – S. 71–75.
117. Семенишин Є. М., Троцький В. І., Федорчук–Мороз В. І. Математична модель протитечійного екстрагування цільових компонентів з бурякового жому // Вісн. нац. ун-ту “Львів. політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2002. – № 461. – С. 211–214.
118. Семенишин Є. М., Троцький В. І., Петрушка І.М., Федорчук–Мороз В. І. Кінетика вилучення пектинів і полісахаридів з бурякового жому // Вісн. нац. ун-ту “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2002. – № 461. – С.238–242.
119. Семенишин Є. М., Троцький В. І., Федорчук–Мороз В. І. Кінетика вилучення цільових компонентів з солодових ростків // Наук. вісн.: Зб. наук.-техн. пр. — Львів. УкрДЛТУ. – 2003. – Вип.13. 1. – С. 143–146.
120. Семенишин Є. М., Ятчишин Й. Й., Троцький В. І., Федорчук–Мороз В. І., Ковальська Ю. В. Апробація математичної моделі екстрагування олії в умовах безперервного процесу // Наук. пр. Одес. нац. акад. харчових технологій. – 2007. – Вип. 30. – Т. 1. – С. 23–27.
121. Семенишин Є. М., Троцький В. І., Федорчук–Мороз В. І. Апробація математичних моделей для екстрагування олії з насіння амаранту // Вісн. нац. ун-ту “Львів. політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2006. – № 553. – С. 214–217.
122. Семенишин Є. М., Троцький В. І., Федорчук–Мороз В. І. Математична модель кінетики екстрагування олії з насіння амаранту // Вісн. нац. ун-ту

- “Львів. політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2005. – № 529. – С. 199–203.
123. Стадник Р.В., Семенишин Є.М., Федорчук-Мороз В.І., Троцький В.І., Ятчишин Ю.Й. Кінетика екстрагування олії з насіння амаранту хвостатого (*Amaranthuscaudatus*) та амаранту гібриду (*Amaranthushibrydus*) //Хімія, технологія речовин та їх застосування: [зб. наук. пр.] /відп. ред. Й. Й. Ятчишин.-Л.:Вид-во Нац. ун-ту "Львів. політехніка".-2009 .-С. 162-167 .- Бібліогр.: 5 назв.
124. Екстрагування цільових компонентів з амаранту гібриду (*Amaranthus hybridus*). Наукові праці ОНАХТ, Міжнародна науково-практична конференція і школа-семінар «Проблеми енергетичної ефективності харчових і хімічних виробництв», Одеса, 2009 р., с. 96-100
125. Семенишин Є.М., Ятчишин Й.Й., Стадник Р.В. Амарантова олія. Проблема вилучення цільових компонентів з насіння амаранту гібриду (*amaranthus hybridus*) екстрагуванням // Хімічна промисловість України. Київ, № 2(97) 2010, с.19 – 22.
126. Стадник Р.В., Семенишин Є.М. Визначення коефіцієнта внутрішньої дифузії при екстрагуванні олії з неподрібненого насіння амаранту гібриду (*amaranthus hibrydus*) // Наук. Пр. Одес. Нац. акад. харчових технологій. – 2010. – Вип. 37. – Т. 1. – С. 317.
127. Семенишин Є.М., Стадник Р.В., Троцький В.І. Експериментальне визначення коефіцієнтів внутрішньої дифузії для умов екстрагування рідких та твердих цільових компонентів // Наук. Пр. Одес. Нац. акад. харчовихтехнологій. – 2010. – Вип. 37. – Т. 1. – С. 341.
128. Є.М.Семенишин, д.т.н., Й.Й.Ятчишин, д.х.н, Р.В.Стадник, аспірант Кінетика екстрагування олії полярними та неполярними розчинниками та їх сумішами // Хімічна промисловість України. Київ, № 4(105) 2011, с.40 – 44.
129. Семенишин Є.М., Стадник Р.В., Троцький В.І., Федорчук-МорозВ.І. Вплив дисперсності насіння амаранту на механізм екстрагування олії // Наук.

- Пр. Одес. Нац. акад. Харчових технологій. – 2011. – Вип. 39. – Т. 2. – С. 159-163.
130. Стадник Р.В., Семенишин Є.М., Федорчук-Мороз В.І. Проблеми вилучення олії з насіння амаранту //Захист навколишнього середовища. Енергоощадність. Збалансоване природокористування: зб. матеріалів І міжнар. конгр., Львів, 28-29 черв.2009 р./Нац. ун-т "Львів. політехніка" та ін.-Л.:Вид-во Нац. ун-ту "Львів. політехніка".-2009.- С. 71.
131. Дячок В.В., Попович О.Р. Дослідження впливу відтискання відпрацьованої рослинної сировини на ефективність процесу екстрагування // Вісник НУ "Львівська політехніка" "Хімія,технологія речовин та їх застосування". – 2007. – № 590. – С. 240–243.
132. Дячок В.В. Моделювання нетрадиційних випадків перебігу екстракційних процесів // Вопросы химии и химической технологии. – 2008. – №6. – С. 209–212.
133. Государственная Фармакопея СССР: Вып.1. Общие методы анализа / МЗ СССР.–[11-е изд., доп.]– М.: Медицина, 1987.– 336с.
134. Chemometric Profile of Root Extracts of *Rhodiola imbricata* Edgew. with Hypenated Gas Chromatography Mass Spectrometric Technique / Amol B. Tayade, Priyanka Dhar, Jatinder Kumar [etc.] // PLOS ONE – 2013. – V.8, №1–e52797.
135. Direct resistively heatedcolumn gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities / C. Bicchi, C. Brunelli, C. Cordero [etc.] // J. Chromatogr. A. – 2004. – V. 1024, №1–2. – P. 195–207.
136. Сидоров Ю.І. Екстракція рослинної сировини.–Л.: В-во Нац. університету «Львівська політехніка», 2008. – 336 с.
137. Змейова М. М., Ступаченко О. М. та ін. Удосконалення технології процесу екстрагування // Хім. пром-сть України. – 2003. – № 4. – С. 62.

ДОДАТКИ

Додаток А

Акти впровадження

Додаток А



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:**
«Культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro* та екстрагування біологічно активних речовин з біомаси»
2. **Установа, її адреса, виконавець:**
Національний університет «Львівська політехніка», м. Львів, вул. С. Бандери 12, здобувач Кривавич А.С.
3. **Джерела інформації:**
 1. The molecular structure N-(2,2,2-trichloro-1-((5-phenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino)ethyl)acet- and thioacetamide / Pavlo Zadorozhnyi, Vadym Kiselev, Ann Kravaych [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – V6 (2). – P. 689-695.
 2. Кривавич А.С. Хромато-мас-спектрометричне вивчення та технологія екстрактів *Gladiolus imbricatus* / А.С. Кривавич, М.С. Курка, В.П. Новіков // Питання хімії та хімічної технології. – 2015. – Т. 4 (102) – С. 62-66. Kravaych A.S., Konechna R.T., Petrina R.O., Kurka M.S., Zayarnuk N.L., Gulko R.M., Stadnytska N.E., Novikov V.P. /
 3. Phytochemical research of plant extracts and use *in vitro* culture in order to preserve rare wild species *Gladiolus imbricatus* // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – V5(1). – P. 240-246.
4. **Впроваджено:** в наукову роботу відділу механізмів органічних реакцій Інституту органічної хімії НАН України
5. **Термін впровадження:** 2015р.
6. **Ефективність впровадження:** одержані результати в області культивування в умовах *in vitro* та екстрагування БАР спрямовані на проведення подальших досліджень з метою розширення області використання одержаних екстрактів біомаси.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач відділу механізмів органічних реакцій Інституту органічної хімії НАН України, заступник директора з наукової роботи, д.х.н., проф.

Bova M.V.

«Затверджую»
 Керівник Відділення фізико-хімії
 горючих копалин Інституту
 фізико-органічної вуглехімії
 ім. Л.М.Литвиненка НАН України,
 д.т.н., с.п.с.
 Г. Г. Мідяна
 2016 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

*результатів дисертаційної роботи «Культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах in vitro та екстрагування біологічно активних речовин з біомаси»*

Кравчук Анни Сергіївни

Результати досліджень з розробки способу культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах in vitro, що викладені у дисертаційній роботі *Кравчук Анни Сергіївни* «Культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах in vitro та екстрагування біологічно активних речовин з біомаси», використовуються на практиці у науково-дослідних роботах відділу хімії і біотехнології горючих копалин з вивчення їх біологічної активності та можливості використання в композиціях з антимікробними властивостями. Отримані результати спрямовані на проведення подальших досліджень з метою розширення галузей практичного застосування біологічно активних сполук одержаних з калусної маси *Gladiolus imbricatus*.

Завідувач
 відділу хімії і біотехнології
 Відділення фізико-хімії горючих
 копалин ІнФОВ ім. Л.М.Литвиненка
 НАН України, д.т.н., с.п.с.

Карпенко О. В.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Генеральний директор ТзОВ «Технолаб»

Черняк О.М.

2016 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів дисертаційної роботи Кравич Анни Сергіївни
«Культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro* та екстрагування
біологічно активних речовин з біомаси»

Матеріали дисертаційної роботи щодо досліджень з розробки способу культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro* використовуються на практиці у лабораторно-дослідних роботах та в роботі контрольно-аналітичної лабораторії ТзОВ «Технолаб», що спрямовані на проведення подальших досліджень з метою розширення області використання одержаних екстрактів біомаси.

Результати дисертаційної роботи можуть використовуватись в умовах фармацевтичного виробництва як метод одержання нових ефективних лікарських субстанцій з антимікробними властивостями та створення на їх основі комплексних препаратів широкого спектру дії.

Відповідальний за впровадження:

Нач. відділу управління якістю

Андрейшин І.О.

Додаток Б

Матеріальний баланс процесу культивування

Таблиця Б.1

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
MgSO ₄	1	0,0351	0,0351	АСБ	0,0067	1,7102	0,0115
Всього			0,0351	Всього			0,0115

Таблиця Б.2

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
MgSO ₄	1	0,0351	0,0351	АСБ	0,004	1,7102	0,0068
Всього			0,0351	Всього			0,0068

Таблиця Б.3

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
KH ₂ PO ₄	1	0,0143	0,0143	АСБ	0,0337	1,7102	0,0576
KNO ₃	1	0,2145	0,2145				
Всього			0,2288	Всього			0,0576

Таблиця Б.4

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
KH_2PO_4	1	0,0143	0,0143	АСБ	0,0007	1,7102	0,0576
Всього			0,0143	Всього			0,0012

Таблиця Б.5

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів N в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-ть атомів N в рівнянні	Речовина	К-сть атомів N в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-ть атомів N в рівнянні
KNO_3	1	0,2145	0,2145	АСБ	0,5386	1,7102	0,9211
NH_4NO_3	2	0,2351	0,4702				
Разом			0,6847	Разом			0,9211

Таблиця Б.6

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
CaCl_2	1	0,0452	0,0452	АСБ	0,0047	1,7102	0,0080
Всього			0,0452	Всього			0,0080

Таблиця Б.7

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
$C_{12}H_{22}O_{11}$	12	1	12	АСБ	3,8498	1,7102	6,5839
				$CaCO_3$	1	0,0326	0,0326
				$KHCO_3$	1	0,1319	0,1319
Всього			12	Всього			6,7784

Таблиця Б.8

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
$C_{12}H_{22}O_{11}$	22	1	22	АСБ	6,5617	1,7102	11,1628
KH_2PO_4	2	0,0143	0,0286	$KHCO_3$	1	0,1319	0,1319
NH_4NO_3	4	0,3533	1,4132				
Всього			23,4418	Всього			11,2947

Таблиця Б.9

До реакції				Після реакції			
Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні	Речовина	К-сть атомів в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	К-сть атомів в рівнянні
$C_{12}H_{22}O_{11}$	11	1	11	АСБ	2,3033	1,7102	3,9391
KH_2PO_4	4	0,0143	0,0572	CO_2	2	5,2516	10,5032
$MgSO_4$	4	0,0351	0,1404	H_2O	1	6,0735	6,0735
KNO_3	3	0,2145	0,6435	$CaSO_4$	4	0,0046	0,0184
NH_4NO_3	3	0,3533	1,0599	$Mg SO_4$	4	0,0237	0,0948
				$CaCO_3$	3	0,0326	0,0978
				$KHCO_3$	3	0,1319	0,3957
				K_3PO_4	4	0,0131	0,0524
Всього			12,901	Всього			21,1542

Таблиця Б.10

Ідеальний матеріальний баланс біосинтезу суспензійної культури

G. imbricatus

Взято, кг		Одержано, кг	
Глюкоза	342	АСБ	171,00
KH_2PO_4	1,94	CO_2	231,07
$MgSO_4$	4,21	H_2O	109,32
KNO_3	21,66	$CaSO_4$	0,63
NH_4NO_3	28,26	$MgSO_4$	1,99
$CaCl_2$	5,02	$CaCO_3$	3,26
O_2	132,05	$KHCO_3$	15,83
		K_3PO_4	2,05
Всього	535,14	Всього	535,15

Всього ПС разом з посівним матеріалом за умови, що вміст цукру дорівнює 3% становить $342/0,03 = 11400$ кг. При густині ПС ≈ 1020 кг/м³ первинний об'єм ПС становить $11400/1020 = 11,18$ м³.

Маса посівної культури в перерахунку на АСБ становить $1,382 \cdot 11,18 = 15,45$ кг.

З 342 кг цукру синтезується 153,9 кг АСБ, отже, 15,45 кг синтезується з 34,33 кг цукру, відтак, маса посівного матеріалу становить $34,33 / 0,03 = 1144$ кг.

Маса ПС для робочої ферментації дорівнює $11400 - 1144 = 10256$ кг.

Прийmemo, що розчини мікросолей і комплексу вітамінів мають концентрації по 10%; вміст води в клітинах суспензійної культури дорівнює 67%. Вміст екстрактивних речовин в перерахунку на суху біомасу становить $\sim 5\%$.

Таблиця Б.11

Неузгоджений з потужністю робочий баланс ферментації *G. imbricatus*

Взято, кг		Одержано, кг	
Стерильний розчин цукру і макросолей в тому числі:	10252,25	Клітинна біомаса, $(153,9 + 15,45)/0,33 =$ в тому числі:	513,18
Цукор	342	- екстрактивні речовини (8,5 кг)	
KH ₂ PO ₄	11,06	- внутрішньоклітинна вода (335,33 кг)	
MgSO ₄	4,26	CaSO ₄	0,57
KNO ₃	12,53	MgSO ₄	2,41
NH ₄ NO ₃	26,9	CaCO ₃	2,93
Ca Cl ₂	5,02	KHCO ₃	14,25
Вода	9850,48	K ₃ PO ₄	1,84
Стерильний розчин мікросолей в тому числі:	9,55	Цукор	34,2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, г	2,85	KH ₂ PO ₄	0,19
H ₃ BO ₃ , г	70,7	KNO ₃	2,12
MnSO ₄ ·5H ₂ O, г	25,42	Ca Cl ₂	0,50

KI, г	9,46	Вода	10718,56
ZnSO ₄ ·7H ₂ O, г	98,04	Всього культуральної рідини	11328,9
CuSO ₄ ·5H ₂ O, г	0,29	Вуглекислий газ	207,95
CoCl ₂ ·6H ₂ O, г	0,29		
Na ₂ EDTA, г	431		
FeSO ₄ ·7H ₂ O, г	317		
Вода, кг	8,595		
Стериліний розчин вітамінів	12,20		
Інозїтол, г	1140		
Фолїєва кислота, г	5,7		
Рїбофлавїн (B ₂), г	5,7		
Бїотин, г	11,4		
Са-пантотенат, г	11,4		
Пїрїдоксин (B ₆), г	11,4		
Тїамїнхлорид, г	11,4		
Нїкотинамїд (PP), г	22,8		
Кобаламїн (B ₁₂), г	0,02		
Вода	10,98		
Посївний матерїал	1144		
Аерацїйний кисень	118,85		
Разом	11536,85	Разом	11536,85

Таблиця Б.12

Неузгоджений з проектною потужністю баланс відділення біомаси

Взято, кг		Одержано, кг	
Культуральна рідина	11328,9	Вологий осад в тому числі:	738,11
Промивна вода	1476,22	клітинна біомаса (513,18) в тому числі:	
		- екстрактивні речовини (8,5 кг)	
		- внутрішньоклітинна вода (335,33 кг)	
		CaSO ₄ (0,57)	
		CaCO ₃ (2,93)	
		Міжклітинна вода (221,43)	
		Фільтрат	12067,01
Разом	12805,12	Разом	12805,12

Додаток В

Таблиці завантаження

Таблиця В.1

Культивування біомаси

Завантажено за цикл				Одержано за цикл			
з/п	Компонент	кг	М ³	з/п	Компонент	кг	М ³
1	Стерильне ПС	37742,08	37,00	1	КР	41690,352	40,9
2	Посівний матеріал	4734,83	4,64	2	Газові викиди	1223,93	
3	Аераційний кисень	437,37					
Разом		42914,28		Разом		42914,28	

Таблиця В.2

Матеріальний баланс відділення біомаси

Завантажено за цикл				Одержано за цикл			
з/п	Компонент	кг	М ³	з/п	Компонент	кг	М ³
1	КР	41690,3	40,9	1	Вологий осад	2716,24	2,66
2	Промивна вода (за нормовитратою)	6287,2	6,16	2	Фільтрат	45261,26	44,37
Разом		47977,5	47,06	Разом		47977,5	52,76

Таблиця В.3

Матеріальний баланс екстракції

Завантажено за цикл				Одержано за цикл			
з/п	Компонент	кг	М ³	з/п	Компонент	кг	М ³
1	Вологий осад	2716,24	2,66	1	Непромийтий шрот	2431,56	2,38
2	Етанол	15776,8	15,46		Екстракт	16061,48	15,74
Разом		18493,04	18,12	Разом		18493,04	18,12

Додаток Г

Технологічні розрахунки і вибір обладнання

Інокулятори -9,22

У великому інокуляторі (І-3) потрібно приготувати 4734,83 кг ПМ. Така кількість ПМ займає об'єм: $4734,83/1020 = 4,64 \text{ м}^3$. Враховуючи коефіцієнт заповнення 0,7, повна ємність апарата повинна становити $6,63 \text{ м}^3$. Обираємо стандартний апарат ємністю $8,00 \text{ м}^3$ типу ВЕЕ.

Для вирощування ПМ у великому інокуляторі потрібен ПМ середнього інокулятора в кількості $0,1 \times 4,64/1,1 = 0,42 \text{ м}^3$. Враховуючи коефіцієнт заповнення 0,7, повна ємність апарата повинна становити $0,6 \text{ м}^3$. Обираємо стандартний апарат ємністю $0,63 \text{ м}^3$ типу ВЕЕ.

Для засіву середнього інокулятора (І-2) потрібний ПМ в кількості $0,1 \times 0,42/1,1 = 0,038 \text{ м}^3$. Враховуючи коефіцієнт заповнення 0,7, повна ємність апарата повинна становити $0,054 \text{ м}^3$. Обираємо стандартний апарат ємністю $0,063 \text{ м}^3$ типу ВЕЕ.

Для засіву малого інокулятора (І-1) потрібний ПМ в кількості $0,1 \times 0,038/1,1 = 0,0034 \text{ м}^3$. Таку кількість ПМ отримують в лабораторних умовах.

Реактор-змішувач РЗ-1

Призначений для приготування нестерильного розчину цукру і макросолей для інокуляції. За технологічний цикл потрібно приготувати для інокуляції 1797,24 кг.

Прийmemo, що густина ПС дорівнює 1020 кг/м^3 . Тоді робочий об'єм апарата буде складати: $1797,24/1020 = 1,8 \text{ м}^3$. Враховуючи коефіцієнт заповнення реактора 0,9, повний об'єм реактора буде таким: $1,8/0,9 = 2 \text{ м}^3$

Отже, обираємо реактор зі стандартним об'ємом 2 м^3 типу ВПП. Матеріал – двошарова сталь (внутрішній – двошарова сталь, а зовнішній – конструкційна сталь Ст.3).

Розрахунок лінії УНС -5

За технологічний цикл потрібно приготувати 1797,24 кг стерильного поживного середовища І. Ця кількість ПС займає об'єм $1797,24/1020 = 1,8 \text{ м}^3$. Отже, обираємо лінію УНС-5.

Ця лінія стерилізації має один витримувач об'ємом $0,17 \text{ м}^3$.

Час витримки стерилізації становить:

$$0,17/5 = 0,034 \text{ год.} = 2,04 \text{ хв.}$$

Температура стерилізації дорівнює 120°C . Прийmemo, що концентрація мікрофлори в ПС 10^6 кл./см^3 .

Знаходимо коефіцієнт стерилізації:

$$2,04 = \frac{1}{k} \ln \frac{C_0 V_p}{N} = 1/k \ln(10^6 * 10^6 * (1,98 + 0,17)) / 0,01$$

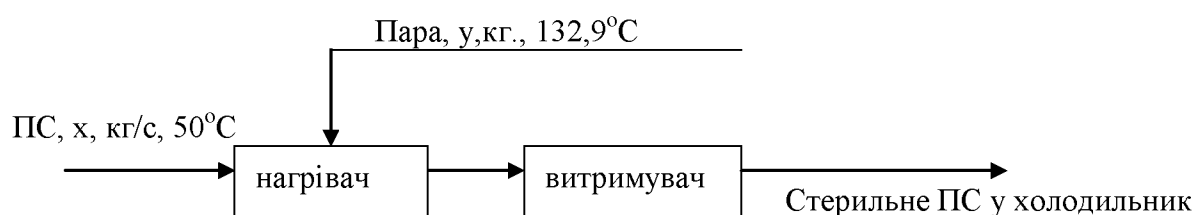
Звідси, $k = 16,17$.

Час прокачування середовища:

$$1,98/5 = 0,4 \text{ год.}$$

$$V_{\text{вигр.}}/V_n = 0,17/2,04 = 0,08333 \text{ м}^3/\text{хв.}$$

Прийmemo, що для стерилізації використовують насичену гостру пару, взятую під тиском $0,3 \text{ МПа}$, яка має температуру $132,9^\circ\text{C}$, теплоту конденсації 2171 кДж/кг . Масові витрати ПС і пари позначимо відповідно x та y . Прийmemo, що температура ПС становить 50°C , а на виході - 26°C .



Рівняння матеріального балансу:

$$x + y = 1797,24/0,3 * 3600 = 1,66 \text{ кг/с.}$$

Рівняння теплового балансу нагрівача:

$$X * 4,19(120 - 26) = 2171y + y * 4,19(132,9 - 120),$$

$$393,86x = 2225,05y,$$

звідси, $x = 5,64y$.

Складаємо систему рівнянь:

$$x + y = 1,87;$$

$$x = 5,64y.$$

Звідси, $x = 1,12$ кг/с, $y = 0,2$ кг/с.

Загальна витрата пари $Y = 0,2 * 0,3 * 3600 = 216$ кг, а поживного нестерильного середовища $X = 1797,24 - 216 = 1581,24$ кг.

Реактор-змішувач РЗ-2

Призначений для приготування нестерильного розчину цукру і макросолей для ферментації. За технологічний цикл потрібно приготувати 37552,22 кг.

Прийmemo, що густина ПС дорівнює 1020 кг/м³. Тоді робочий об'єм апарата буде складати: $37552,22/1020 = 35,91$ м³. Враховуючи коефіцієнт заповнення реактора 0,9, повний об'єм реактора буде таким: $35,91/0,9 = 39,91$ м³. Реакторів з мішалками і корпусом типу ВЕЕ на таку ємність не випускають. Встановлюємо два апарати, що діють паралельно, ємністю по 20 м³ кожний. Матеріал – двошарова сталь (внутрішній – нержавіюча сталь, а зовнішній – конструкційна сталь Ст.3).

Розрахунок лінії УНС -20

Обрана під час матеріальних розрахунків балансу стерилізації.

Ферментер 9

Згідно матеріальних розрахунків маса КР, яку отримують за технологічний цикл, становить 41690,3 кг. КР займає об'єм $41690,3/1099 = 37,93$ м³. при коефіцієнті заповнення 0,7...0,9 повний об'єм ферментера повинен становити 75,87 м³...91,7 м³. Обираємо стандартний апарат об'ємом 80 м³ з аерліфтом типу ВЕЕ.

Насос Н-3

КР об'ємом 46,6 м³ за 9 годин потрібно перекачати у буферну ємність. Продуктивність насоса повинна бути не менше $46,6/9 = 5,1$ м³/год. Обираємо відцентровий насос марки Х 8/18 продуктивністю 8 м³/год.

Реактор-змішувач РЗ-3

Призначений для приготування нестерильного розчину мікросолей. За технологічний цикл потрібно приготувати 40,09 кг.

Прийmemo, що густина ПС дорівнює 1020 кг/м^3 . Тоді робочий об'єм апарата буде складати: $40,09/1020 = 0,039 \text{ м}^3$. Враховуючи коефіцієнт заповнення реактора 0,9, повний об'єм реактора буде таким: $0,039/0,9 = 0,043 \text{ м}^3$

Отже, обираємо реактор зі стандартним об'ємом $0,063 \text{ м}^3$ типу ВПП. Матеріал – двошарова сталь (внутрішній – двошарова сталь, а зовнішній – конструкційна сталь Ст.3).

Насос Н-4, 5

ПС II об'ємом $0,04 \text{ м}^3$ за 1 годину потрібно перекачати. Продуктивність насоса повинна бути не менше $0,04/1 = 0,04 \text{ м}^3/\text{год}$. Обираємо відцентровий насос марки НД-40/25 продуктивністю 40 л/год.

Ємність Є-1

Ємність призначена для приймання ПС II після мікрофільтрування. Згідно матеріальних розрахунків маса ПС II, яку отримують за технологічний цикл, становить 40,15 кг. ПС II займає об'єм $40,15/1020 = 0,04 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення 0,8...0,9 повний об'єм ферментера повинен становити $0,044...0,05 \text{ м}^3$. Обираємо стандартний апарат об'ємом $0,063 \text{ м}^3$ з корпусом типу ВПП.

Реактор-змішувач РЗ-4

Призначений для приготування нестерильного ПС III. За технологічний цикл потрібно приготувати 50,08 кг.

Прийmemo, що густина ПС дорівнює 1020 кг/м^3 . Тоді робочий об'єм апарата буде складати: $50,08/1020 = 0,049 \text{ м}^3$. Враховуючи коефіцієнт заповнення реактора 0,9, повний об'єм реактора буде таким: $0,049/0,9 = 0,054 \text{ м}^3$

Отже, обираємо реактор зі стандартним об'ємом $0,063 \text{ м}^3$ типу ВПП. Матеріал – двошарова сталь (внутрішній – двошарова сталь, а зовнішній – конструкційна сталь Ст.3).

Насос Н-6, 7

ПС III об'ємом $0,049 \text{ м}^3$ за 1 годину потрібно перекачати. Продуктивність насоса повинна бути не менше $0,049/1 = 0,049 \text{ м}^3/\text{год}$. Обираємо відцентровий насос марки НД-63/16 продуктивністю 63 л/год.

Ємність Є-2

Ємність призначена для приймання ПС III після мікрофільтрування. Згідно матеріальних розрахунків маса ПС II, яку отримують за технологічний цикл, становить 51,3 кг. ПС III займає об'єм $51,3 / 1020 = 0,05 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення 0,8...0,9 повний об'єм ферментера повинен становити 0,055...0,062 м^3 . Обираємо стандартний апарат об'ємом 0,063 м^3 з корпусом типу ВПП.

Буферна ємність Є-3

Ємність призначена для приймання КР після ферментації. Згідно матеріальних розрахунків маса КР, яку отримують за технологічний цикл, становить 47534,58 кг. КР займає об'єм $47534,58 / 1099 = 46,6 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення 0,8...0,9 повний об'єм ємності повинен становити 51,77...58,25 м^3 . Обираємо стандартний апарат об'ємом 63 м^3 з корпусом типу ГПП. Матеріал – двошарова сталь (внутрішній – двошарова сталь, а зовнішній – конструкційна сталь Ст.3).

Фільтр

БВФ призначений для фільтрування культуральної рідини. Вакуум в апараті дорівнює 80% Робочий тиск становить $0,8 \times 101325 = 81060 \text{ Па}$. Частоту оберту фільтра можна регулювати в межах 0,13...2 об/хв.. Кут занурення барабана в суспензію – 135°.

Один оберт барабан може зробити за $1 / 0,13 \dots 1 / 2 = 7,7 \dots 0,5 \text{ хв}$. Враховуючи кут занурення, час знаходження певної точки в суспензії становить $(7,7 \dots 0,5 (135/360)) = 2,9 \dots 0,19 \text{ хв} = 173 \dots 11 \text{ с}$.

Площа точки, яка проходить крізь суспензію, приймаємо 1 м^2 . Знаходимо об'єм фільтрату, який одержують під час фільтрування:

$$11 \dots 173 = V_{\phi}^2 * 67,45 * 5 \cdot 10^{10} * 1,2 \cdot 10^{-3} / 2 * 81060$$

$$\text{звідси, } V_{\phi} = 0,021 \dots 0,0832 \text{ м}^3.$$

За попередніми розрахунками за 375 год. потрібно відфільтрувати 46,6 м^3 КР. Таким чином визначаємо масу осаду:

$$m_o = m_{\text{во}} / m_{\text{КР}} = 3143,6 / 46,6 = 67,45 \text{ кг/м}^3.$$

Оскільки з 1 м^3 суспензії виділяється $67,45 / 1100 = 0,0613 \text{ м}^3$ осаду, то фільтрату утвориться $1 - 0,0613 = 0,938 \text{ м}^3$, то в разі утворення 0,021...0,0832 м^3

фільтрату на 1 м^2 поверхні відкладеться $0,00137\dots 0,00543 \text{ м}^3$ осаду. Отже, на поверхні утвориться осад завтовшки $1,37\dots 5,43 \text{ мм}$.

Відтак, фільтрування за найповільнішої швидкості обертання барабана дозволяє одержувати з даної суспензії осад, товщина якого більша ніж 5 мм , що свідчить про придатність використання апаратів даної серії.

За 173 с на площі 1 м^2 відкладається осад масою $0,00543 \cdot 1100 = 5,97 \text{ кг}$. Для одержання такої кількості суспензії потрібно переробити $5,97/67,45 = 0,0885 \text{ м}^3$ суспензії.

Отже продуктивність фільтра становить $0,0885/173 = 5,1 \cdot 10^{-4} \text{ м}^3 \text{ суспензії}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}) = 1,84 \text{ м}^3 \text{ суспензії}/(\text{м}^2 \cdot \text{год})$.

Потрібна продуктивність $46,6/364 = 0,13 \text{ м}^3/\text{год}$.

Відтак площа фільтрування $0,13/1,84 = 0,1 \text{ м}^2$.

Загальна площа фільтрування $(0,1 \cdot 360)/135 = 0,2 \text{ м}^2$.

Обираємо фільтр Б-3-1,6/0,6Н.

Дозувальний насос Н-8

Згідно матеріальним розрахункам протягом 20 год насос повинен рівномірно дозувати $46,6 \text{ м}^3 \text{ КР}$ на фільтр. Продуктивність насосу повинна бути $46,6/20 = 2,33 \text{ м}^3/\text{год}$.

Обираємо дозувальний насос відцентрового типу 1,5 ХО-4 з максимальною продуктивністю $8 \text{ м}^3/\text{год}$.

Буферна ємність Є-4

Ємність призначена для приймання вологої біомаси після фільтрування. Згідно матеріальних розрахунків волога біомаса, яку отримують за технологічний цикл, становить $3143,6 \text{ кг}$. Вона займає об'єм $3143,6/1100 = 2,86 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення $0,8\dots 0,9$ повний об'єм ємності повинен становити $3,17\dots 3,57 \text{ м}^3$. Отже, обираємо стандартну ємність на $4,00 \text{ м}^3$ типу ВКП.

Перколятор П-1

Перколятор призначений для екстракції отриманої біомаси після фільтрування. Для екстракції завнтажуємо вологу біомасу в кількості $3143,6 \text{ кг}$ та $15776,8 \text{ кг}$ етанолу. Загальний об'єм становить $18,5 \text{ м}^3$. При коефіцієнті

завантаження 0,9 повний об'єм перколятора становитиме $18,5/0,9 = 20,55 \text{ м}^3$. Отже, обираємо стандартну ємність типу ВЕЕ на $25,5 \text{ м}^3$.

Буферна ємність Є-5

Ємність призначена для подання етанолу в перколятор на екстракцію. Згідно матеріальних розрахунків потрібна кількість етанолу $15776,8 \text{ кг}$. Етанол займає об'єм $15,46 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення $0,8 \dots 0,9$ повний об'єм ємності повинен становити $17,1 \dots 19,3 \text{ м}^3$. Отже, обираємо стандартну ємність на $20,00 \text{ м}^3$ типу ГЕЕ.

Насос Н-9

Призначений для рециркуляції етанолу і подавання його у перколятор. Продуктивність насоса буде $15,46/3 \text{ м}^3$. Отже, обираємо насос вихрового типу ЦВ-4/85 продуктивністю $5 - 15 \text{ м}^3/\text{год}$.

Буферна ємність Є-6

Ємність призначена для приймання екстру. Згідно матеріальних розрахунків кількість отриманого екстракту $16114,106 \text{ кг}$. Екстракт займає об'єм $15,789 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення $0,8 \dots 0,9$ повний об'єм ємності повинен становити $17,5 \dots 19,7 \text{ м}^3$. Отже, обираємо стандартну ємність на $20,00 \text{ м}^3$ типу ГЕЕ.

Насос Н-10

Призначений для подачі екстракту на фасування. Продуктивність насоса буде $15,789 \text{ м}^3$.

Отже обираємо насос відцентрового типу 2ХО-9 продуктивністю $20 \text{ м}^3/\text{год}$.

Ємність Є-7

Ємність призначена для промитого шроту. Згідно матеріальних розрахунків кількість непромитого шроту $2806,33 \text{ кг}$. Промитий шрот займає об'єм $2806,33/1100 = 2,5 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення $0,8 \dots 0,9$ повний об'єм ємності повинен становити $2,8 \dots 3,1 \text{ м}^3$. Отже, обираємо стандартну ємність на $3,2 \text{ м}^3$ відкритого типу ГЕЕ.

Специфікація основного обладнання виробництва біомаси

G. imbricatus

Індекс	Призначення	Кількість	Технічні характеристики	Габарити, мм
1	2	3	4	5
I-1	Малий інокулятор	1	Об'єм 0,063м ³ . Споряджений барботером, перемішу вальним пристроєм та оболонкою для нагрі-вання і охолодження ПМ.	Внутрішній діаметр 400. Габаритна висота 370
МПА	Середній інокулятор	1	Об'єм 0,04м ³ . Споряджений барботером, перемішу вальним пристроєм та оболонкою для нагрі-вання і охолодження ПМ.	Внутрішній діаметр 400. Габаритна висота 185
ВПА	Великий інокулятор	1	Об'єм 8 м ³ . Споряджений барботером, перемішувальним пристроєм та оболонкою для нагрівання і охолодження ПМ.	Внутрішній діаметр 1600 Габаритна висота 3450
РЗ-1	Реактор-змішувач для приготування нестерильного ПС I	1	Об'єм 2,5 м ³ . Споряджений ПП.	Внутрішній діаметр 1200 Габаритна висота 2210
Лінія УНС – 5				
Н-1	Насос	3	Тип: вихровий Марка: 2,5В – 1,8	
Нг	Нагрівач	1	Ємність 0,025 м ³	
Вт	Витримувач	1	Змієвик ємністю 0,17 м ³	

Т-2	Холодильник	1	Тип: труба в трубі, Площа теплообміну 20 м ²	Діаметр кожуха 700. Довжина труб 9000.
Р-2	Реактор-змішувач для приготування нестерильного ПС І	1	Об'єм 50 м ³ Споряджений перемішу вальним пристроєм	Внутрішній діаметр 3200 Габаритна висота 6220
Лінія УНС-20				
Н-2	Насос	1	Тип : відцентровий ЗК-6	
Т-1	Рекуператор	1	Тип: пластинчатий теплообмінник, 100 м ²	2935×730×1770
Нг	Нагрівач	1	Ємність нагрівача 0,1 м ³	
В-1,2,3	Витримувачі	3	Тип: ємність. Об'єм – 5,1 м ³	Діаметр 600. Висота 6000.
Т-2	Холодильник	1	Тип: пластинчатий теплообмінник, 40 м ²	1795×730×1770
9	Ферментер	1	Об'єм – 80 м ³ . Ферментер з пневматичним перемішуванням (з аерліфтом). Коефіцієнт масопередачі за киснем досягає 1,5 – 3 кг О ₂ /(м ³ ·год). Корпус ферментера споряджений оболонкою. Матеріал апарата – сталь Х18Н10Т, оболонка Ст.3.	Внутрішній діаметр 3200. Габаритна висота 8890.
Н-3	Насос	1	Тип: відцентровий Марка: Х 8/18 Продуктивність: 8 м ³ /год	
РЗ-3	Реактор-змішувач для приготування нестерильного ПС ІІ	1	Об'єм 0,063 м ³ Споряджений перемішу вальним пристроєм	Внутрішній діаметр 400 Габаритна висота 500
Н-4,5	Насос	2	Тип: одноплунжепний	

			Марка: НД-40/25 Продуктивність: 40 л/год	
Є-1	Ємність для стерильного ПС I	1	Об'єм 0,063 м ³ Тип: ВПП	Внутрішній діаметр 400 Габаритна висота 500
РЗ-4	Реактор-змішувач для приготування нестерильного ПС III	1	Об'єм 0,063 м ³ Споряджений перемішувальним пристроєм	Внутрішній діаметр 400 Габаритна висота 500
Н-6,7	Насос	2	Тип: одноплунжепний Марка: НД-63/16 Продуктивність: 63 л/год	
Є-2	Ємність для стерильного ПС II	1	Об'єм 0,063 м ³ Тип: ВПП	Внутрішній діаметр 400 Габаритна висота 500
Є-3	Буферна ємність для КР	1	Об'єм 63 м ³ Тип: ГПП	Внутрішній діаметр 3200 Габаритна висота 7835
БВФ	Барабанний вакуум фільтр	1	Марка: Б-3-1,6/0,6Н, поверхня фільтрування 3 м ²	1600*3000*600
Н-8	Насос для перекачування КР	1	Тип: відцентровий Марка: 1,5ХО-4 Продуктивність: 8 м ³ /год	
Є-4	Буферна ємність для валогої біомаси	1	Об'єм 4 м ³ Тип: ВКП	Внутрішній діаметр 1620 Висота 1725, кут 60° – 1530
П-1	Перколятор для екстрагування	1	Об'єм 25,5 м ³ . Циліндр, в якому розташовані три циліндричні вставки без кришок, з перфорованими	Внутрішній діаметр 2200 Габаритна висота 5850

			днищами та з гладкою оболонкою.	
Є-5	Буферна ємність для етанолу	1	Об'єм 20,0 м ³ Тип: ГЕЕ	Внутрішній діаметр 2600 Габаритна висота 2905
Н-9	Насос для розведення і подавання етанолу	1	Тип: вихровий Марка: ЦВ-5/105 Продуктивність: 10-21 м ³ /год	
Є-6	Буферна ємність для екстракту	1	Об'єм 20,0 м ³ Тип: ГЕЕ	Внутрішній діаметр 2600 Габаритна висота 2905
Н-10	Насос для подавання екстракту на лінію фасування	1	Тип: відцентровий Марка: 2ХО-9 Продуктивність: 20 м ³ /год	
Є-7	Буферна ємність для шроту, відкрита	1	Об'єм 3,2 м ³ Тип: ГЕЕ	Внутрішній діаметр 1400 Габаритна висота 1615

