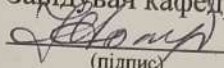


**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

 (підпис) Наталія ГОЛУБ

«05» 06 2023 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: « Технологія отримання вторинних метаболітів з суспензійної
культури лікарських рослин»**

Виконав:

студент IV курсу, групи БЕ-91

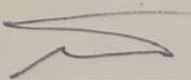
Ступак Андрій Сергійович



Керівник:

Доцент, к.б.н.,

Банникова Марія Олександрівна



Консультант з проектування:

Професор, д.т.н, професор

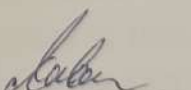
Саблій Лариса Андріївна



Рецензент:

Доцент каф. промислової біотехнології, к.б.н.,

Яловенко Олена Ігорівна



Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент 

Київ – 2023 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

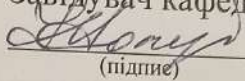
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри


(підпис)

Наталія ГОЛУБ
(ім'я, прізвище)

«17» 04 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Ступаку Андрію Сергійовичу

1. Тема проєкту «Технологія отримання вторинних метаболітів з суспензійної культури лікарських рослин»

керівник проєкту к.б.н., доцент Банникова Марія Олександрівна,
затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1888-с

2. Термін подання студентом проєкту 05.06.2023 р.

3. Вихідні дані до проєкту:

Біореактор для культивування суспензійної культури женьшеню *Panax ginseng*, об'єм апарату 80 м³, коефіцієнт заповнення 0,7; наявне механічне перемішування та барботування. Потужність виробництва: кількість культивованої біомаси 13000 кг/рік.

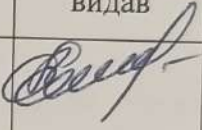
4. Зміст пояснювальної записки:

Літературний огляд методів вирощування культур лікарських рослин як продуцентів вторинних метаболітів в умовах *in vitro*; обґрунтування параметрів культивування та одержання гінзенозидів з суспензійної культури женьшеню; біохімічні основи технологічного процесу; технологічна частина; характеристика та розрахунок обладнання; охорона праці та довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо):

Технологічна схема одержання гінзенозидів з суспензійної культури женьшеню (A1); апаратурна схема одержання гінзенозидів з суспензійної культури женьшеню (A1); креслення виробничого біореактора (A1).

6. Консультанти розділів проекту*

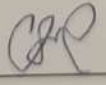
Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Графічна частина дипломного проекту (проекткування)	д.т.н., проф. Саблій Л.А.		

7. Дата видачі завдання 17 квітня 2023 р.

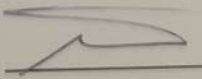
Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Вступ	21.04.23-27.04.23	виконав
2	Розділ 1.	28.04.23-04.05.23	виконав
3	Розділ 2.	05.05.23-29.05.23	виконав
4	Розділ 3.	10.05.23-13.05.23	виконав
5	Розділ 4.	14.05.23-18.05.23	виконав
6	Розділ 5.	19.05.23-26.05.23	виконав
7	Висновки	19.05.23-26.05.23	виконав
8	Графічна частина	27.05.23-02.06.23	виконав

Студент

 Андрій СТУПАК
(підпис)

Керівник проекту

 Марія БАННИКОВА
(підпис)

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проект	2	
2	A4	ДП БЕ9113. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	82	
3	A1	ДП БЕ9113. 01.000 ТС	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП БЕ9113. 02.000 АС	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП БЕ9113. 03.000 Б	Креслення виробничого біореактора	1	

				ДП БЕ91 13.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробник	Ступак А.С.				1	1
Керівник	Банникова М.О.				«КПІ ім. Ігоря Сікорського» ФБТ, КББЕ гр. БЕ-91	
Консультант	Саблій Л.А.					
Н/контр.						
Зав. каф.	Голуб Н.Б.					

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 84 ст., 8 рис., 4 табл., 70 посилань.

У дипломному проєкті обрано та обґрунтовано технологію отримання вторинних метаболітів із суспензійної культури лікарської рослини, а саме одержання гінзенозидів із суспензійної культури женьшеню *Panax ginseng*. Обрано раціональні умови, режим та параметри культивування *in vitro* з подальшим отриманням цільового продукту. Технологія включає підготовчі роботи, а саме: санітарну підготовку виробництва, очищення води та повітря, приготування живильного середовища та підготовку інокуляту, та основні стадії такі як: культивування суспензійної культури женьшеню, відділення біомаси та екстракція гінсенозидів.

Охарактеризовано сировину, біологічний агент, описано біохімічні основи процесу, розраховано матеріальний баланс виробництва, наведено контроль стадій виробничого процесу. Спроектовано біореактор для стадії культивування, об'ємом 80 м³, наведено його основні технічні характеристики. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва гінзенозидів із суспензійної культури женьшеню. Наведено рекомендації щодо охорони праці та довкілля.

ГІНЗЕНОЗИДИ, КУЛЬТИВУВАННЯ, СУСПЕНЗІЙНА КУЛЬТУРА, ЖЕНЬШЕНЬ, БІОРЕАКТОР, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, ЕКСТРАКЦІЯ.

ABSTRACT

Explanatory note: 84 p., 8 figures, 4 tables, 70 references.

In the diploma project, the technology for the production of secondary metabolites from the suspension culture of a medicinal plant was selected and substantiated, namely the production of ginsenosides from the suspension culture of *Panax ginseng*. The rational conditions, regime and parameters of *in vitro* cultivation with subsequent production of the target product were selected. The technology includes preparatory work, namely: sanitary preparation of production, water and air purification, preparation of the culture medium and inoculum preparation, and the main stages such as cultivation of ginseng suspension culture, biomass separation and ginsenoside extraction.

The raw materials and biological agent are characterized, the biochemical basis of the process is described, the material balance of production is calculated, and the control of the production process stages is presented. A bioreactor for the cultivation stage with a volume of 80 m³ was designed, and its main technical characteristics were presented. Technological and hardware schemes for the production of ginsenosides from ginseng suspension culture have been developed. Recommendations for labor and environmental protection are given.

GINSENOSIDES, CULTIVATION, SUSPENSION CULTURE, GINSENG,
BIOREACTOR, MATERIAL BALANCE, EXTRACTION.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ, ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ.....	12
1.1. Короткий літературний огляд методу культури <i>in vitro</i>	12
1.1.1. Поняття калюсу.....	13
1.1.2. Суспензійна культура.....	18
1.1.3. Вторинні метаболіти, що продукуються лікарськими рослинними культурами.....	21
1.1.4. Вплив різних чинників на вирощування культур <i>in vitro</i> та одержання цільових речовин.....	22
1.1.5. Сировина в Україні.....	26
1.2. Обґрунтування технології.....	27
1.3. Характеристика біологічного агенту.....	31
Висновки до розділу 1.....	34
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	35
2.1. Біосинтез гінзенозидів.....	35
2.2. Характеристика кінцевого продукту.....	39
Висновки до розділу 2.....	41
РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	43
3.1. Сировина і матеріали.....	43
3.2. Опис технологічного процесу одержання гінсенозидів з суспензійної культури женьшеню.....	45
3.3. Матеріальний баланс.....	52
3.4. Контроль виробництва.....	54
Висновки до розділу 3.....	58

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ступак А.				ЗМІСТ	Літ.	Арк.	Аркушів
Конс..							7	84
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.	Банникова М.О.							
Затверд.								

РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ.....	59
4.1. Виробнича потужність.....	59
4.2. Вибір апарату.....	60
4.3. Розрахунок виробничого біореактора.....	63
Висновок до розділу 4.....	66
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ.....	67
5.1. Охорона праці.....	67
5.2. Охорона довкілля.....	71
Висновки до розділу 5.....	73
ВИСНОВКИ.....	74
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	76
ДОДАТКИ.....	83

ВСТУП

Рослини є невичерпаним джерелом для відкриття нових продуктів, що мають медичне значення в розробці ліків. Сьогодні тільки деякі хімічні речовини, отримані з рослин, є важливими лікарськими засобами, які використовуються в одній або декількох країнах світу [1]. Дані вторинні метаболіти не відіграють важливої ролі в основних життєвих процесах рослини, таких як ріст, диференціація або розмноження, але вони можуть мати інші важливі функції, наприклад, у взаємодії рослини з навколишнім середовищем. На сьогоднішній день ідентифіковано понад 200 000 вторинних сполук рослин. Їх вміст у рослинах залежить від виду, сорту, умов зростання, а також географічного розташування [1].

Зазвичай, їх класифікують на основі хімічної структури. До вторинних метаболітів відносять: фенольні сполуки, сапоніни, ефірні олії, алкалоїди, стерини, терпени, дубильні речовини, кумарини та інші.

Вторинні метаболіти є економічно важливими як ліки, смакові та ароматичні речовини, барвники та пігменти, пестициди природного походження та харчові добавки. Багато ліків, що продаються сьогодні, є простими синтетичними модифікаціями або копіями речовин, отриманих природним шляхом [2].

Зростаюче комерційне значення сполук рослинного походження в останні роки призвело до підвищеного інтересу до вторинного метаболізму, особливо до можливості змінити виробництво біологічно активних рослинних метаболітів за допомогою технології культури тканин. Хімічний синтез багатьох з цих сполук є неможливим або надто дорогим. Таку можливість дають культури рослин *in vitro* [3]. Отримати вторинні метаболіти можна за

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП			Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Ступак А.										
Конс..										9	84
Реценз.								КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ			
Керівн.	Банникова М.О.										
Затверд.											

використання культури рослин *in vitro*, яка дає можливість виробляти біологічно активні сполуки в контрольованому середовищі, незалежно від кліматичних і ґрунтових умов. Крім того, культура *in vitro* дає можливість збільшити виробництво вторинних метаболітів шляхом оптимізації умов культивування, а також шляхом додаванням попередників метаболічних шляхів або еліситорів, які активують ці шляхи [3].

Культури рослинних клітин і тканин можуть бути створені в стерильних умовах з експлантів, таких як листя, стебла, коріння і меристеми рослин, як для розмноження, так і для вилучення вторинних метаболітів [2]. Повідомлялося про отримання вторинних метаболітів *in vitro* в суспензійних культурах рослинних клітин з різних лікарських рослин, а біореактори є ключовим етапом для їх комерційного виробництва та подальшого фітотерапевтичного застосування. Це все стало можливим за рахунок нещодавніх досягнень у виробництві деяких важливих рослинних фармацевтичних препаратів [2, 4].

Актуальність проєкту полягає в розробці і запровадженні конкурентоспроможної технології отримання вторинних метаболітів з лікарських рослинних культур в умовах *in vitro* у зв'язку з попитом на продукцію такого типу.

Метою роботи є розробка технології одержання гінзенозидів з суспензійної культури женьшеню *Panax ginseng* за використання біореакторів.

Для досягнення поставленої мети потрібно вирішити ряд **завдань**:

1. Провести огляд сучасних літературних джерел стосовно лікарських рослинних культур *in vitro* з точки зору можливості їх використання у якості сировини для одержання цільового продукту – вторинних метаболітів;
2. Обґрунтувати вибір раціональних умов та параметрів для технології культивування рослинної суспензійної культури женьшеню з подальшим отриманням гінзенозидів;

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

3. Розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва гінзенозидів з суспензійної культури женьшеню. Розрахувати матеріальний баланс процесу;

4. Здійснити технологічні розрахунки та вибір обладнання для одержання гінзенозидів. Навести характеристику обраного апарата. Розробити креслення виробничого біореактора;

5. Надати основні пропозиції з охорони праці, техніки безпеки та захисту довкілля при одержанні продукту.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ

1.1. Короткий літературний огляд методу культури *in vitro*

Культура *in vitro* - це метод альтернативний традиційному польовому вирощуванню рослин. Під терміном "культура *in vitro*" розуміють вирощування невеликих фрагментів органів рослин на синтетичних середовищах певного складу в стерильних умовах [5].

Перевагами даних тканинних та клітинних моделей у порівнянні зі звичайною рослиною є їх простота і можливість точної регуляції росту та розвитку, контролю метаболізму [2, 5].

Середовища містять відповідний набір макро- і мікроелементів, вітамінів, амінокислот (додаються за бажанням) і джерело вуглецю, найчастіше сахарозу [6]. Ріст і розвиток рослинних культур *in vitro* залежить від додавання до середовища регуляторів росту: ауксинів, цитокінінів тощо. Живильні середовища можуть бути рідкими або агаризованими на основі агару, агарози, герліту або альгінату. Було розроблено багато живильних середовищ, які дозволяють проводити культивування *in vitro* [6].

Культура *in vitro* - сучасний шлях отримання вторинних метаболітів рослин, які знайшли застосування як фармацевтичні препарати, ароматизатори та смакові добавки, барвники, харчові добавки та біопестициди. Є можливість відбирати рослини або клітинні лінії з високою продуктивністю метаболітів і збільшити виробництво біологічно активних сполук шляхом додаванням прекурсорів або еліситацією [2,6].

Оптимізація умов культивування може зменшити витрати на

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ступак А.			ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ		Літ.	Арк.
Конс..								12
Реценз.								84
Керівн.		Банникова М.О.					КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ	
Затверд.								

біофармацевтичне виробництво. Крім того, культури тканин дають можливість відбирати рослини із заданим фенотипом або генотипом, покращувати та отримувати нові сорти, вирощувати рослини, що не здатні розмножуватися за допомогою насіння, збереження видів, що перебувають під загрозою зникнення [2,6].

Слід зазначити, що культури *in vitro* можуть синтезувати нові сполуки ще не виявлені в рослинному світі. Літературні дані свідчать, що з культур *in vitro* було виділено 322 нові сполуки та визначено їх структуру. Більшість з них належать до терпеноїдів (100), алкалоїдів (72) та фенолів (144), які було виділено з суспензійних культур [7].

На рисунку 1.1 зображено різновиди рослинних культур, тканин та органів *in vitro*, що придатні до біотехнологічних досліджень і використання. У даній роботі надалі детальніше розглянуто калюсні та суспензійні культури.

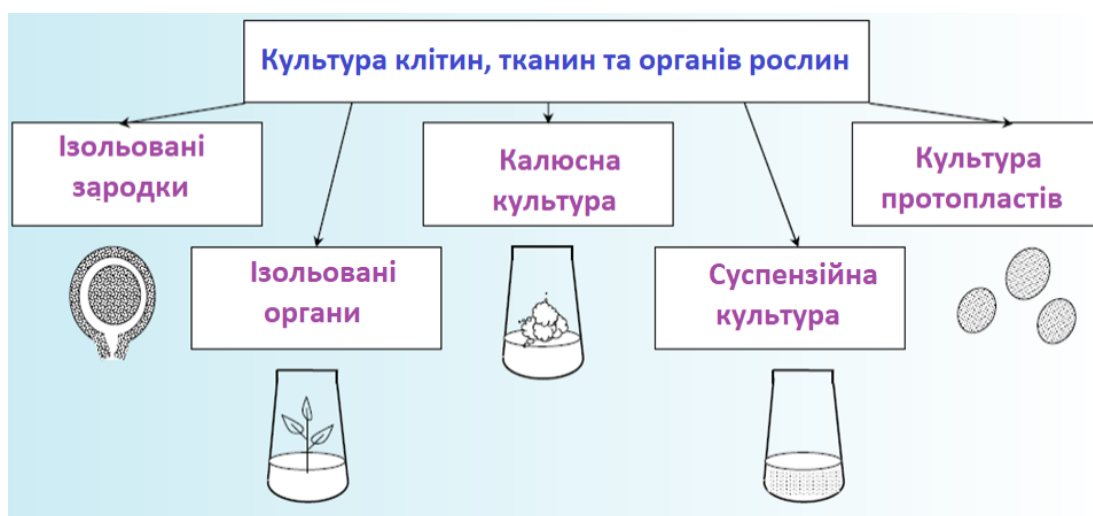


Рисунок 1.1. – Види рослинних культур *in vitro* [5].

1.1.1. Поняття калюсу

Калюсна тканина в умовах *in vivo* утворюється в результаті механічного пошкодження рослини, її утворення можуть індукувати мікроорганізми та комахи, що живляться рослиною. У культурі *in vitro* можна ініціювати утворення калюсу, використовуючи будь-який орган рослини, але деякі органи утворюють калюс легше за інші [8].

З деяких органів калюс утворюється легше порівняно з експлантами, взятими з іншої частини рослини. На експлантах при культивуванні на середовищах для калюсогенезу, що містять регулятори росту (ауксини та цитокіни), відбувається утворення первинного калюсу. Але для кожного виду рослин підбирається експлант, найбільш придатний для отримання калюсної культури [2, 9].

Для цього проводять дослідження з використанням різних органів рослин. Наприклад, використовують гіпокотилі та сім'ядолі отримані з молодих 7-денних стерильних проростків раувольфії [9]. Середовище для калюсогенезу також підбирають експериментально для кожного виду рослин, а також для кожного експланта. Ці середовища містять різні варіанти, комбінації та концентрації регуляторів росту [2, 9].

Вибір експлантів в основному залежить від мети дослідження. Найкращими експлантатами є тканини, відповідальні за проліферацію [5]. Для індукції калюсу не можна використовувати здерев'янілу тканину, стару тканину з низьким рівнем метаболізму, тканину зі слабкою проліферацією (м'якоть фрукта тощо), тканину з восковим покриттям. Для індукції первинного калюсу найкраще використовувати стерилізоване в асептичних умовах насіння [5].

Щоб утворився калюс *in vitro*, клітини експланту повинні дедиференціюватися, тобто втратити специфічні характеристики вихідної тканини. Відбувається перебудова клітин, вони втрачають ліпіди, крохмаль, білки. Інтенсивно синтезуються РНК і ДНК, починається експресія генів, притаманна клітинам калюсу. Загалом, при дедиференціації змінюється активність генів і білкового апарату клітин [10].

Калюсні культури зазвичай культивують на агаризованих середовищах і кожні три-шість тижнів переносять на свіже середовище. Під час культивування калюсна тканина може адаптуватися до росту на середовищах

без фітогормонів, це явище відоме як звикання. Первинний калюс поділяють на частини, які культивують окремо. Якщо розміри шматочків калюсу занадто малі, то зростання пригнічується [10].

Калюс - це гістологічно недиференційована і неорганізована тканина, клітини якої за сприятливих умов постійно діляться. Калюсна тканина, що вирощується поверхневим способом, є аморфною масою тонкостінних паренхімних клітин, що не має строго визначеної анатомічної структури. Калюс може бути білим, жовтим, зеленим та пігментованим повністю або зонально [11].

За загальноприйнятою класифікацією [11] калюси поділяють на:

- 1) пухкі, сильно оводнені, що легко розпадаються на окремі клітини;
- 2) середньощільні, із добре вираженими меристематичними зонами;
- 3) щільні, із зонами редукованого камбію та судин.

Це є наслідком міжклітинної адгезії і залежить від кількості, розміру і розподілу міжклітинних просторів. Колір калюсу може бути однорідним, білим, кремовим, жовтим, від світло- і темно-зелених до різних відтінків червоного і фіолетового (рис. 1.2). Калюсна тканина, що формується навіть у межах одного експланта, може демонструвати наявність ділянок різної структури та кольору [12].



Рисунок 1.2 – Калюсні тканини різного кольору [12].

Калюс є генетично нестабільною тканиною. В ній часто можуть відбуватися зміни як у кількості, так і структурі хромосом. Ці процеси інтенсифікуються з плином часу і старінням культури [12].

Калюсна тканина являє собою сукупність тотипотентних клітин, тому в ній можна викликати органогенез в результаті зміни співвідношення ауксинів і цитокінінів у середовищі [2]. Меристематичні осередки, що утворюються в калюсі, можуть давати початок кореням, пагонам, брунькам та соматичним зародкам. Калюсні культури часто використовують у дослідженнях клітинної диференціації та морфогенезу [2].

Калюсні культури використовують як сировину для отримання вторинних метаболітів рослин. При багаторічному культивуванні калюс може проявляти здатність до синтезу вторинних метаболітів на дуже високому рівні. Пухкий калюс є вихідним матеріалом для отримання клітинних суспензійних культур [2, 11].

Культура клітин вимагає стерильності культивованих експлантів, живильних середовищ, посуду, інструментів і лабораторного приміщення. Усі маніпуляції з ізолювання клітин, тканин, органів (експлантів) з інтактною рослини проводять у ламінарному боксі [13]. Перед роботою робочу поверхню боксу обробляють 96% розчином етилового спирту. Після цього розміщують необхідне для роботи приладдя, посудини для культивування із середовищем [13].

Стерилізують робочий об'єм ламінару ультрафіолетом протягом 20-30 хв за допомогою ртутно-кварцової лампи. Робочі інструменти обпалюють над полум'ям спиртівки і дають охолонути перед використанням [13]. Процес ізолювання рослинних експлантів, отримання первинного калюса і подальше його культивування вимагають стерильності, тому попередньо ретельно вимитий рослинний матеріал піддається поверхневій стерилізації засобами, що містять активний хлор (хлорамін, хлорне вапно) або діоксидом водню, етанолом [13].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Засоби стерилізації повинні ефективно знезаражувати грибні та бактеріальні спори на зовнішній поверхні рослинних об'єктів без ушкодження внутрішніх тканин та легко видалятися з тканини промиванням стерильною дистильованою водою або піддаватися розкладанню [13].

Після стерилізації та промиття дистиллятом ізолюють потрібні тканини та переносять їх на попередньо стерилізоване агаризоване живильне середовище [11].

Найбільш поширеним можна назвати середовище Мурасіге і Скуга. Мінеральна основа цього середовища була підібрана для калюсної тканини тютюну, що виникла на експланті - паренхімі стебла в середній його частині [13, 14].

Це середовище містить добре збалансований склад поживних речовин і відрізняється від інших співвідношенням амонійного та нітратного азоту. Воно зазнає різних модифікацій, що рідше стосується макро- і мікроелементів мінеральної основи і частіше стосується набору вітамінів, гормональних та інших регуляторних факторів. Середовище Мурасіге і Скуга добре підтримує неорганізований калюсний ріст і спричиняє індукцію морфогенезу в більшості дводольних [13,14].

Живильне середовище Гамборга і Евелега В5 (середовище В5) використовується під час культивування клітин і тканин бобових та злаків. Середовище Вайта, Шенка-Гільдебрандта слугує для вкорінення пагонів і росту стебла після регенерації. Напіврідке середовище Као і Михайлюка застосовується для культивування ізольованих клітин і протопластів [13,14].

Калюсну культуру з експлантів зрілих тканин кореня женьшеню ініціювали на середовищі Мурасіге і Скуга (MS), збагаченому 1 мг 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) на літр. На цьому середовищі калюс продукував численні ембріоїди, і коли їх пересаджували на напіврідке середовище MS або середовище В5, кожне з яких було доповнене 1 мг бензиламінопурину та 1 мг індолілоцтової кислоти/літр, відбувалася стрімка регенерація рослин [14].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

Темно-зеленуваті, компактні калюси спостерігалися на ділянках кореневої системи через 4 тижні після ініціації [14].

Калюси можна перенести на живильне середовище, подібне до середовища ініціації, за різницею у тому, що не додавати кінетин, а замість агару використовували гельрит. Спостерігається утворення пухкого жовтого калюсу через 2-3 тижні після перенесення [15, 16].

Цей калюс росте дуже повільно. Для прискорення росту калюсу 2,4-Д у живильному середовищі можна замінити на дикамбу. На середовищі з додаванням дикамби калюс не тільки росте швидше, але він також стає ембріогенним. Калюс підтримують в темряві понад 3 роки та субкультивують кожні 3 тижні [15, 16].

Дозрілі соматичні ембріони пасажують на середовищі MS, яке доповнене різними концентраціями бензиламінопурину, кінетину та індолілоцтової кислоти. Вирощування відбувається за температури 27 °C з фотоперіодом 16 год. При цьому досліджують вплив регуляторів росту на проростання соматичних зародків [11, 16].

1.1.2. Суспензійні культури

Використання суспензійних культур є більш швидким методом для промислового застосування і широкомасштабного виробництва вторинних метаболітів, ніж культура тканин і органів. Цей метод є найкращим і надійним джерелом для отримання натуральних продуктів. Добре відомо, що було докладено багато зусиль для комерційного одержання суспензійних культур [2,17].

Клітини, які культивуються в суспензії, можуть застосовуватись у якості мультиферментних систем, що здатні до різних типів біотрансформацій хімічних сполук (окисні та відновні реакції, реакції гідроксилування, метилювання, деметилювання, гліколізування, ізомеризації). Завдяки біотрансформації одержують специфічні біологічно активні речовини на основі синтетичних сполук чи проміжних метаболітів рослин інших видів [18].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

У суспензійних культурах збільшується кількість необхідних метаболітів, але через деякий час синтезуюча здатність знижується через недостатнє живлення або генетичні чинники. Тому відбір і збереження високопродуктивних клітинних ліній є дуже важливим для суспензійної культури [2].

Калюси генерують з відібраних материнських рослин у відповідному середовищі, що найкраще підходить для культивування. Таке середовище має забезпечувати процеси дедиференціації та диференціації. Отримані калюси субкультивують для розмноження, індукованого соматичного ембріогенезу або отримання суспензійної культури [11].

Для ініціації суспензійної культури пухку частину калюсу переносять у рідке середовище, при цьому підтримуються відповідні умови освітлення, температури, перемішування, аерації та інших фізіологічних параметрів. При цьому важливу роль відіграє структура калюсу і кількість так званої інокуляційної тканини. Перша методика створення суспензійних культур була описана Мюіром та ін. ще у 1954 році [19].

Для отримання досить однорідної суспензійної культури використовують різні методи. Різні спостереження показують, що ріст суспензійних культур залежить від складу середовищ, якості калюсу, генетичних варіацій тощо [2].

У роботі [20] вихідним матеріалом для ініціювання суспензійних культур слугували калюсні тканини *Mentha longifolia* та *M. piperita*, які характеризуються швидким наростанням біомаси та пухкою структурою. Для отримання суспензійних культур використовували калюс дев'ятого пасажу. Суспензійні культури вирощували на середовищі LS з тим же набором регуляторів росту, що і для калюсних тканин [20].

Калюсні грудки переносили у рідке середовище. Свіжу наважку калюсної тканини (0,3 - 0,4 г) переносили в 20 мл середовища в колбах Ерленмейєра об'ємом 100 мл (див. рис. 1.3) [20].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

Потім колби закривали кришками з алюмінієвої фольги. Суспензії підтримували при 25°C, 16-ти годинному фотоперіоді та при безперервному перемішуванні зі швидкістю 110 об/хв на шейкері [20].

Після початкового періоду культивування (3 тижні) суспензію відфільтровували, щоб гомогенізувати матеріал і отримати лише невеликі агрегати клітин, а також поодинокі клітини. Для отримання однорідної клітинної суспензії зазвичай використовують її фракціонування [20].



Рисунок 1.3 – Індукування клітинних суспензій з калюсу [20].

На розмір клітинних агрегатів впливають регулятори росту: висока концентрація ауксину відносно концентрації цитокінінів впливає на їх фрагментацію, але в той же час може бути перешкодою для продукування вторинних метаболітів [21].

Оскільки поглинання поживних речовин у суспензійних культурах полегшується, поділ клітин відбувається з більшою частотою, а приріст біомаси набагато більший, ніж у калюсних культурах. Характер росту кожної суспензійної культури має специфічний характер, схожий на експоненціальну криву і може бути розділений на наступні фази (рис.1.4): I - лаг-фаза (видимий ріст інокуляту майже непомітно; інтенсивність дихання, високі значення енергетичного рівня, інтенсивний синтез ДНК, РНК); II - експоненціальна фаза (бурхливий ріст клітин); III - фаза лінійного росту (ріст клітин постійний); IV - фаза уповільненого зростання (поділ клітин зменшується, інтенсивне накопичення біомаси); V - стаціонарна фаза (клітини починають гинути,

необхідно субкультивувати культуру); VI - фаза відмирання (за відсутності підтримування клітин в активному стані, у культурі відбуваються незворотні некротичні процеси) [22].

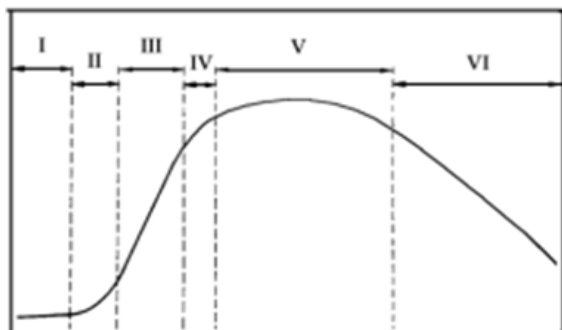


Рисунок 1.4. – Крива росту суспензійної культури [22].

Дана робота присвячена технології вирощування суспензійної культури лікарської рослини женьшеню *Panax ginseng* для отримання вторинних метаболітів з неї.

1.1.3 Вторинні метаболіти, що продукуються лікарськими рослинними культурами

Незважаючи на деякі недоліки, такі як накопичення побічних сполук за час культивування суспензійної культури, або соматональна мінливість рослини, культури *in vitro* дають змогу отримувати багато метаболітів, які часто характеризуються протівірусними, антибактеріальними, протираковими, протизапальними, седативними та імуномодулюючими властивостями [23].

У 1997 році було запропоновано метод, що дозволяє збільшити продукцію вторинних метаболітів у культурах *in vitro*, і він широко використовується дотепер. Його основними принципами є: фітохімічний скринінг рослин на вміст біологічно активних сполук, використання найкращого фенотипу для створення калюсних культур, біохімічне тестування отриманих калюсних культур, оцінка їх мінливості та продуктивності, отримання суспензійної культури з найкращої калюсної культури, аналіз

рівнів вторинних метаболітів у клітинній суспензії, селекція клітинних ліній на основі поодиноких клітин, аналіз стабільності культури та підвищення її продуктивності за допомогою різних методів: еліситація, додавання попередників метаболічних шляхів, іммобілізація [10, 23].

Багато рослинних метаболітів накопичуються у суспензійній культурі в набагато вищій концентрації, ніж у батьківських рослинах, включаючи аджмаліцин у культурах катарантусу, антрахінони в культурах моринди, берберин у жовтокореню, кавова кислота у ванілі, гінзенозиди у женьшеню, коензим Q у культурах махорки [20].

Вторинні метаболіти, отримані *in vitro*, є особливо цінною сировиною для фармацевтичної промисловості. Найбільший інтерес становлять речовини, що проявляють протиракову активність. До них належать алкалоїди: вінбластин і вінкристин, синтезовані в культурах катарантусу, таксол виділений з тисових культур, артемізинін, накопичений у культурах полину тощо [20, 24].

Значна увага також приділяється сполукам з антиоксидантними властивостями. Окиснювальний стрес є провідним чинником розвитку захворювань серцево-судинної системи, гіпертонії, нейродегенеративних захворювань, раку, артриту та процесу старіння [24].

Вторинні метаболіти також використовуються в косметичній та парфумерній промисловості, найпоширенішими з яких є сполуки з групи ефірних олій, сапоніни та рослинні пігменти. Їх використовують як інгредієнти в кремах для захисту від ультрафіолетового випромінювання, шампунів, фарб для повік і волосся [23].

1.1.4. Вплив різних чинників на вирощування культур і одержання цільових речовин

Метод отримання вторинних метаболітів в культурі *in vitro* - це багатоетапний процес, і на синтез бажаних сполук впливає велика кількість факторів. Загалом їх можна розділити на фактори, пов'язані з рослинним

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

матеріалом (генотип материнської рослини, джерело експланта, фізіологічна фаза клітин у культурі) та фактори, пов'язані з самою культурою, такі як соматональна мінливість в культурі та фізико-хімічні фактори культури (склад середовища: мінерали, джерело вуглецю, регулятори росту, прекурсори, еліситори, рН середовища, а також зовнішні умови, в яких проводиться культивування (світло, температура або аерація) [24].

Разом ці фактори формують комплекс взаємозв'язків, внаслідок чого оптимальні умови біосинтезу біологічно активних сполук визначають експериментально для кожного виду культури. Тестування на вміст вторинних метаболітів у популяції певного виду та відбір матеріалу, найбагатшого на ці сполуки, є першим кроком [24].

Генетичний потенціал рослини є найважливішим фактором, що визначає профіль сполук, які вона синтезує; фактори навколишнього середовища можуть лише модифікувати експресію цих генів [25].

У багатьох випадках спостерігається позитивна кореляція між високим вмістом біологічно активних сполук у материнській рослині та культурах *in vitro*, отриманих з неї [2].

У культурах *in vitro* генетична та епігенетична мінливість є поширеними явищами. Одним із джерел мінливості є відмінності в тканинах експланта, введеного в культуру (вік, тип тканини). Апікальні меристеми містять лише диплоїдні клітини, тоді як зрілі та диференційовані тканини характеризуються хромосомними змінами в клітинах внаслідок ендоредуплікації [2, 11].

Моніторинг вмісту біологічно активних сполук у культурах *in vitro* можливий за допомогою найпростішого методу - ТШХ (тонкошарова рідинна хроматографія), а також ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія) і ГХ (газова хроматографія) [26].

Склад і пропорції мікро- та макроелементів у живильному середовищі важливі для метаболізму клітин. Клітинні поділи, що забезпечують ріст біомаси, та синтез вторинних метаболітів, як правило, тісно пов'язані

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

один з одним [2, 20].

Середовища, що сприяють швидкому зростанню біомаси (з високим вмістом нітратів, амонію та фосфатів) не сприяють біосинтезу вторинних метаболітів, а їх утворення стимулюється виснаженням цих компонентів у середовищі [27].

Живильні середовища типу MS (середовище Мурасіге-Скуга) [27], LS (середовище Лінсмайєра і Скуга) [27], B5 (середовище Гамборга) [27] містять іони NO_3^- та NH_4^+ як джерела азоту. Було показано, що пропорції цих іонів по відношенню один до одного, а також загальна концентрація азоту в середовищі впливають на продукцію вторинних метаболітів у культурах *in vitro* [27, 28].

Зменшення рівня іонів амонію та одночасне підвищення концентрації нітрат-іонів стимулювали продукцію шиконінів у суспензійних культурах горобейнику. Підвищення концентрації іонів амонію порівняно з нітратними іонами, однак, стимулювало продукцію берберину в клітинних суспензіях рутвиці, а також коензиму Q в культурах тютюну [27, 28].

Істотний вплив на одержання біологічно активних сполук має тип джерела вуглецю та його вміст у живильному середовищі. Сахароза і глюкоза в концентраціях 2 - 4% є найпоширенішими. Як додаткові іноді використовують фруктозу, галактозу та мальтозу. Збільшення концентрації сахарози в середовищі має такі ефекти: збільшення накопичення алкалоїдів у клітинних суспензіях голаренни та продукування розмаринової кислоти в культурах воловику [10, 28].

Було також вивчено вплив початкової концентрації сахарози (20, 30, 40 або 60 г/л) на продуктивність клітинної суспензії *Panax notoginseng* (женьшень). Найбільше накопичення сапонінів, а також полісахаридів було зафіксовано, коли концентрація цукру становила 40 г/л [10, 28].

В основному на утворення вторинних метаболітів у культурах *in vitro* впливають гормони, ауксини та цитокініни. Ці сполуки регулюють

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

поділ і диференціацію клітин, а також взаємодіють з ферментами різних метаболічних шляхів. Загалом, висока концентрація ауксину 2,4-Д в живильному середовищі зменшує накопичення біологічно активних сполук у клітинах, водночас ця сполука дуже ефективно стимулює індукцію калюсної тканини, а також ріст біомаси [2, 29].

Із зовнішніх факторів на біосинтез вторинних метаболітів у культурах *in vitro* має вплив світло, причому важливу роль відіграє не тільки його якість та інтенсивність, але й тривалість фотоперіоду. Наявність освітлення особливо важлива у синтезі вторинних метаболітів, де задіяні фотозалежні ферменти, такі як P_{AL} (фенілаланіно-аміаколіз), який бере участь у біосинтезі цінамонових кислот, флавоноїдів або антоціанів [20, 29].

Стимулюючий вплив світла на продукування антоціанів було продемонстровано на культурах звичайної моркви. З іншого боку, усунення світла збільшувало накопичення монотерпенів в калюсних культурах цитрусових [29].

Окрім світла, на продукування вторинних метаболітів суттєво впливає температура. У більшості випадків оптимальна температура для біосинтезу вторинних метаболітів становить 17 - 27°C, що збігається з температурою, оптимальною для росту клітин. Зниження температури культивування культур катарантусу з 27 до 16°C призводило до 12-кратного збільшення накопичення алкалоїдів, зниження температури також збільшувало продукування жирних кислот у суспензійних культурах цього виду [24, 30].

Зниження температури з 27 до 10°C протягом 6 год збільшувало накопичення ефірної олії в культурах перцевої м'яти. Підвищення температури з 24 до 32°C, з іншого боку, збільшувало синтез коензиму Q у клітинних суспензіях тютюну [24, 30].

Значення рН середовища також впливає на біосинтез вторинних метаболітів, оптимальні значення для росту клітин знаходяться в діапазоні 5,5 - 6,0. рН впливає на поглинання поживних речовин із середовища, а також на

виділення синтезованих сполук клітинами в середовище. Концентрація водневих іонів у середовищі змінюється залежно від тривалості культивування [31].

У великомасштабному виробництві вторинних метаболітів, крім того, важливим є метод перемішування та аерації культури. Збільшення накопичення сапонінів у клітинних суспензіях женьшеню *Panax*, що культивуються в біореакторі, було досягнуто за рахунок збільшення кількості кисню [31].

1.1.5. Сировина в Україні

Україна є виробником сировини лікарських рослин, зокрема для одержання вторинних метаболітів. Ці рослини використовуються на всіх етапах виготовлення фармацевтичних препаратів в Україні та експортуються до різних країн світу [32].

Основні види культур, які використовуються в Україні для одержання вторинних метаболітів, включають горицвіт, календулу, шавлію, подорожник, м'яту, звіробій, чагарник, ехінацею, обліпиху. Виробники та експортери сировини лікарських рослин в Україні - фірми ТОВ «Шльосем Україна» АТ «Галичфарм», ПП «Добротрав», ПрАТ «Віола» та інші [32].

За даними Державної служби статистики України, загальний обсяг експорту лікарських рослин в Україні в 2019 році зріс на 35% у порівнянні з попереднім роком і становив близько 6000 тонн. В Україні діє багато малих підприємств, які займаються вирощуванням лікарських рослин на невеликих ділянках землі, але ці дані не враховуються у загальному обсязі виробництва [33, 34].

Україна має великий потенціал у вирощуванні лікарських рослин, що становить важливий ресурс для розвитку фармацевтичної та косметичної промисловості країни. Проте, проведення подальших наукових досліджень та розвиток вирощування лікарських рослин засобами біотехнології може значно підвищити обсяги та рівень виробництва сировини для отримання корисних вторинних метаболітів [33, 34].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						26
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Сучасним напрямком біологічної науки — клітинній біології та біотехнології вдалося знайти шляхи вирішення цієї проблеми. За допомогою вирощування клітин, тканин та органів рослин в умовах *in vitro* на живильних середовищах, можна отримувати рослинну біомасу у значній кількості. Вона може використовуватись як лікарська сировина через свою екологічність, а саме відсутність забруднення хімічними добривами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо [2].

На жаль, Україна не має власної природної сировини таких популярних закордоном у використанні лікарських рослинних культур, як женьшень (принаймні у промислових масштабах). Спроби вирощувати цілі рослини не поширені у виробництві. Україна щороку закуповує різні продукти з екстрактом женьшеню на 2,8 млн доларів. Необхідно надалі шукати можливості забезпечення населення вітчизняною продукцією та збереження економічних резервів [32].

У кінці 1970-х років в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України розпочались дослідження з метою створення клітинних штамів, що могли б виробляти лікарську сировину. Відділ генетики клітинних популяцій зумів створити унікальні високопродуктивні штами різних лікарських рослин, серед яких женьшень, родіола рожева, елеутерокок та інших [2].

Нині розробляються технології, які дозволяють отримувати лікарські препарати з рослин, які не зростають в Україні, але мають велике значення для медицини [2].

1.2. Обґрунтування технології

Великомасштабне одержання вторинних метаболітів у культурах *in vitro* - це процес цілком здійснений. Однак важливим аспектом є економічна ефективність біотехнологічного виробництва біологічно активних сполук.

Були зроблені спроби оцінити економічну ефективність синтезу одразу для кількох сполук, але економічна доцільність процесу виявилася недостатньою для початку виробництва. Удосконалення та розробка нових

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

технологій виробництва вторинних метаболітів з культивованих *in vitro* калюсних або суспензійних культур дасть змогу завоювати більшу частку ринку в майбутньому [31].

Дана робота передбачає розробку технології одержання вторинних метаболітів із біомаси лікарської рослини – женьшеню. А саме, пропонується отримувати гінзенозиди (вид глікозидів) із суспензійної культури женьшеню роду *Panax*.

Відбувається процес вирощування суспензійної культури у біореакторі об'ємом 80 м³ при механічному перемішуванні мішалкою, що підвищує вихід цільового продукту в 1,3-1,5 рази, та аерацією середовища.

Вихідна калюсна маса, вирощена на агаризованому середовищі, за допомогою качалок перетворюється у суспензійну культуру, що направляється до інокулятора з простерилізованим в автоклаві живильним середовищем, яке необхідно попередньо підібрати [5].

Типові етапи обраної технології зображені на рис. 1.5.

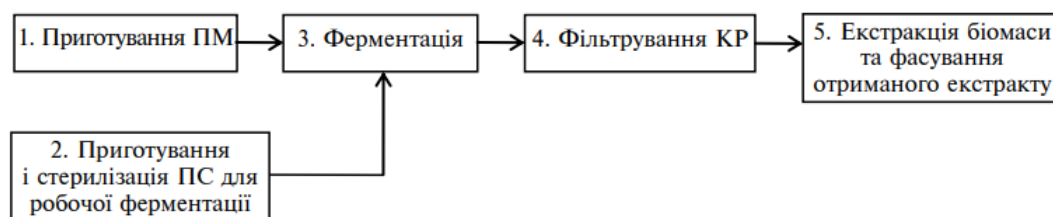


Рисунок 1.5. – Типові технологічні стадії отримання продукту. ПМ – посівний матеріал; ПС – поживне середовище (для культури рослинних експлантів у даній роботі живильне); КР – культуральна рідина [35].

Для отримання високоякісного продукту в суспензійній культурі женьшеню необхідно створити живильне середовище (ЖС), що містить всі необхідні компоненти для росту і розвитку рослини. Середовище стерилізується автоклавуванням за температури 130 °С і тиску 0,1 МПа протягом 30 хв [36].

Основними компонентами живильного середовища для суспензійної культури женьшеню є макро- та мікроелементи (у вигляді мінеральних солей);

вітаміни та/або амінокислоти, вуглеводи (глюкоза або сахароза); вода та фітогормони (ауксини, цитокініни). Зазвичай використовують такі ауксини: 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д), α -нафтилоцтову кислоту (НОК), індолілмасляну кислоту (ІМК), індолілоцтову кислоту (ІОК) та цитокініни: кінетин, зеатин, 6-бензиламинопурин (БАП) [11].

У таблиці 1.1 наведені компоненти типових ЖС, що використовуються для вирощування рослинних культур *in vitro*.

Таблиця 1.1. – Типові ЖС для рослинних культур, що вирощуються *in vitro* [5].

Компонент середовища	Концентрація поживних середовищ, мг/л			
	Мурасіге і Скуга, 1962	Гамборга і Евелєга, 1968	Уайта, 1939	Нича і Нич, 1974-1975
KNO ₃	1900	3000	81	950
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	720
Ca (NO ₃) ₂	-	-	142	-
Ca (NO ₃) ₂ · H ₂ O	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	500	74	185
CaCl ₂ · H ₂ O	-	-	-	166
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440	150	-	-
CaCl	-	-	65	-
KH ₂ PO ₄	170	-	12	68
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	-	150	-	-
MnSO ₄ · H ₂ O	-	10	-	-
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3	-	-	25
ZnSO ₄ · 4 H ₂ O	8,6	-	-	-
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	-	2	-	10
H ₃ BO ₄	6,2	3	-	10
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	0,075	-	0,025
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	-	0,25
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	-	-	-
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8	-	-	2
Na EDTA · 2 H ₂ O	37,3	-	-	3
Секвестрен 330-Fe	-	28	-	-
Мезоинозит	100	-	-	200
Аскорбиновая кислота	-	-	-	3
Тиамин-НСІ	0,5	-	-	3
Пиридоксин-НСІ	0,5	-	-	1
Никотиновая кислота	0,5	-	-	-
Сахароза	30 000	20 000	2000	60 000
Агар «Дифко», гельрит, агароза	-	-	-	7000

Для даної роботи взято за основу середовище Мурасіге-Скуга з додаванням мінеральних солей, тіаміну, піридоксину та ін. Рекомендується також додати фітогормони, наприклад, ауксин (ІОК).

Необхідно провести попередню інокуляцію суспензійної культури задля максимізації кількості відокремлених рослинних клітин, що не злипаються між собою, забезпечення однорідності матеріалу, зменшення часу власне виробничого культивування у біореакторі і, відповідно, затрат на цей процес, збільшення накопичення біомаси та підвищення якості культури [5, 36].

Для культивування без освітлення суспензійної культури женьшеню *Panax ginseng* у біореакторі [2, 37], що триває близько 430 год, мають бути дотримані наступні технологічні параметри:

- Температура культивування суспензії женьшеню зазвичай становить 20-28°C, найбільш оптимальною є 26-28°C.
- рН: допустимий діапазон рН для культивування суспензії женьшеню зазвичай становить 5.5-6.5 (оптимальний 5.5-6.0). Його можна контролювати та регулювати за допомогою лугів або кислот.
- Частота обертання мішалки: повинна бути достатньою для забезпечення рівномірного перемішування суспензії. Значення в межах 100-180 об/хв, проте найбільш доцільне буде значення 160 обертів за хвилину.
- Аерація: необхідно забезпечити культуру достатньою кількістю кисню. Біореактор обладнаний барботером. Швидкість потоку повітря може становити 0,5-1,5 л/хв. Інтенсивність барботування 70 кг/год. Рівень розчиненого кисню для культивування суспензійної культури женьшеню становить 20-30% від насичення [37].

Для порівняння, параметри культивування суспензійної культури раувольфії дуже схожі, проте дещо більш обмежені в інтервалах: рН 5,5-6,5; температура: 24-28°C; частота перемішування: 60-100 об/хв; рівень аерації повітрям 0,5-1,5 л/хв [38].

Після культивування у біореакторі необхідно відділити нарощену біомасу від культуральної рідини. Це можна зробити за допомогою направлення культуральної суспензії до гомогенізатора високого тиску і фільтр-пресу, після цього провести ліофілізацію [35].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

Для екстракції гінзенозидів з фільтрату можна використовувати різні органічні розчинники, зокрема етанол, метанол, ацетон тощо. У більшості випадків для екстракції гінзенозидів з біомаси суспензійної культури женьшеню використовують етанол або метанол, оскільки вони мають високу розчинність для гінзенозидів, є дешевими. Для даної технології у ролі екстрагента обрано етанол [5].

Етап екстракції зазвичай передбачає змішування біомаси з відповідним розчинником та настоювання протягом певного часу за оптимальних умов, в даному випадку, за температури 65-70°C протягом 3-4 годин. Після екстракції отриману рідину направляють до сепаратору для видалення домішок [5].

Основні відходи виробництва при використанні даної технології: виснажена біомаса після культивування, фільтрування та екстракції, власне культуральна рідина, відпрацьований розчинник, а також вода і конденсати. Зазвичай знешкоджуються і використовуються як добрива чи утилізуються на полігонах, або ж направляються на очищення та регенерацію (вода) [35].

1.3. Характеристика біологічного агента

Біологічним агентом для вирощування суспензійної культури є калюс женьшеню *Panax ginseng*.

Женьшень належить до аралієвих, магнолієвих, дводольних насіннєвих рослин (покритонасінних). Систематичне положення женьшеню роду *Panax* виду *ginseng* - належить до родини *Araliaceae*, порядку *Apiales*, класу *Magnoliopsida* [39].

У роду *Panax* налічується близько 11 видів, з яких *Panax ginseng* є найбільш відомим видом. Ця рослина є вічнозеленим чагарником, що росте в Східній Азії та Північній Америці [39].

Женьшень має довгу історію використання в традиційній медицині. Ця рослина містить різні біологічно активні речовини (БАР), включаючи гінзенозиди, полісахариди, фенольні кислоти, алкалоїди тощо. Він використовується у медичних цілях, таких як зменшення стресу, підвищення

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

фізичної витривалості та покращення когнітивних функцій імунної системи [2].

Сучасна медицина відносить женьшень до засобів неспецифічної дії, тобто до адаптогенів. Лікарською формою є настойка женьшеню. Застосовують також порошок та таблетки. Настойка, сухий та рідкий екстракти входять до складу комплексних вітчизняних та імпортованих ліків тонізуючої дії, деяких тонізуючих напоїв, застосовується в косметичній промисловості тощо [2].

Цитологічно женьшень, як і більшість рослин, має 2 набори хромосом. Число хромосом у женьшеню $2n = 48$. Крім того, женьшень має мікроструктури, гінзенозиди, що містяться в коренях цієї рослини, мають унікальну морфологію. Наприклад, гінзенозид Rg1 є сферичним, гінзенозид Rb1 має форму пластини, а гінзенозид Rd має форму кристала з різними геометричними структурами [2, 40].

Женьшень є автотрофною рослиною, здатною до фотосинтезу, яка отримує необхідні поживні речовини з ґрунту. Вегетативна система цього виду є мікоризною, тобто рослини вступають у симбіоз з грибами, щоб одержати необхідні поживні речовини [39].

Калюсна культура *Panax ginseng* є тканиною пухкою за консистенцією салатого або коричневого кольору, запах відсутній. Вміст сухої речовини $5 \pm 1,5\%$. Відсоток живих клітин під час середини фази експоненційного росту 90-93% [14].

Женьшень - це рослина вимоглива до умов вирощування і вимагає підбору оптимального живильного середовища, до складу якого входять необхідні мікроелементи, підтримування температури і вологості.

Найважливішими з елементів живлення є вуглець (C), азот (N) і фосфор (P). Джерелами вуглецю для синтезу органічних сполук, необхідних для росту і розвитку культури женьшеню *Panax* є глюкоза, сахароза, іноді органічні кислоти [41].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Джерелами азоту, який потребує культура в першу чергу для синтезу білків та інших сполук, можуть бути нітрати, амінокислоти чи аміді [41].

Для синтезу нуклеїнових кислот і фосфоліпідів рослина потребує фосфатів [41].

Надзвичайно важливими для вирощування женьшеню *Panax* є мінеральні елементи та вітаміни, тому використовують солі на основі калію, магнію, заліза, кальцію, міді, бору, а також вітаміни групи В та аскорбінову кислоту [2, 41].

Для культури *in vitro* середовище має містити вуглеводневу основу, мінеральні солі, фітогормони, вітаміни. Оптимальний рН становить від 5,5 до 6,0; температура повинна бути в межах 20-28 °С [41].

Женьшень може бути дуже чутливим до дефіциту кисню під час культивування *in vitro* калюсу або суспензійної культури. Зі зниженням рівня кисню ріст і морфогенетичний потенціал калюсу знижується [40].

Проте, для уникнення негативних наслідків, вирощування може включати використання спеціалізованого аераційного обладнання, елементів додаткової вентиляції або навіть використання реагентів, що сприяють функціонуванню дихального ланцюгу рослини. Даний вид може акумулювати глікозиди та інші біохімічні сполуки, які є ефективними антиоксидантами і запобігають руйнуванню клітинних структур у разі гіпоксії [40].

Культивування *in vitro* шляхом соматичного ембріогенезу зазвичай використовується для отримання рослин-регенерантів з калюсу або суспензійних культур *Panax ginseng*. Соматичний ембріогенез можна використовувати для отримання великої кількості регенерантів за короткий проміжок часу та підтримки сталості генетичного матеріалу рослин [42].

Надлишок біомаси женьшеню у промисловому виробництві можна використати у іншій галузі, наприклад у розробці дієтичних добавок на основі женьшеню. Також його можна направити для виробництва добрив чи певних рослинних агрохімікатів [34].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

Більш сучасні методи утилізації можуть включати переробку у біопаливо або компостування. Вибір оптимального шляху використання біомаси перш за все має враховувати технічну ефективність, вартість та вплив на довкілля [34].

Висновки до розділу 1.

1. Проведено літературний огляд стосовно культивування рослинних культур *in vitro*: індукування калюсних тканин та фактори їх росту, зокрема утворення пухкого калюсу женьшеню для подальшого одержання суспензійних культур. Наведено основні види та особливості живильних середовищ, з яких детальніше розглянуто найбільш оптимальне - середовище Мурасіге – Скуга. Описано різновиди вторинних метаболітів, що можна одержати з лікарських рослин в умовах *in vitro*. Зазначено чинники, що впливають на вирощування культур і одержання цільових речовин: склад живильного середовища і наявність фітогормонів у ньому, температура, рН, освітленість, аерація, перемішування тощо. Наведено відомості про стан накопичення сировини женьшеню та виробництва продукту в Україні.

2. Наведено та обґрунтовано основні стадії та параметри технології виробництва, що використовується в даному проєкті. Основні її етапи: приготування живильного середовища, приготування первинної суспензійної культури, культивування у біореакторі, відділення біомаси від культуральної рідини, ліофілізація, екстракція продукту. Параметри культивування: температура 26-28°C; рН 5,5 – 6,0; інтенсивність барботування 70 кг/год; частота перемішування 160 об/хв.

3. Охарактеризовано біологічний об'єкт – продуцент, а саме женьшень *Panax ginseng*. Наведено систематичну класифікацію, фармакологічне значення, морфологічні та культуральні властивості рослинної культури.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

2.1. Біосинтез гінзенозидів

У процесі культивування суспензійної культури женьшеню *in vitro* у біореакторі відбуваються метаболічні процеси, в результаті чого синтезуються такі цільові речовини, як гінзенозиди. Гінзенозиди є глікозидами специфічних дамаранових сапонінів, які утворюються в рослині шляхом глікозилування аглікону за допомогою глюкози. Після утворення вони транспортуються до клітинних вакуоль, де і накопичуються [43].

За структурою гінзенозиди є 4-х кільцевими стероїдоподібними сполуками. З кожним гінзенозидом пов'язані щонайменше 2 або 3 гідроксильні групи в положеннях С-3 і -20 або в положеннях С-3, -6 і -20, відповідно [44]. Гінзенозиди поділяються на три групи на основі їх агліконів: пентациклічний тритерпеноїдний сапонін олеанового типу (Ro), сапоніни типу протопанаксادیолу (PPD) та сапоніни типу протопанаксатріолу (PPT). Сапоніни типу PPD і PPT - тетрациклічні тритерпеноїди типу дамарану, які є основними типами гінзенозидів. На сьогоднішній день з різних видів *Panax* виділено понад 180 гінзенозидів [44].

Відомі протопанаксادیоли включають Rb1, Rb2, Rg3, Rh2 і Rh3, протопанаксатріоли – Rg1, Rg2 і Rh1. На рис. 2.1. зображено хімічну структуру гінзенозиду Rg1 [44].

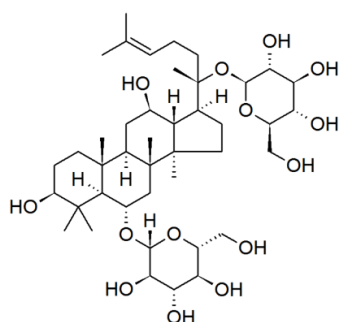


Рисунок 2.1 – Хімічна структура гінзенозиду Rg1 [44].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ступак А.				БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Конс..							35	84
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.	Банникова М.О.							
Затверд.								

скваленоксидаза (SQE), синтаза даммарендіолу-II (DS), β -аміринсинтаза (AS), цитохром P450 (CYP450) та УДФ-глікозилтрансфераза (UGT) [46].

Цитохроми P450 (CYP450), надродина монооксигеназ, відіграють важливу роль у біосинтезі вторинних метаболітів рослин. Специфічні CYP450 беруть участь у реакціях окислення та гідроксилювання в біосинтезі гінзенозиду. Декілька CYP450-кандидатів, які можуть бути залучені до біосинтезу гінзенозиду, було виявлено завдяки поєднанню технології секвенування наступного покоління та біоінформаційного аналізу [47].

Виділено дев'ять передбачуваних повних послідовностей CYP450 з бібліотеки EST придаткових коренів *P. ginseng*, індукованих метилжасмонатом. Серед цих генів продукт гена CYP716A47 був обраний як передбачувана PPD-синтаза, оскільки цей ген транскрипційно активувався не лише за обробки метилжасмонатом, але й у трансгенних женьшенях, які надмірно експресували скваленсинтазу та надмірно продукували гінзенозиди [48].

Транскриптоми *P. ginseng* проаналізували та ідентифікували 133 гени CYP450 за допомогою технології секвенування, що заклало важливий фундамент для подальшого скринінгу CYP450, що беруть участь у біосинтезі гінзенозидів [49].

УДФ-глікозилтрансферази (UGT) каталізують реакцію глікозилювання, яка є завершальним етапом біосинтезу гінзенозидів. UGT переносять глікозильні залишки з активованих цукрів на аглікони гінзенозидів, регулюючи таким чином їх властивості, такі як біологічна активність, розчинність та стабільність. Глікозилювання також визначає різноманітність цих метаболітів [50].

UGT існують в рослинах як сімейство генів з високою специфічністю. UGT відрізняються різними глікозильними групами, що переносяться, або різними акцепторами глікозильної групи [51].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

За останні кілька років було досягнуто значних успіхів у вивченні UGT, які беруть участь у біосинтезі гінзенозидів. Декілька UGT були клоновані та функціонально ідентифіковані з видів *Panax* [51].

Відомо, що біосинтез вторинних метаболітів рослин контролюється складними регуляторними шляхами, в яких важливу роль відіграють такі регулятори, як фактори транскрипції (TF) і некодуючі РНК (нкРНК) [52]. Таким чином, вивчення регуляторів біосинтезу гінзенозидів необхідне для розшифрування закономірностей накопичення цих сполук в культурах *in vitro* женьшеню. Повідомлялося, що деякі TF і нкРНК можуть стимулюватися біотичними та абіотичними сигналами і брати участь у регуляції біосинтезу гінзенозидів [52].

Накопичення гінзенозидів в рослинних клітинах стимулюється біотичними та абіотичними еліситорами. Для покращення біосинтезу було досліджено еліситацію різними речовинами, які називаються еліситорами [53].

Еліситори індукують захисні реакції у рослин і з'являються при патологіях після взаємодії патогену і рослини внаслідок взаємного впливу ферментів. Різні речовини, такі як CuSO_4 , солі ванадію, хлорид натрію, оксид азоту, олігогалактуронова кислота, хітозан, поліненасичені жирні кислоти, а також такі сполуки як жасмонова кислота та її похідні були ефективні для посилення виробництва гінзенозидів у культивованих клітинах женьшеню або придаткових коренях [53].

Загалом для отримання вторинних метаболітів із суспензійної культури женьшеню *Panax ginseng* генна інженерія може допомогти наступними способами: застосування більш дієвих генів, що кодують ферменти, для покращення вибіркової субстрату, швидкості перетворення субстрату в продукт та загального виходу гінзенозидів; інактивація генів, які кодують непотрібні ферменти, що гальмують процес і зменшують вихід продукту; дослідження експресії генів в період культивування; мутагенез та селекція штамів [54].

Трансгенний метод є ще одним ефективним способом покращення продукування гінзенозидів у рослинних культурах. *HMGR*, *SS* і *FPS* - три найбільш часто використовувані функціональні гени в трансгенних клітинах і тканинах женьшеню. Надекспресія генів *PnHMGR* і *PnSS* збільшувала загальний титр гінзенозидів приблизно до 60 мг/г, що приблизно у 2 і 3 рази вище, ніж у контролі [54].

Селекційна робота із штамми женьшеню *Panax ginseng* ведеться зазвичай за допомогою досліджень впливу різних факторів росту, якісного і кількісного складу живильного середовища, освітлення, іонізуючого чи радіаційного опромінення [14].

У 1986 році у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології генетики НАН України було отримано новий клітинний штам женьшеню БІО-2МК. Цей штам характеризується хорошими ростовими характеристиками та порівняно високим рівнем накопичення глікозидів [2].

Штам БІО-2МК добре адаптується до зміни умов вирощування, зокрема, суспензійні клітини можливо переводити на поверхневе культивування і навпаки. Оскільки якісний та кількісний склад гінзенозидів у біомасі змінюється залежно від культивування на різних середовищах, можна регулювати склад глікозидів у біомасі та наближати їх вміст до показників кореня або надземних органів природної рослини [2].

Поліплоїдизація клітинних культур женьшеню зазвичай призводить до збільшення інтенсивності росту та в результаті до підвищеного виходу біомаси. Проте вищий рівень синтезу глікозидів та, особливо, тритерпенових глікозидів дамаранового ряду, характерний для клітинних культур, що є близькими цитогенетично до інтактних рослин женьшеню [14].

2.2. Характеристика кінцевого продукту

Кінцевим продуктом виробництва є рідкий екстракт гінзенозидів, виділених з біомаси суспензійної культури женьшеню, що відправляється на розлив у промислові флакони по 100 – 500 мл.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Біомаса женьшеню, що використовується для виробництва, має відповідати чинній нормативній документації, зокрема «ДСТУ 7410:2013. Корінь женьшеню культивованій свіжій. Технічні умови» [55].

Вміст глікозидів в кінцевому продукті, визначений гравіметричним методом, становить близько 10%, не може бути менше 1,5%. Вологість не більше 8%; вміст золи загальної не більше 13% [43].

Зазвичай екстракт гінзенозидів виглядає як прозорий або слабко жовтуватий розчин без видимих домішок. Запах невиражений, специфічний. Смак солонувато-гіркий. Екстракти можуть бути замороженими або у вигляді сухого порошку для зберігання та транспортування [43].

Для якісного визначення рослинної біомаси застосовують реакцію на крохмаль з розчином Люголя. Зразок перед ідентифікацією попередньо витримують у воді протягом 15 хв. Мікроскопічно помітні скупчення червоних і темно-фіолетових набряклих зерен крохмалю. Проте, на практиці рослинну біомасу перевіряють зазвичай за допомогою хроматографічних методів, а саме хроматографічного визначення спиртового розчину суміші тритерпенових глікозидів [43].

Кількісне визначення проходить в тонкому шарі сорбенту на пластинках в системі н-бутанол-95%/етанол/концентрований аміачний розчин (співвідношення 9:2:5). Хроматограми просушують та проявляють 5%-им розчином сульфатної кислоти. При нагріванні гарячим повітрям на хроматограмі фіксують появу не менше 4-х плям від світло-рожевого до фіолетового кольору в області $R_f = 0,26 \pm 0,43$ (тритерпенові глікозиди) [43].

Препарат на основі екстракту гінзенозидів володіє адаптогенною дією, тобто має здатність підвищувати стійкість організму до впливу негативних факторів, які спричиняють фізичний та психологічний стрес, тож можуть використовуватися для зменшення втоми, стресу, підвищення працездатності [56].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Гінзенозиди є потужними антиоксидантами, тому екстракт гінзенозидів женьшеню захищає організм від дії вільних радикалів. Глікозиди женьшеню зменшують поглинання полісахаридів, прискорюють синтез глікогену з глюкози, знижують рівень цукру в крові до норми [56].

Дані метаболіти стимулюють кровотворення, приблизно вдвічі посилюють біосинтез нуклеїнових кислот, білків і жирів в кістковому мозку. Проявляють радіозахисну дію, тобто стимулюють стійкість до іонізуючого випромінювання [57].

Перешкоджають високій концентрації холестерину в крові, їх рекомендують при атеросклерозі. Посилюють скорочувальну здатність серця, нормалізують тиск. Дослідники вважають гінзенозиди засобом, що збуджує центральну нервову систему і перевершує в цьому фенамін, але у помірних дозах женьшень не збуджує, а має седативну дію [57].

Препарати на основі глікозидів женьшеню нетоксичні і нешкідливі по своїй суті. З медичної точки зору протипоказань немає, проте не рекомендовано вживання при гіпертонії [57].

Згідно з українським законодавством, на етикетці рідкого екстракту гінзенозидів женьшеню повинно бути зазначене наступне:

1. Назва продукту;
2. Номер партії;
3. Дата виготовлення та термін придатності до вживання;
4. Точний склад продукту;
5. Обсяг продукту;
6. Умови зберігання;
7. Найменування виробника та адреса;
8. Інформація про сертифікат відповідності.

Висновки до розділу 2.

1. Наведено загальні відомості про біосинтез глікозидів женьшеню – гінзенозидів; описано основні сполуки, що беруть участь у метаболізмі,

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						41
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

регулятори відповідних процесів. Окремо розглянуто поняття та приклади еліситорів, що стимулюють накопичення цільових речовин.

2. Проаналізовано роль генної інженерії та можливості її застосування для оптимізації технології вирощування культур женьшеню *in vitro*.

3. Охарактеризовано кінцевий продукт виробництва, а саме його склад, зовнішній вигляд, якісні та кількісні показники, фармакологічну дію, умову реалізації в Україні. Вміст гінзенозидів у рідкому екстракті женьшеню становить 1,5-10%.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1. Сировина і матеріали

При одержанні вторинних метаболітів із суспензійної культури женьшеню використовується основна і допоміжна сировина та утворюються напівпродукти (табл.3.1). До основної сировини відноситься вихідна біомаса женьшеню (первинна суспензія) та живильне середовище, допоміжною є вода та хімічні реагенти. Всі види сировини вкрай важливі для проведення процесу культивування та подальшої екстракції.

До напівпродуктів, що утворюються при застосуванні даної технології, відносять відпрацьоване живильне середовище та виснажену біомасу рослинної культури.

Таблиця 3.1. – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД для перевірки сировини	Показники, що нормуються	Примітка
1. Основна сировина			
1.1. Біомаса женьшеню	Згідно технічного регламенту	Згідно технологічного процесу	Культивування для подальшого одержання гінзенозидів
1.2. Живильне середовище	Згідно технічного регламенту	Згідно технологічного процесу	Середовище для інокуляції та культивування суспензійної культури

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА				Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Ступак А.											
Конс..											43	84
Реценз.									КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ			
Керівн.	Банникова М.О.											
Затверд.												

2. Допоміжна сировина			
2.1. Вода питна	ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості	Колір, каламутність, запах, рівень рН, жорсткість, вміст мікрофлори	Приготуван ня живильного середовища, дезінфекуюч их розчинів та реагентів
2.2. Вода річкова	ДСанПіН2.2.4- 171-10	Органолептичні, мікробіологічні, рівень рН, жорсткість	Технічні процеси після очищення
2.3. Хлорне вапно	ДСТУ ГОСТ 1692-85	Усі показники у відповідності до постачання даної сировини	Дезінфекція обладнання
2.4. Етанол	ДСТУ 4221:2003	Відповідність категорії сировини призначенню	70% розчин етанолу для проведення екстракції
2.5. Гідроксид калію	ДСТУ ГОСТ 24363-80	Відповідність категорії сировини призначенню	Підтримка рН живильного середовища під час культивування
3. Напівфабрикати			
3.1. Виснажена біомаса	Згідно технічного регламенту	Згідно технологічного процесу	Після екстракції гінзенозидів
3.2. Відпрацьоване живильне середовище	Згідно технічного регламенту	Згідно технологічного процесу	Після фільтрування культуральної рідини

3.2. Опис технологічного процесу одержання гінзенозидів із суспензійної культури женьшеню

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка приміщення. До початку технологічного процесу відбувається перевірка в цілому виробничих зон і обладнання персоналом відповідно до вимог нормативних документів. Мийно-дезінфікуючі розчини готує стерилізаційний блок, що призначається наказом керівника цеху/ділянки.

Підготовку приміщень [58] проводять наприкінці зміни у такій послідовності:

1. Для очищення від розсипаних порошків і рідинних забруднень використовують пилосос або протирають, інколи використовуючи засоби для обезжирення.

2. Для прибирання заносять потрібні матеріали та інвентар та теплий розчин мийного засобу.

3. Для вологого прибирання робочих поверхонь змочують поролонову губку розчином мийного засобу з розрахунку 100-150 мл на м², промивають водою і витирають досуха, відбувається дезобробка [58].

4. Технологічне обладнання готується до роботи за методичними рекомендаціями, що затверджені спеціалістами із СанПіН та внутрішнім регламентом підприємства.

5. Для миття підлоги використовують миючий засіб, промивають теплою водою і витирають досуха. Дезобробка починається з віддаленої від входу площі, із захопленням третини раніше протертої поверхні [58].

6. Забороняється додавати свіжі розчини до вже використаних при дезінфекційній обробці розчинів.

7. Після миття приміщень оформлюється відповідний протокол, що підписується особами, відповідальними за санітарно-гігієнічний стан приміщення, а саме представником відділу контролю якості [58].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

8. Маркуванням приміщення позначають як готове до проведення виробничих процесів у ньому.

ДР 1.2. Підготовка обладнання. Технічне обладнання обробляється розчинами засобів дезінфекції при температурі приблизно 75-80 °С. Після кожного виробничого циклу біореактор обробляють розчином хлорного вапна при 20 °С і після цього промивають водою до задовільного рівня. Розчин хлорного вапна перемішується при барботуванні повітрям протягом 15 хвилин. Стоки надходять на знешкодження. Перед запуском виробничої лінії обладнання та трубопроводи перевіряють на наявність витоків повітря або води під надлишковим тиском.

ДР 1.3. Стерилізація обладнання. Для проведення стерилізації подають гостру пару при температурі 130°C і тиску 0,2 МПа. Тривалість обробки паром 30 хв. Після цього конденсат, що утворився подається на знешкодження.

ДР 2. Очищення води

Вода якісно може відрізнитись за вмістом мінеральних чи органічних речовин, своєю жорсткістю чи вмістом солей, наявністю і розмаїттям мікрофлори, на це впливає розміщення виробництва. Запропоновано використання річкової води, яка повинна пройти стадії очищення і позбавлення мінеральних солей.

Для процесу очищення води обрано установку зворотного осмосу Arista ROF-60000 з продуктивністю 60 м³/год, потужністю до 50 кВт. Після очищення вода подається на ДР5, ДР6, ТП7.

ДР 3. Очищення повітря

ДР 3.1. Забір повітря. Повітря забирають з атмосфери повітрозабірником, який розташований за межами повітрорудувної станції, точка забору 5 м вище рівня землі за температури від 15°C до 35°C.

ДР 3.2. Стиснення та охолодження. Для стиснення використовується компресор. Тиск нагнітання становить 0,165 МПа. Тиск регулярно контролюється завдяки манометру. Далі стиснене повітря подається до

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

холодильника. Перед фільтрами встановлено ресивер, який необхідний для вирівнювання тиску системи і для того, щоб повітря подавалося на фільтри рівномірно.

ДР 3.3. Грубе очищення. Повітря пропускається через волокнисту касету типу G4 з фільтром, переважно затримується дрібний пил, зола, аерозолі тощо. Матеріалом для фільтрування є тканина, діаметр пор якої 10 мкм. Очищення має ефективність 98%.

ДР 3.4. Тонке очищення. Повне очищення повітря проходить за індивідуальному фільтрі, його ефективність 99,97%. Даний фільтр очищає від частинок, що мають діаметр до 0,3 мікрон, тобто найдрібніші пилові частинки, смоляний туман, мікроорганізми та ін.

ДР 4. Приготування розчину етанолу

70%-ий розчин етанолу використовується для екстракції гінзенозидів із суспензійної культури женьшеню.

Етанол надходить через дозатор Д-27 у змішувач, який обладнано турбінною мішалкою. Змішування речовин відбувається протягом 15 хв з частотою обертання 550 об/хв до досягнення гомогенності розчину. Розчин етанолу відправляється на ТП 10.1.

ДР 5. Приготування живильного середовища

Для вирощування суспензійної культури женьшеню у біореакторі варто вносити поживні компоненти у такій кількості та концентрації, щоб це забезпечило необхідне накопичення біомаси і збільшення вмісту вторинних метаболітів у рослинних клітинах.

ДР 5.1. Підготовка розчину лугу. Необхідно підтримувати показник рН на стадії культивування у біореакторі ТП7, тому у змішувачі готується 1% розчин КОН. Луг надходить через дозатор Д-30, очищена вода через інший дозатор Д-31.

ДР 5.2. Змішування компонентів живильного середовища. Компоненти середовища подаються у змішувач, де відбувається перемішування за

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

допомогою турбінних мішалок. Потужність мішалки – 1200 Вт, частота обертів – 700 об/хв. Змішувачі мають шнекові дозатори Д-33 та Д-34, крізь які подаються компоненти середовища.

Склад живильного середовища (ЖС) наступний:

KNO_3 – 1,9 г/дм³; NH_4NO_3 – 1,65 г/дм³; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,37 г/дм³; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,44 г/дм³; KH_2PO_4 – 0,17 г/дм³; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0278 г/дм³; $\text{Na EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0373 г/дм³; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0223 г/дм³; мезоінозит – 0,1 г/дм³; тіамін – 0,0005 г/дм³; піридоксин – 0,0005 г/дм³; нікотинова кислота – 0,0005 г/дм³; сахароза – 30 г/дм³, ауксин (ІОК) – 0,02 г/дм³.

ДР 5.3. Стерилізація ЖС. Стандартне середовище необхідно простерилізувати для запобігання контамінації сторонньою мікрофлорою. Для цього у автоклав, куди надходить живильне середовище після змішувача, подається гаряча пара під тиском 0,2 МПа протягом 25 хв при температурі 130°C.

ДР 6. Інокуляція суспензії

У інокулятор з колби переноситься первинна суспензійна культура *P. ginseng* і одразу подається живильне середовище з ДР 5.3. Для інокуляції суспензійної культури рекомендовано реактор з лопатевою мішалкою та барботером. Культура вирощується протягом 5 днів при 26-28°C, 160 об/хв, рН = 5,5 – 6,0. Зі стадії ДР3.4 для інокуляції подається повітря, що пройшло тонке очищення. Посівний матеріал подається до ТП 7 на виробниче культивування.

ТП 7. Культивування у біореакторі

Простерилізоване ЖС після автоклавування на стадії ДР 5.3 подається до виробничого біореактора, куди також надходить інокулят зі стадії ТП 6 для проведення культивування суспензійної культури. Перемішування є механічним з використанням лопатевої мішалки, частота її оберту 160 об/хв. Технологія вимагає аерації, тож подається повітря з барботера. Один цикл культивування триває близько 430 год.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

Рівень рН контролюється спеціальним датчиком на рівні 5,5 – 6,0 протягом доби, у разі збільшення підтримується додаванням 1% розчину КОН від ДР 5.1. Значення тиску становить 0,1 МПа.

Повітря для барботування подається з ДР 3.4. через інжектор з нижнього боку біореактора. Швидкість подачі барботажного повітря становить 70 кг/год. Рівень розчиненого у середовищі кисню (pO_2) встановлюється на рівні 30% насичення. Температура підтримується на рівні 26-28°C протягом усього часу культивування. Температура підтримується за рахунок надходження у сорочку біореактора теплоагенту, що є гарячою водою. Даний показник контролюється за допомогою термопари.

ТП 8. Відділення біомаси від культуральної рідини

ТП 8.1. Гомогенізація

Через насос суспензійна маса подається у збірник, а потім направляється до гомогенізатору. Гомогенізація проводиться за допомогою гомогенізатора високого тиску. Температура суспензії під час процесу підтримували на рівні 25°C, а тиск має бути на рівні 15 МПа. Гомогенізація посилює руйнування клітинних стінок, внаслідок чого буде вищий вихід цільових речовин. Осад надходить потім на фільтрування на фільтр-пресі до ТП 8.2.

ТП 8.2. Фільтрування на фільтр-пресі

Рослинна біомаса направляється у фільтр-прес насосом, проходить вздовж пластин до моменту повного заповнення суспензією всіх камер. Під тиском тверді частинки осаджуються на поверхні фільтрувальної тканини, густина осаду зростає. Відпрацьоване ПС відправляється на ЗВ13. Технічний контроль обладнання та забрудненості фільтру обов'язковий.

ТП 9. Ліофільне висушування

ТП 9.1 Заморожування. Перший етап ліофільного висушування в ліофільній сушарці проходить при температурі -40°C та атмосферному тиску, тривалість процесу 3 години. Глибинна вода, що знаходиться у біомасі, заморожується.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

ТП 9.2 Первинне висушування. Другий етап ліофільного висушування відбувається за температури -5°C , тиску $0,01\text{ МПа}$, триває 10 годин. Оскільки тиск наднизький, кристалізована вода у клітинах суспензійної культури з твердого стану перетворюється на газ і у вигляді водяної пари відводиться з апарата. Вже як конденсат надходить на стадію ЗВ 13.

ТП 9.3 Вторинне висушування. Даний етап ліофільного висушування проходить за температури 30°C , залишковий тиск $P = 135\text{ Па}$, тривалість 8 годин. Остаточного випаровується залишкова волога і так само відводиться як водяна пара.

На кожному етапі ліофільного висушування контролюються технічні параметри процесу та обладнання.

ТП 10. Екстракція гінзенозидів з біомаси

ТП 10.1 Екстракція гінзенозидів. Гінзенозиди з біомаси після ліофілізації одержують екстракцією етанолом у екстракторі. Температура $22-24^{\circ}\text{C}$, тривалість екстракції 5 год. Співвідношення екстрагенту і речовини, що екстрагується, становить близько 10:1.

ТП 10.2 Сепарація екстракту. Після екстракції розчин подається у сепаратор, де, під дією води для охолодження в сорочці апарата, охолоджується до температури 5°C . Екстракт, що є сумішшю гінзенозидів відділяється від спирту, який можна використовувати повторно. Суміш вторинних метаболітів надходить насосом у збірник до ТП 11 для кінцевого відстоювання рідкого екстракту.

ТП 11. Відстоювання екстракту

Рідкий екстракт з ТП 10.2 надходить до збірника за допомогою насоса і проходить відстоювання протягом 2 діб. Залишки вологи, яку не вдалося видалити раніше, осідають на дні ємності, згодом направляються до ПВ14. Екстракт має бути реалізований, тому відвантажується для фасування та відправлення споживачеві.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

ПВ 12. Переробка відходів

Всі речовини - фільтрати з різних стадій можуть промиватися та повторно використовуватися. Якщо відпрацьовані елементи з фільтрів не придатні для регенерації, тоді вони транспортуються до полігонів і утилізуються.

ЗВ 13. Знешкодження відходів

Вода після миття обладнання і конденсат, який утворився при ліофільному сушінні біомаси чи стерилізації, скидаються в міську каналізаційну мережу.

Виснажену біомасу рослинної культури після ТП 10.2 та відпрацьоване живильне середовище з ТП 8.2 можуть піддавати термічному знезараженню і використовувати як добрива, а також для компостування чи одержання біогазу.

ПВ14. Регенерація теплоносіїв

Відпрацьовані теплоагент та холодоагент зі стадій ДР 6, ТП 7, ТП 8.2, ТП 10.2, залишки вологи при відстоюванні на ТП11, а також відпрацьовані конденсати направляються на регенерацію, яка заснована на рекуперації тепла в теплообміннику і відновленні потрібних температур для виробничого процесу.

					<i>ДП БЕ91. 13.000 ПЗ</i>	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.3. Матеріальний баланс

Таблиця 3.2. – Матеріальний баланс процесу одержання гінзенозидів із суспензійної культури женьшеню.

Стадія	Використано		Отримано	
	Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість, кг	Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість, кг
Стадія отримання живильного середовища	Вода	798,25	Живильне середовище для вирощування суспензійної культури	870
	Суміш мінеральних солей	10,7		
	Ауксин (ІОК)	0,037		
	Сахароза	61		
Стадія інокуляції	Живильне середовище	245	Інокулят	375
	Первинна суспензія, що пройшла початкові стадії інокуляції	130		
Стадія виробничого культивування	Живильне середовище	625	Культуральна рідина з біомасою	990
	Інокулят	375	Втрати (1%)	10

Продовження Таблиці 3.2

Стадія відділення біомаси від культуральної рідини	Культуральна рідина з біомасою	990	Біомаса	400
			Культуральна рідина	583,1
			Втрати	6,9
Стадія екстракції гінзенозидів	Суша культивована біомаса	350	Екстракт гінзенозидів	35
			Виснажена біомаса	315
Стадія відстоювання екстракту	Екстракт гінзенозидів	35	Екстракт гінзенозидів для споживача	33
			Волога	2
ВСЬОГО		3620	ВСЬОГО	3620

3.4. Контроль виробництва

У таблиці 3.3 зазначено параметри і види контролю на різних стадіях технологічного процесу, допустимі значення, а також методи та прилади контролю.

Таблиця 3.3 – Контроль виробництва.

Стадія процесу, місце заміру параметра або відбору проби	Параметр, що контролюється, одиниці вимірювання, вид контролю	Частота контролю	Норми технологічного режиму	Метод контролю параметра, тип приладу
ДР1.3. Стерилізація обладнання	Температура	Під час стерилізації	$T = 130^{\circ}\text{C}$,	Термометр
	Час стерилізації		$t = 30 \text{ хв}$	Годинник
	Тиск		$P = 0,2 \text{ МПа}$	Манометр
ДР3.2 Стиснення та охолодження повітря	Тиск	Під час стиснення	$P = 0,165 \text{ МПа}$	Манометр
	Температура	Під час охолодження	$t = 20-25^{\circ}\text{C}$	Термометр

ДР3.3. Грубе очищення повітря	Чистота повітря	Після очищення на фільтрі	E = 98%	Перевірка ступеню очищення
ДР3.4. Тонке очищення повітря	Чистота повітря	Після очищення на фільтрі	E = 99,97%	Перевірка ступеню очищення
ДР 4. Приготування розчину етанолу	Концентрація C_2H_5OH	Під час приготування розчину	C(етанол)= 70%	Об'ємний
ДР5.1. Приготування розчину КОН	Концентрація КОН	Після приготування розчину	C (КОН) = 1%	Хімічний метод, перевірка концентрації
ДР5.2. Змішування компонентів живильного середовища	Маса компонентів живильного середовища	При завантаженні до апарата	За технічним регламентом	Масове дозування
ДР5.3. Стерилізація живильного середовища	Температура	Під час стерилізації	T = 130°C	Термометр
	Час стерилізації		t = 25 хв	Годинник
	Тиск		P = 0,2 МПа	манометр

Продовження Таблиці 3.3

ДР6. Інокуляція суспензії	Температура	Автоматичн о під час інокуляції	T= 26-28°C	Термопара
	pH		pH = 5,5- 6,0	pH-метр
	час		t= 120 год	Годинник
ТП7. Культивування у біореакторі	Температура	Автоматичн о під час культивува ння у біореакторі	T= 26-28°C	Термопара
	pH		pH = 5,5- 6,0	pH-метр
	Час		t= 430 год	Годинник
ТП8.1. Гомогенізація	Тиск	Під час гомогенізац ії	P = 15 МПа	Манометр
ТП 9.1 Заморожування	Температура	Автоматич но	T= -40°C	Термометр
	Час		t= 3год	Годинник
ТП9.2 Первинне висушування	Температура	Автоматичн о	T= -5°C	Термометр
	Тиск		P = 0,01 МПа	Манометр
	Час		t= 10 год	Годинник

ТП9.3 Вторинне висушування	Температура	Автоматично	T= 30°C	Термометр
	Тиск		P = 135 Па	Годинник
	Час		8 год	
ТП10.1. Екстракція гігенозидів з біомаси	Температура	Під час екстракції	T= 22-24°C	Термометр
	Час екстракції		t = 5 год	Годинник
ТП10.2.Сепарація екстракту	Температура	Під час сепарації	T = 5°C	Термометр
ТП11.Відстоювання екстракту	Якість екстракту	1 раз на день	За технічним регламентом	За технічним регламентом

Висновки до розділу 3.

1. Охарактеризовано вихідну сировину, а також матеріали та напівпродукти даної технології виробництва.

2. Дано опис технологічної схеми одержання гінзенозидів з суспензійної культури женьшеню *Panax ginseng*. Технологія, що пропонується включає стадії санітарної підготовки виробництва, підготовки живильного середовища та інокуляту, культивування суспензійної культури, відділення біомаси від культуральної рідини, екстракції гінзенозидів, відстоювання екстракту, переробки та знешкодження відходів.

3. Складено матеріальний баланс технологічного процесу, а також наведено параметри, частоту, методи та засоби контролю на окремих стадіях виробництва.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Виробнича потужність

На підставі запланованих виробничих потреб сировини і матеріалів, а також одержання готового продукту, можна узагальнити, що необхідна кількість калюсної біомаси женьшеню, з якої готується суспензійна культура, становить близько 2600 кг/рік, живильного середовища 5200 кг/рік, кількість нарощеної біомаси 13000 кг/рік.

Оскільки тривалість циклу культивування у біореакторі триває 18 діб, на рік проходитиме приблизно 19 циклів.

Виробнича продуктивність за цикл культивування із врахуванням періодів технічного обслуговування обладнання, ремонту становитиме:

$$Q_{\text{Пр}} = \frac{V}{T} \cdot t = \frac{13000}{340} \cdot 18 = 688 \text{ кг/цикл} \quad (4.1)$$

де $Q_{\text{Пр}}$ – продуктивність виробництва за один цикл, V – загальна запланована кількість нарощеної біомаси за рік, T – розмір календарного року, t – час культивування.

Якщо кількість біомаси за один цикл культивування 688 кг, відповідно умовне середнє значення на добу дорівнює 38 кг.

Вихід екстракту приблизно в 10 разів менше за обсяг біомаси після культивування, отож із поправкою на ефективність екстрагування становитиме:

$$Q_{\text{ек}} = V \cdot \Delta = 1300 \cdot 0,95 = 1235 \frac{\text{кг}}{\text{рік}}, \quad (4.2)$$

де $Q_{\text{ек}}$ – обсяг одержання екстракту за один рік, V – запланована кількість екстракту за рік, T – поправка на ефективність екстрагування.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ступак А.			ПІДБІР ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Конс..							59	84
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Банникова М.О.						
Затверд.								

Аналогічно за один цикл культивування, кількість екстракту становитиме:

$$Q_{\text{ек1}} = \frac{V}{T} \cdot t = \frac{1235}{340} \cdot 18 = 65,4 \text{ кг/цикл}, \quad (4.3)$$

де $Q_{\text{ек}}$ – обсяг одержання екстракту за один цикл, V – загальна запланована кількість екстракту за рік, T – розмір календарного року, t – час культивування.

Вміст гінзенозидів у рідкому екстракті близько 10%.

Для даних потужностей виробництва вважається достатнім робота одного апарата з номінальним об'ємом 80 м^3 [5].

4.2. Вибір апарата

Обраним апаратом є виробничий біореактор.

Біореактор з барботером та механічним перемішуванням - це пристрій для культивування мікроорганізмів або рослинних клітин, який включає в себе чотири складові: власне реактор, барботер, механічні мішалки та систему контролю і автоматизації процесу. Апарати з механічним перемішуванням є найбільш поширеною конструкцією біореактора у сучасній промисловій біотехнології [59].

Апарат заповнюється рідиною, в якій культивуються біотехнологічні об'єкти, при цьому забезпечується підтримання певних умов (наприклад, температури та рівню рН). Барботер забезпечує постійну подачу повітря для аерації рідини, а механічна мішалка розподіляє культуральну рідину, забезпечуючи однаковість умов у всій реакторній системі [60].

Отже, основні переваги біореактора з барботером та механічною мішалкою для виробництва включають:

1. Підвищена ефективність культивування за рахунок постійної подачі повітря та рівномірного розподілу поживних речовин. Високий масо- та енергообміни клітин і середовища [59].
2. Можливість контролювати та налаштовувати умови культивування для досягнення оптимальних рівнів продуктивності.
3. Мінімізація витрат за рахунок високої автоматизації та контролю процесів.
4. Відносна простота конструкції апарата.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5. Широкий спектр застосувань у виробництві біологічних речовин, наприклад, чистих білків, амінокислот, ензимів [59].

Механічна мішалка у промисловому біореакторі - це пристрій, що дозволяє рівномірно розподіляти середовище та клітини організмів у ньому, забезпечуючи відповідні умови для культивування та росту. Тобто, принцип дії механічної мішалки полягає у створенні потоків рідини всередині апарата [59].

Будова механічної мішалки включає в себе такі складові:

1. Основа: фіксована частина механічної мішалки, яка закріплюється на стінці реактора апарата.

2. Вал: основний елемент механічної мішалки, що з'єднується з електродвигуном, що забезпечує його роботу.

3. Лопаті: рухомі елементи, що прив'язані до вала та переміщуються в рідині, забезпечуючи перемішування культуральної рідини. Лопаті можуть бути різної форми та з різного матеріалу в залежності від вимог виробництва [60].

4. Привід: механізм, який забезпечує рух вала та лопаті.

У процесі роботи механічна мішалка може забезпечувати перемішування матеріалів, аерацію, розсіювання порошків та інші процеси, що є важливими для культивування та виробництва біологічних продуктів. Це дозволяє контролювати процеси культивування в режимі реального часу, оскільки оператори можуть налаштовувати систему відповідно до потреб та вимог виробництва, що важливо за промислових масштабів, де велику кількість компонентів середовища необхідно змішувати і перемішувати на високій швидкості, щоб забезпечити ефективність виробництва та якість продукту [59].

За рахунок високої інтенсивності масопередачі кисню та поживних речовин для продуцентів система механічного перемішування є дуже вигідною економічно, що і сприяє розповсюдженню та збільшенню потреби у застосуванні відповідного виду апаратів у промисловості [59].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У даній роботі біореактор обладнаний лопатевою мішалкою, оскільки такий тип пристроїв підходить для розчинення і, відносно невеликого за інтенсивністю, перемішування суспензійних культур, є простим конструктивно, недорогим.

Барботер - це пристрій, що забезпечує подачу повітря до рідини в реакторі у процесі культивування клітин. Барботер включає в себе складові, такі як насос для подачі повітря і спеціальний пористий шланг, що занурюється в рідину. Конструкція має вигляд трубок з отворами [60].

Принцип дії барботера полягає у подачі струменя повітря під тиском через пористий шланг у рідину в апараті. У шарі рідини утворюються бульбашки повітря, що підіймають частки рідини вгору, внаслідок чого інтенсифікується перемішування [60].

На основі характеристик та вимог до апарата, було обрано біореактор з механічним перемішуючим пристроєм барботажного типу (рис.4.1).

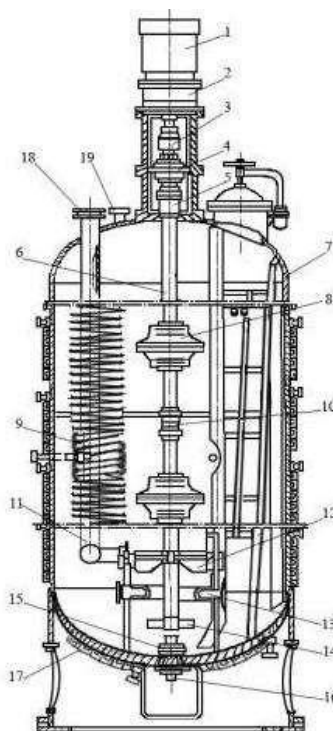


Рисунок 4.1 Реактор барботажного типу з механічним пристроєм перемішування [60].

1 – електродвигун, 2 – редуктор, 3 – муфта, 4 – підшипник, 5 – торцеве ущільнення, 6 – вал, 7 – корпус, 8 – турбінна мішалка, 9 – зміювик, 10 – муфта, 11 – труба для підводу повітря, 12 – лопатева мішалка, 13 – барботер, 14 – гвинтова мішалка, 15 – опірний підшипник, 16 – штуцер для спуску рідини, 17 – оболонка, 18 – лаз-люк, 19 – патрубок завантаження.

Обраний біореактор використовується для культивування клітин організмів, що продукують біологічно активні речовини, що відповідає технології у даній роботі. На кришці апарата наявний привід приладу для перемішування [59]. Складові частини пристрою: електродвигун, редуктор, муфта, підшипник та торцеве ущільнення. Також зверху розташовані штуцери для завантаження живильного середовища та інокуляту, подачі та виходу повітря, люки, клапан – запобіжник [60].

Для зливу культуральної рідини в днищі апарата встановлено спускний штуцер. В середині корпусу проходить вал, на якому закріплений прилад перемішування у вигляді закритих лопатей [60]. Барботер з'єднується з трубою для подачі повітря. Вал і пристрої перемішування з муфтами обертаються завдяки мотору-редуктору [60].

Для біореактора проводиться стерилізація за температури 130-140°C. Оскільки процес має бути стерильним, конструкцією вала мішалки передбачено торцеві ущільнення. Завдяки торцевому ущільненню майже повністю запобігається витік середовища чи потрапляння повітря у місці виводу вала [60].

4.3. Розрахунок виробничого біореактора

Вихідні дані:

Загальний об'єм апарата: $V_{\text{заг}} = 80 \text{ м}^3$;

Коефіцієнт заповнення: $K_z = 0,7$

Робочий об'єм апарата:

$$V_p = V_{\text{заг}} \cdot K_z = 80 \cdot 0,7 = 56 \text{ м}^3 \quad (4.4)$$

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

Для розрахунку обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0) за ДСТУ 20680-75 «Апарати з механічними перемішувачами. Загальні технічні умови.» [61]:

- Внутрішній діаметр апарата $D_{\text{вн}} = 3600 \text{ мм} = 3,6 \text{ м}$;
- Висота корпусу $H = 8500 \text{ мм} = 8,5 \text{ м}$.

1. Розрахунок днища апарата:

Висота еліптичної частини днища:

$$h_{\text{ел}} = 0,25D_{\text{вн}} = 0,25 \cdot 3600 = 900 \text{ мм} = 0,9 \text{ м} \quad (4.5)$$

Еліптичні днища є стандартними виробами, тому за [62] можна знайти інші конструктивні розміри днища апарата:

- об'єм еліптичного днища: $V_{\text{дн}} = 7097,1 \text{ дм}^3 = 7,097 \text{ м}^3$;
- товщина стінки днища: $S_{\text{д}} = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м}$;
- висота основи днища: $h_1 = 0,1 \text{ м}$;
- внутрішня поверхня днища $F_{\text{вн}} = 15,18 \text{ м}^2$;

Повна висота днища апарата :

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_{\text{ел}} = 0,1 + 0,9 = 1 \text{ м} \quad (4.6)$$

2. Розрахунок рівня рідини в біореакторі:

Об'єм циліндричної частини біореактора:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{заг}} - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 80 - 2 \cdot 7,097 = 65,8 \text{ м}^3 \quad (4.7)$$

Висота циліндричної частини апарата:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F_{\text{вн}}} = (V_{\text{ц}} \cdot 4) / (\pi \cdot D_{\text{вн}}^2) = (65,8 \cdot 4) / (3,14 \cdot 3,6^2) = 6,47 \text{ м} \quad (3.9)$$

Висота апарата без штуцерів:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 6,47 + 2 \cdot 1 = 8,47 \text{ м} \quad (4.8)$$

Рівень рідини в апараті:

$$H_{\text{р}} = \frac{4(V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} + 1 = \frac{4(56 - 7,097)}{3,14 \cdot 3,6^2} + 1 = 18,3 \text{ м} \quad (4.9)$$

3. Розрахунок пристрою перемішування

Для перемішування культурального середовища у біореакторі передбачено спеціальний пристрій – лопатеву мішалку. Діаметр пристрою

перемішування (d_m) визначається за співвідношенням $D_{вн}/d_m$, що знаходиться в інтервалі 1,1-1,33 для даного типу мішалки. Отже, розрахунковий діаметр пристрою для перемішування:

$$d_m = \frac{D_{вн}}{1,15} = \frac{3600}{1,15} = 3130 \text{ мм} \quad (4.10)$$

Зі стандартного ряду [63] обираємо мішалку діаметром $d_m = 3150 \text{ мм} = 3,15 \text{ м}$. У наступних обчисленнях зберігаються такі основні співвідношення: $h_m/d_m = 1$; $b/d_m = 0,1$.

Висота пристрою перемішування:

$$h_m = d_m = 3150 \text{ мм} = 3,15 \text{ м} \quad (4.11)$$

Ширина лопаті пристрою перемішування:

$$b = d_m \cdot 0,1 = 3150 \cdot 0,1 = 315 \text{ мм} = 0,315 \text{ м} \quad (4.12)$$

Параметр висоти завантаження γ :

$$\gamma = \frac{8 \cdot H_p}{D_{вн}} + 1 = \frac{8 \cdot 18,3}{3,6} + 1 = 42 \quad (4.13)$$

4. Розрахунок барботера

Висота пристрою перемішування відносно барботера становить:

$$h_b = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 3,15 = 0,8 \text{ м} \quad (4.14)$$

Діаметр барботера [63]:

$$D_b = D_0 d_m = 0,6 \cdot 3,15 = 1,9 \text{ м} \quad (4.15)$$

де $D_0 = 0,5 \div 0,75$.

Загальна кількість отворів:

$$z_{отв} = (4 \cdot V_{\Gamma}) / (\pi \cdot d_0^2 \cdot W_0) = (4 \cdot 0,1099) / (3,14 \cdot 0,005^2 \cdot 20) \\ z_{отв} = 280 \text{ отворів} \quad (4.16)$$

де d_0 – діаметр отворів барботера (умовно вважається $d_0 = 0,005 \text{ м}$); V_{Γ} – витрата повітря в апараті ($V_{\Gamma} = 0,1099 \text{ м}^3/\text{с}$), W_0 – швидкість газу на виході з отворів барботера (береться $W_0 = 20 \text{ м/с}$).

Кількість отворів на один ряд:

$$z_{отв1} = \pi D_0 / t_{отв} = 3,14 \cdot 0,75 / 0,01 = 236 \text{ отворів} \quad (4.17)$$

де $t_{\text{отв}}$ – відстань між отворами (вважається $t_{\text{отв}} = 0,01$ м). Загальна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} \cdot d_0^2 \cdot z_{\text{отв}} = \frac{3,14}{4} \cdot 0,005^2 \cdot 280 = 5,4 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \quad (4.18)$$

Для аерації 56 м^3 суспензії потрібно використати повітря:

$$L_{\text{аер.пов}} = 0,1099 \cdot 56 = 6,1544 \text{ м}^3/\text{с} \quad (4.19)$$

Висновки до розділу 4.

1. Розраховано виробничу потужність виробництва даного проєкту. Ключові значення: кількість культивованої біомаси 13000 кг/рік ; вихід рідкого екстракту женьшеню 1235 кг/рік із вмістом гінзенозидів 10% .

2. Обрано та охарактеризовано основне обладнання технологічного процесу – виробничий біореактор, об'ємом 80 м^3 , що обладнаний лопатевою мішалкою та барботером.

3. Проведено розрахунки еліптичного днища та рівня рідини у біореакторі, пристрою перемішування та барботера.

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

5.1. Охорона праці

У процесі виробництва існує ряд небезпечних факторів:

1. Перебої напруги в електричному колі, що може привести до замикання; головні джерела небезпеки - електронагрівальні прилади, реактор, барботер, механічні мішалки та система контролю і автоматизації процесу [5, 64];
2. Високий рівень електромагнітного випромінювання; джерело – електронагрівальні прилади;
3. Пошкодження лабораторного посуду та виробів; основне джерело – скляний посуд;
4. Високі температура та вологість повітря у робочій зоні; джерела – електронагрівальні прилади, випари при визначенні сухого залишку проби та дослідів при нагріванні проби [5, 64];
5. Хімічні реагенти, що потрапляють до організму через повітряні шляхи, травний тракт і слизові оболонки; джерело – випари хімікатів на виробництві;
6. Психофізіологічні перевантаження; джерело - тривала монотонна робота з технологічним обладнанням [5, 64].

Для запобігання виникнення коротких замикань [65] на виробництві слід дотримуватися правил техніки безпеки та дотримуватися наступних рекомендацій:

1. Встановлення автоматичних захисних вимикачів, які відключають електроприлад в разі перевищення допустимого струму або напруги електричного кола;
2. Перевірка проводки та обладнання на пошкодження;

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Ступак А.			ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ			Літ.	Арк.	Аркушів
Конс..									67	84
Реценз.								КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Банникова М.О.								
Затверд.										

3. Перед початком роботи переконатися, що кожен прилад підключений до відповідної йому розетки або лінії, що має надійну заземлену електричну мережу;

4. Регулярне проходження інструктажів для персоналу щодо техніки електробезпеки і правил підтримання обладнання у належному стані [65].

Розетки повинні бути з маркуванням значення напруги, що на них подається. Усі елементи електроприладів мають бути захищені від випадкового дотику, розташовані подалі від легкозаймистих речовин, матеріалів, предметів і конструкцій [5]. Електропровідне обладнання має бути заземленим, допустима напруга 42 В. Робота на установках з напругою більше 220 В виконується як мінімум двома особами, одна з яких попередньо отримала кваліфікацію для цього. Невимкнені прилади не можуть залишатися без нагляду. Сторонні особи до виробничих зон не допускаються [5].

Для зменшення впливу електромагнітного випромінювання [66] від приладів варто:

1. Забезпечити належне віддалення між монітором і очима. Рекомендується зберігати відстань не менше 30 см від екрану монітора;

2. Користуватися пристроєм із сучасним рідкокристалічним монітором, використовувати антиблікові захисні плівки для екрана;

3. Правильно розташувати робочу зону відносно джерел випромінювання та інших електронних пристроїв. Через значне електромагнітне випромінювання від стінок монітора рекомендується розмістити монітор в кут, для його поглинання стінами [66];

4. Правильно налаштувати яскравість та контраст на моніторі, робити технічні перерви для відпочинку очей при роботі з електронагрівальними приладами.

Рекомендації, при роботі зі скляним лабораторним посудом [65] для уникнення його пошкодження:

1. Не використовувати лабораторний посуд, який має пошкодження або

тріщини. Існує велике імовірність того, що посуд може лопнути при нагріванні або взаємодії з іншими речовинами;

2. Зберігати скляні посудини в безпечному місці, де ризик випадкового пошкодження мінімальний. Миття передбачене у приміщеннях з раковинами, мийками, а також обладнання для зберігання та сушіння [65];

3. Працювати зі скляним лабораторним посудом на стабільній та рівній робочій поверхні;

4. Переносити скляний посуд у спеціальній тарі (лабораторній корзині або застосовуючи спеціальне кріплення), щоб зменшити ризик випадкового пошкодження [65];

5. Закривати нагріту посудину зі скла до її охолодження притертою пробкою.

Скляний посуд та обладнання перевіряють на відсутність тріщин завдяки використанню полярископа.

За підвищеної температури повітря у виробничих зонах, необхідно забезпечити належну вентиляцію робочого приміщення, або ж встановити кондиціонери, вентиляційні труби та інші спеціальні пристрої, аби збільшити рух повітря у приміщенні; регулярно проводити вимірювання температури повітря в робочому приміщенні та вживати заходів для його зниження, якщо воно перевищує норму; надавати персоналу засоби індивідуального захисту від високих температур, як, наприклад, спеціальний термозахисний одяг та рукавички [67].

Для уникнення високої вологості при виробництві не рекомендовано проведення технологічних процесів з відкритими поверхнями випаровування рідини. Необхідне герметизоване обладнання, а для видалення пари мають бути витяжні системи. Для видалення вологи приміщення мають вентилюватись [67].

Для зменшення впливу хімічних речовин на здоров'я працівників на виробництві необхідно стежити за відповідним зберіганням хімічних речовин.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Потрібно давати можливість працівникам пройти курси з навчання безпечного поводження з хімічними речовинами, забезпечити персонал надійним захистом, таким як спецодяг із кислотостійких тканин, респіратори, окуляри та рукавички. Користуватись хімічними реагентами лише в зонах, що відведені для цього [5, 65].

На виробництві зона з хімічними речовинами має бути ізольована та перевірена на герметичність. Контейнери з відходами мають бути правильно розміщені і належно позначені. Робочі місця повинні бути забезпеченими достатньою кількістю води і речовин, що нейтралізують кислоти чи луги [5, 65].

Декілька рекомендацій з Охорони праці, які можуть допомогти зменшити вплив на психофізіологічний стан [65] виробничого персоналу:

1. Розробити розклад роботи, який включає технічні перерви для відновлення енергії та розслаблення;
2. Наявність місця для відпочинку, яке буде відокремлено від робочих зон;
3. Забезпечення більш комфортних умов праці, правильне освітлення, використання сучаснішого обладнання з покращеними характеристиками дисплеїв для уникнення серйозних проблем із зором [65];
3. Забезпечення можливістю гігієнічного догляду для працівника;
4. Проведення тренінгів для ефективного управління часом.

Для уникнення перенапруги очей у виробничому приміщенні наявне як загальне штучне, так і місцеве освітлення. Освітлення робочого місця має бути рівномірним і стійким; за спектральним складом близьким до сонячного [65]. Рівень допустимої освітленості визначається залежно від розряду зорових робіт, що виконуються. Для четвертого розряду зорових робіт він становить 300-500 лк [65].

На виробництві наявна небезпека пожеж і загорянь в лабораторії, можливі причини наступні: несправність обладнання, порушення роботи

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

систем опалення, вентиляції і кондиціонування; перенапруга електромережі; неправильне поводження з вибуховими речовинами (зокрема розчинниками) або умови їх збереження тощо [68].

Для профілактики порушення режиму роботи при пожежі треба, щоб шнури живлення електричного обладнання мали триполюсну вилку з попереджувальним включенням проводу заземлення. Шнури з пошкодженою ізоляцією або ненадійно з'єднані з мережею живлення непридатні до використання [67]. Обов'язковою є наявність запобіжників, теплових реле. Увімкнені електроприлади мають бути під доглядом персоналу. В процесі експлуатації не можна включати у мережу зовелику кількість пристроїв, оскільки та може бути не розрахована на великі потужності [67].

Забороняється працювати з легкозаймистими речовинами на відкритому вогні і поблизу електронагрівальних приладів, зберігати їх можна в товстостінному посуді з притертим корком у металевій скрині. Необхідно впровадити режим безперебійного відведення тепла і вентиляції. Для гасіння пожеж потрібне будівництво димових люків, спеціальних сходів, забезпечення під'їздів до споруд та джерел води, наявність вогнегасників різних типів [67].

За надзвичайної ситуації необхідне проведення заходів евакуації із зони небезпеки персоналу, а також матеріальних цінностей. Пожежа має бути локалізована і погашена [67].

5.2. Охорона довкілля

При роботі із суспензійними культурами лікарських рослин наявне високе споживання кількості води й повітря, які можуть бути забруднені органічними і мінеральними речовинами, чужорідною мікрофлорою. Вивчення та контроль мікрофлори повітря є важливими для дотримання санітарно-гігієнічних вимог виробництва, оскільки це може негативно впливати на здоров'я персоналу [69].

Рекомендовано використання ряду фільтрів для поетапного очищення повітря, що виділяється з вентиляційних систем, запровадження системи

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

контролю за вмістом відпрацьованого повітря, встановлення сучасного технологічного обладнання для зниження викидів шкідливих речовин та забруднень в атмосферу. Джерела викидів повітря мають бути ізольовані та облаштовані спеціальні зони для очищення та виходу відпрацьованого повітря [69].

На виробництві мають відбуватись регулярні перевірки систем фільтрування, вентиляції та очищення повітря.

Із стічних вод видаляється близько 70% нерозчинних механічних домішок. Спорудження для механічного очищення води: решітки (або УФС – установка фільтрувальна самоочисна) і сита; пісколовки; первинні відстійники; мембранні елементи [70].

Тобто, для великих частинок використовують решітки і сита. Максимальна ширина 16 мм. У пісколовках відбувається осадження дрібніших частинок під дією сили тяжіння і жироловки, що видаляють гідрофобні речовини флотацією. Для очищення стоків від найдрібніших часток необхідне фільтрування шляхом пропускання через шар зернистого матеріалу. На великих промислових виробництвах користуються попитом мембранні фільтри [5, 70].

Фізико-хімічні методи водоочищення полягають у введенні до стоків коагулянтів, адсорбентів або флокулянтів, які вступають в реакцію з домішками, що містяться у воді. В результаті зі стічних вод видаляються нерозчинні домішки, колоїдні частинки тощо [5, 70].

Якщо необхідний більший ступінь очищення, застосовують також біологічні методи.

Біологічне очищення передбачає знешкодження органічних речовин стічних вод бактеріями, як аеробними, так і анаеробними, та найпростішими. Стоки піддаються мінералізації, відбувається видалення органічного азоту і фосфору, знижується біохімічне споживання кисню [70].

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

Є два основних типи установок очищення. У першому типі дихання мікроорганізмів відбувається за рахунок безпосереднього поглинання кисню з повітря. Для іншого типу характерне дихання завдяки подачі кисню через поверхню води або через механічну аерацію, що є більш інтенсивним і ефективним для виробництва [70].

Штучна біологічна очистка здійснюється за рахунок активного мулу в аеротенках, біофільтрів і метанотенків. Для знезараження стоків, які скидаються у природні водойми використовують хімічні засоби, наприклад, хлорне вапно. Альтернативними методами є також обробка ультразвуком або озонування [70].

Висновки до розділу 5.

1. Описано ряд небезпечних факторів на виробництві та профілактичні рекомендації для зменшення відповідних ризиків.
2. Окремо наведено рекомендації для уникнення пожежної небезпеки.
3. Наведено рекомендації, що необхідні для охорони навколишнього середовища, а саме методи очищення повітря та стічних вод на промисловому виробництві.

ВИСНОВКИ

У дипломному проєкті розроблено технологію отримання гінзенозидів з суспензійної культури женьшеню *Panax ginseng*. Відповідно до поставлених завдань :

1. Проведено огляд сучасних літературних джерел стосовно лікарських рослинних культур *in vitro* з точки зору можливості їх використання у якості сировини для одержання вторинних метаболітів. В результаті аналізу літератури було обрано технологію культивування суспензійної культури женьшеню виду *Panax ginseng* у живильному середовищі, що містить мінеральні солі, джерело вуглецю та фітогормони, у виробничому біореакторі з барботуванням та механічним перемішуванням.

2. Обґрунтовано раціональні умови та параметри для культивування рослинної суспензійної культури женьшеню з подальшим отриманням гінзенозидів; культивування у біореакторі є періодичним, його умови: температура 26-28°C; рН 5,5 – 6,0; інтенсивність барботування 70 кг/год; частота перемішування 160 об/хв.

3. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва вторинних метаболітів з суспензійної культури женьшеню. Розраховано матеріальний баланс процесу. Технологія, що пропонується включає стадії санітарної підготовки виробництва, підготовки живильного середовища та інокуляту, культивування у біореакторі, відділення біомаси від культуральної рідини, екстракції гінзенозидів, відстоювання екстракту, переробки та знешкодження відходів.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Ступак А.						
Конс..							74	84
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Банникова М.О.						
Затверд.								

4. Розраховано виробничу потужність технології. Вихід екстракту становить 1235 кг/рік. Апаратом для культивування суспензійної культури женьшеню є барботажний біореактор, що має об'єм 80 м³, коефіцієнт заповнення 0,7; а також обладнаний системою механічного перемішування. Проведено розрахунки апарата. Розроблено креслення виробничого біореактора .

5. Надано основні пропозиції з охорони праці, техніки безпеки та захисту довкілля при одержанні продукту.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes, 2002. – №48. – С. 155-171.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
3. Mulabagal V. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures, 2004. – №45. – С. 1 – 22.
4. Kim Y. Secondary Metabolism of Hairy Root Cultures in Bioreactors *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 2002. – №38. – С. 1-10.
5. Лазеба А. А. Технологія виробництва калусних культур женьшеню, 2020. – 100 с.
6. Rout G.R. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants, 2000. – №18. – С. 91 – 120.
7. Wysokińska H. Production of plant secondary metabolites in transformed organ cultures, 2006. – №4. – С. 124-135.
8. George, E.F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. W: George, E.F., Hall M.A., De Klerk, G.J. (red). Plant Propagation by Tissue Culture, 2008. – №3. – С. 1-28.
9. Kumar, V., Gururaj, H. B., Narasimha Prasad, B. C., Giridhar, P., Ravishankar, G. A. Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum*, 2005. – №106. – С. 237-246.
10. Rao, R. S., & Ravishankar, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, 2002. – № 20. – С. 101–153.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Ступак А.				ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ			Літ.	Арк.	Аркушів	
Конс..										76	84
Реценз.								КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ			
Керівн.	Банникова М.О.										
Затверд.											

11. Гнатюк, І. С. Молекулярні основи клонування багатоклітинних організмів. Молекулярні основи клонування багатоклітинних організмів. Дедиференціація та вторинна диференціація в культурі *in vitro*. Лабораторний практикум [Електронний ресурс] : навчальний посібник для здобувачів ступеня магістра за освітньою програмою «Біотехнології» спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія/ І. С. Гнатюк, Л. В. Маринченко, М. О. Банникова; КПІ ім. Ігоря Сікорського, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 79 с.

12. B. Zhang, F., Liu, C. Yao. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2000. – № 60. – С. 89-94.

13. Учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов по дисциплине «Основы биотехнологии: биотехнология растений» / С.К. Турашева, С.Б. Оразова, Г.Ж. Валиханова – Алматы: Қазақ университеті, 2014. – 258 с.

14. Chang, W.C., Hsing, Y.I. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), 1980. – №57. – С. 123–135.

15. Городенська М.М., Нітовська І.О., Кучук М.В. Вивчення регенераційної здатності стеблових експлантів рослин родини *Brassicaceae* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – 39, №3.

16. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.

17. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. – Киев: Наукова думка, 1984.

18. Методичні вказівки до виконання самостійних робіт з дисципліни "Біотехнологія рослинних і тваринних клітин" для здобувачів другого (магістрського) рівня зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія». Укладачі: І.М.Корнієнко. Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 33 с.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

19. Binarova P, Dolezel J. Alfalfa embryogenic cell suspension culture: Growth and ploidy level stability, 1988. – №5. – С. 561–566.
20. Krzyzanowska J. Phenolic compounds of longleaf mint (*Mentha longifolia* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.) growing under field conditions and *in vitro* cultures, 2011. – С. 69 - 75.
21. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. – Киев: Наукова думка, 1984.
22. Лутова Л. Біотехнологія вищих рослин, 2010. – №2. – С. 150 -153.
23. Debnath, M., Malik, C. P., Bisen, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines, 2006. – №7. – С. 33-49.
24. Smetanska I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures, 2008. – С. 187-228.
25. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. – К.: Наукова думка, 1997.
26. Cuycckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, 2004. – №39. – С. 1-15.
27. Мікроклональне розмноження рослин: теорія і практика : Моногр. / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька; Ін-т фізіології рослин і генетики НАН України. - К.: Наук. думка, 2005. – 272 с.
28. Sarin R. Useful metabolites from plant tissue cultures, 2005. – №4. – С. 79-93.
29. Rajendran L., Ravishankar G.A. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucuscarota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum, 1992. – №14. – С. 707-712.
30. Shilpa K., Varun K. An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture, 2010. – №5. – С. 222-247.
31. Thanh N.T., Murthy H.N., Yu K.W. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*, 2006. – №163. – С. 327-341.

32. Семак Б. Б., Барна М. Ю., Демкевич Л. І. Вітчизняний ринок лікарської рослинної сировини: проблеми і рішення. Науковий вісник НЛТУ України. 2011. Вип. 21.1. С. 264–268.

33. Державна служба статистики України [Електронний ресурс]. - Режим доступу : <http://www.ukrstat.gov.ua>.

34. Мірзоева Т. В. Перспективи розвитку лікарського рослинництва. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Економіка, аграрний менеджмент, бізнес». 2013. Вип. 181 (6). С. 156–181.

35. Кржавич А. С. Розробка технологічного процесу одержання біологічно активних сполук із культури лікарських рослин / А. С. Кржавич, Р. О. Петріна, В. П. Новіков // Наукові вісті НТУУ «КПІ» : науково-технічний журнал. – 2015. – № 3(101). – С. 40–45.

36. Liu, C. Z., Wang, Y. C., Zhao. Liu, C. Z., Wang, Y. C., Zhao, B. Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. / 1999. – №35. – С. 271-274.

37. Sivakumar, G. Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant root, 2006. – №1. – С. 419-427.

38. Шелудько Ю.В. Отримання та фітохімічний аналіз трансгенної кореневої культури *Rauwolfia serpentina* як джерела нових індольних алкалоїдів: Автореф. дис. канд. біол. наук. -К., 2004. — 21 с.

39. Брехман І.І., Грушвицький І.В. Женьшень як лікарська рослина, 2007. – 16 с.

40. Zhuravlev Y.N., Burundukova O.L., Koren O.G., Zaytseva Y.A., Kovaleva E.V. *Panax ginseng* C.A.Meyer: Biodiversity evaluation and conservation // The challenges of the 21th century. Proceedings of the international ginseng conference. -Vancouver, 1996. – С. 162-168.

41. Odnevall A., Bjork L. Differentiated tissue cultures of *Panax ginseng* and their response to various carbon sources // Biochem. Physiol. Pflanzen. –1989 b. – №185. - С. 403-413.
42. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
43. Минеева М.Ф., Колхир В.К., Мартынов А.М. Тритерпеновые гликозиды - перспективный класс природных соединений для создания новых фитопрепаратов, 2011. - №6. - С. 234-246.
44. Попов А.М., Агафонова И.Г., Шенцова Е.Б., Атопкина Л.Н., Самошина Н.Ф., Уварова Н.И. Сравнительное изучение противоопухолевой активности моногликозидов протопанаксадиола и бетулафолиентриола // Антибиотики и химиотерапия. 1994. – Т. 39, № 7. – С. 24-29.
45. Wu Q., Zhou Y.Q., Sun C., Chen S.L. Progress in ginsenoside biosynthesis and prospect of secondary metabolic engineering for the production of ginsenosides. / 2009. – № 29. – С. 102-108.
46. Bathe U., Tissier A. Cytochrome P450 enzymes: A driving force of plant diterpene diversity. / 2019. – № 161. – С. 149-162.
47. Wang J., Gao W.Y., Zhang J., Zuo B.M., Zhang L.M., Huang L.Q. Advances in study of ginsenoside biosynthesis pathway in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta Physiol. Plant.* 2012. – №34. – С. 397–403.
48. Han J.Y., Kim H.J., Kwon Y.S., Choi Y.E. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* 2011. – №52. – С. 2062–2073.
49. Fukushima E.O., Seki H., Ohyama K., Ono E., Umemoto N., Mizutani M. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 2011. – №52. – С. 2050–2061.
50. Bar-Peled M., O'Neill M.A. Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu Rev Plant Biol.* 2011. – №62. – С. 127–155.

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

51. Tiwari P., Sangwan R.S., Sangwan N.S. Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: An update on expanding knowledge and scopes. *Biotechnol Adv.* 2016. – № 34. – С. 714–739.

52. Wang M., Wu B., Chen C., Lu S. Identification of mRNA-like non-coding RNAs and validation of a mighty one named MAR in *Panax ginseng*. *J Integr Plant Biol.* 2015. – №57. – С. 256–270.

53. Wang JW, Wu JY. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013. – №134. – С. 55-89.

54. B. Deng, P. Zhang, F. Ge, D.Q. Liu, C.Y. Chen. Enhancement of triterpenoid saponins biosynthesis in *Panax notoginseng* cells by co-overexpressions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and squalene synthase genes *Biochem Eng J*, 2017. – №122.– С. 38-46.

55. ДСТУ 7410-2013. Корінь женьшеню культивованим свіжий. Технічні умови.

56. Ratan ZA, Youn SH, Kwak YS, Han CK, Haidere MF, Kim JK, Min H, Jung YJ, Hosseinzadeh H, Hyun SH, Cho JY. Adaptogenic effects of *Panax ginseng* on modulation of immune functions. 2021. – №45. – С. 32-40.

57. Kim JH, Yi YS, Kim MY, Cho JY. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. 2017. – №41. –С. 435 - 443.

58. Дикий І.Л. Основи загальної та фармацевтичної гігієни: навч. посібник /І.Л. Дикий, В.Є. Літаров, Л.Ф. Сілаєва. – Х.: Вид-во НФаУ «Золоті сторінки», 2003. – 180 с.

59. Paek, K. Y., Chakrabarty, D., Hahn, E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005. – №81. – С. 277-300.

60. Биков В. А. Біотехнологія: Навч. посібник для вузів. У 8 кн. Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і препаратів / В. Д. Биков, І. А. Крилов, М. М. Манаков та ін. // Вищ. шк., 1987. – 143 с.

61. ДСТУ 20680-75 «Апарати з механічними перемішуючими пристроями. Загальні технічні умови.»

62. ДСТУ 6533- 78 «Днища еліптичні відбортвані сталеві для посудин і апаратів. Основні розміри»

63. Дитнерський Ю. І. Основні процеси та апарати хімічної технології. Посібник з проектування. вид 2-е, пер. і доп, 1991. - 493с.

64. Наказ від 08.04.2014 № 248 Про затвердження Державних санітарних норм та правил Гігієнічна класифікація праці за показниками шкідливості та небезпечності факторів виробничого середовища, важкості та напруженості трудового процесу.

65. Основи охорони праці. Підручник. / К. Н. Ткачук та ін. За редакцією К. Н. Ткачука і М. О. Халімовського. – К.: Основа, 2003. – 472 с.

66. НПАОП 0.00-7.15-18. Вимоги щодо безпеки та захисту здоров'я працівників під час роботи з екранними пристроями.

67. ДСН 3.3.6.042-99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.

68. ДСТУ 8828:2019 Пожежна безпека. Загальні положення.

69. Ананьев В.А., Балыева Л.Н., Гальперин А.Д., Городов А.К., Еремин М.Ю., Звягинцева С.М., Мурашко В.П., Седых И.В./ Системы вентиляции и кондиционирования. Теория и практика. - Евроклимат, 2001, 416 с.

70. Л.О. Штриплинг, Ф.П. Туренко «Основы очистки сточных вод и переработки твердых отходов» \Учебное пособие – 2005. – 192 с.

ДОДАТКИ

Додаток А

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Маса, кг	Примітка
Н-1, Н-4, Н-10, Н-21, Н-17, Н-43, Н-45, Н-51	Насос відцентровий горизонтальний консольний з робочим колесом закритого типу	8		Збірний
Ф-2, Ф-3, Ф-5, Ф-6, Ф-7, Ф-8, Ф-11, Ф-13, Ф-14, Ф-19, Ф-20	Фільтри установки зворотного осмосу Arista ROF-60000 з продуктивністю 60 м³/год, потужністю до 50 кВт	11		
Пз-21	Повітрозабірник, ДСТУ 3692-98	1		
К-22	Компресор. Intertool PT-0014	1		
Х-23	Холодильник. Теплообмінник- охолоджувач (нагрівач) SAF-DX1000E6.	1		
Рс-24	Ресивер. РВ 900.11	1		
Ф-25, Ф-38, Ф-41	Головний фільтр AIRKRAFT.	3		Збірний
Ф-26	Індивідуальний фільтр ALTER AIR.	1		Збірний
Д-27, Д-28, Д-30, Д-31, Д-33, Д-34, Д-39, Д-48	Об'ємно-ваговий дозатор ТУ У 14 3077481.011-94	8		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
3-29, 3-32, 3-35	Реактор-змішувач з турбінними мішалками VMP-680	3		Неірж. сталь 12Х18Н10Т

					ДП БЕ91. 13.000 ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Ступак А.			Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Аркушів	
Конс..									83	84	
Реценз.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ							
Керівн.		Банникова М.О.									
Затверд.											

A-36	Автоклав BARRIQUAND 1621-R	1		
P-37	Інокулятор з мішалкою та барботером ДСТУ 20680-75	1		Збірний
B-40	Біореактор виробничий об'ємом 80 м ³ з лопатевою мішалкою та барботером ДСТУ 20680-75	1		Збірний
36-9, 36-16, 36-42, 36-52	Збірник для тиску рівного або вищого за атмосферний ТУ У В.2.5 – 25.2 – 30336890 – 010: 2008	4		Неірж. сталь 12X18H10T
Г-44	Гомогенізатор високого тиску Bertoli H3037, діапазон тисків 5-15 МПа	1		
ФП-46	Фільтр-прес ФПМ500 Площа фільтрації 1 пластини 500 см ²	1		Збірний
ЛС-47	Ліофільна сушарка GZL-3, діапазон температур -5-+25°C	1		Збірний
Е-49	Екстрактор «Лувеста» типу ЕН10007	1		
СП-50	Сепаратор для тиску рівного або вищого за атмосферний	1		Неірж. сталь 12X18H10T
КП - 40.1	Термометр	1		
КП – 40.2	Рівнемір	1		
КП – 40.3	рН-метр	1		