

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра біотехнології

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

_____Барановський М.М.

«___» _____ 20__ р.

ДИПЛОМНА РОБОТА
(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ

«МАГІСТР»

Тема: Технологія виробництва калюсних культур женьшеня

Виконавець: студентка групи БР-201Мз

Лазеба А.А.

Керівник: к.т.н., доцент кафедри біотехнології

Косоголова Л.О.

Нормоконтролер: асистент кафедри біотехнології

Лазарев В.Г.

Київ 2020

ЗМІСТ

ВСТУП.....	
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
1.1. Особливості культури рослинних клітин і тканин	
1.1.1. Культури клітин рослин як біологічні моделі	
1.1.2. Основні принципи культивування рослинного матеріалу <i>in vitro</i>	
1.2. Отримання калюсу і його культивування.....	
1.3. Сучасні методи культивування калюсних культур рослин	
1.3.1. Особливості складу поживного середовища для культивування калюсних культур рослин	
1.3.2. Етапи калюсоутворення культур рослин.....	
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	
2.1. Об'єкт дослідження.....	
2.1.1. Ботаніко-фармакогностична характеристика женьшеню	
2.1.2. Фармакологічні та хімічні особливості женьшеню	
2.2. Методи досліджень	
2.2.1. Приготування поживного середовища	
2.2.2. Отримання стерильного посуду	
2.2.3. Робота в ламінарному боксі	
2.2.4. Метод індукції калюсогенеза.....	
2.2.5. Метод культивування калюсної культури	
2.2.6. Математичні та статистичні методи дослідження.....	
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	
3.1. Технологічна схема виробництва	
3.2. Оптимізація поживного середовища	
РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ	
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при виробництві калюсних культур женьшеню.....	

4.2	Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних або шкідливих виробничих факторів при виробництві калюсних культур женьшеню ...
4.2.1.	Розрахунок загального освітлення
4.3.	Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при виробництві калюсних культур женьшеню
РОЗДІЛ 5 ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	
5.1.	Виробничі фактори виробництва калюсних культур женьшеню, що впливають на навколишнє середовище
5.2.	Методи очистки стічних вод при виробництві калюсних культур женьшеню ...
5.3.	Заходи щодо поліпшення впливу виробництва калюсних культур женьшеню на організм людини
ВИСНОВКИ.....	
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ.....	
ДОДАТОК А.....	

ВСТУП

Актуальність теми. На даний момент в фармакології стають все поширенішими препарати рослинного походження, оскільки саме рослини мають часто невідтворюваний за якісним складом набір біологічно активних речовин (БАР), а так само мають ряд переваг в порівнянні з синтетичними препаратами: хорошу переносимість, рідкі випадки розвитку алергічних реакцій і побічних ефектів. Попит на лікарські препарати з рослинної сировини призвів до зниження різноманітності диких видів лікарських рослин. Одним із шляхів вирішення проблем збереження рослинних ресурсів і отримання БАР є біотехнологічний спосіб відтворення рослин - культури рослинних клітин. Інтерес до культури *in vitro* також викликаний потребою в зручній модельній системі для вивчення ростових і метаболічних клітинних процесів.

Важливим при одержанні клітинних культур, продуцентів вторинних метаболітів, є оптимізація умов культивування. У сучасних економічних умовах, які є малопрогнозованими і, як наслідок, несприятливими для діяльності інноваційних підприємств, необхідно звернути особливу увагу на прогресивні біотехнології, які б забезпечили ефективне і, відповідно, прибуткове функціонування підприємства за мінімальних витрат.

В даний час в світі спостерігається тенденція до широкого використання лікарських засобів, отриманих на основі рослинної сировини. Особливий інтерес приділяється препаратам, спрямованим на посилення захисних властивостей організму і підвищення імунітету, та які володіють адаптогенними властивостями. З усього рослинного розмаїття рослини роду женьшень є, мабуть, найбільш відомими лікарськими рослинами, що володіють подібними властивостями. Женьшень протягом століть користувався легендарною славою панацеї, тобто усецілювальне, і в результаті різнопланових досліджень багато очікувань, пов'язані з його лікарськими властивостями, підтвердилися. Однак, посилення інтересу до

препаратів, створених на основі женьшеню, призвело до сумних наслідків екологічного плану - непоправного знищення цих реліктових рослин [2, с.12].

Застосовуючи метод культури клітин і тканин, можна забезпечити збереження виду й отримати велику кількість калюсної маси. На сьогодні біотехнологічні методи культивування рослин в умовах *in vitro* використовуються досить часто; вони дають високі результати завдяки своїй економічності, швидкості утворення потрібного матеріалу та можливості контролювати кожен з етапів.

Клітини рослин, на відміну від вирощування рослин у відкритому ґрунті, де вони часто зазнають неконтрольованого впливу біотичних і абіотичних факторів навколишнього середовища, можна культивувати в контрольованих умовах на поживному середовищі певного складу. Культивування клітин рослин у ферментерах забезпечує постійне одержання свіжого матеріалу впродовж року незалежно від кліматичних і сезонних змін [1, с.976].

Таким чином, оптимізація методів отримання калюсних культур клітин женьшеню, вивчення зростання отриманих культур і утворення в них вторинних метаболітів (гінзенозидів) представляє як теоретичну, так і практичну значимість.

Об'єкт дослідження: процес отримання калюсних культур женьшеню.

Предмет дослідження: калюсні культури женьшеню.

Мета роботи: удосконалення технології калюсних культур женьшеню.

Методи дослідження: аналітичні, математичні.

Завдання роботи полягало у вирішенні таких задач:

1. Охарактеризувати культури рослинних клітин і тканин та процес їх культивування
2. Дослідити технологію культивування калюсних культур женьшеню.
3. Удосконалити технологічну схему виробництва калюсних культур женьшеню.

РОЗДІЛ ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Особливості культури рослинних клітин і тканин

Термін «культура клітин, тканин і органів рослин» застосовується до вирощуваних частин рослини таким як: ізолювані зародки, ізолювані органи (кінчики коренів, меристеми пагонів, листові примордії, частини молодих квіток і плодів), калюсних тканин, суспензійна культура, культура протопластів (рис. 1.1) [10, с.74].

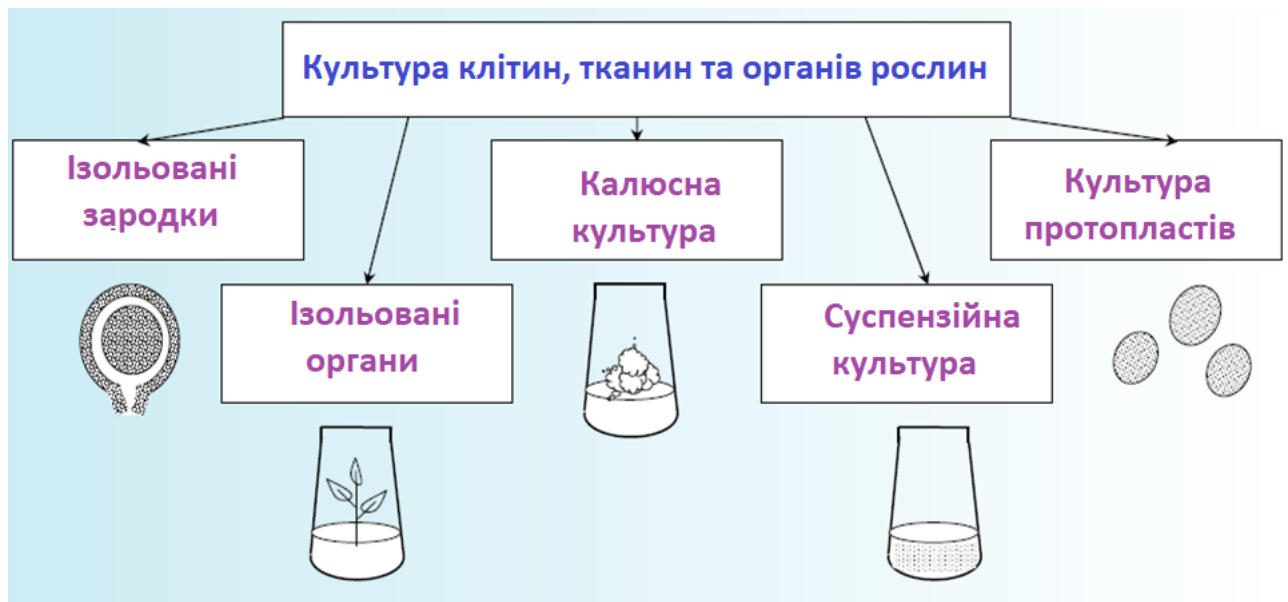


Рис. 1.1 Варіанти культивування клітин, тканин і органів рослин на штучних поживних середовищах

Метод культури клітин і тканин широко застосовується у різних галузях біології завдяки простоті тканинних та клітинних моделей у порівнянні з рослинним організмом, а також завдяки можливості точно регулювати ріст та розвиток ізолюваних систем і контролювати метаболізм [25, с.133].

Одна з важливих особливостей культури клітин і тканин – збереження здатності до синтезу вторинних речовин, притаманних вихідній рослині.

Культура клітин і тканин – порівняно молода галузь науки. Вперше культуру тканин барвінку рожевого отримав Уайт у 1945 році. В СРСР освоєння методу культури тканин розпочато з кінця 50-х років ХХ століття і пов'язане з ім'ям Р.Г. Бутенко. Роботи О.Г. Воллосовича з культурою тканин стебла раувольфії зміїної привели до створення високопродуктивних аймаліноміст-ких штамів, а при культивуванні клітин кореня раувольфії зміїної були отримані штами, котрі синтезують удвічі більше резерпіну, ніж вихідні клітини. Досягнуто певних успіхів у культивуванні раувольфії зміїної, барвінка рожевого, стефанії гладенької, дурману індійського, женьшеню звичайного, деяких видів наперстянки. Із культивованих тканин виготовляють препарати "Аймалін", "Вінбластин", "Вінкрисин", "Екстракт кореня женьшеню" [25, с.217].

Набір об'єктів рослинного походження, які можна перевести в культуру *in vitro*, досить об'ємний, серед них переважно придатними є дводольні трав'янисті рослини, потім слідує однодольні трав'янисті види, слідом - зернові культури. Важче створити середовище для стабільних *in vitro* культур деревних рослин, особливо голонасінних [31, с.82].

У більшій частині рослин клітини за певних умов здатні повертатися в «активну частину циклу» знову повертаючись до поділу. Такий процес називається дедиференціації, який є важливим для процесу зростання і розвитку рослин [33, с.55]. В основі методу створення культури клітин, тканин і органів рослин лежить виняткова властивість рослинної клітини - тотипотентність. Тотипотентність – властивість клітин здійснювати генетичну інформацію ядра, що забезпечує їх диференціювання, а також розвиток до цілого організму [30, с.339]. У тварин тотипотентність характерна лише деяким клітинам кишковопорожнинних, а у вищих тварин з виникненням спеціалізації клітин (починаючи з ранніх етапів ембріогенезу) тотипотентність не провадиться. У рослин, на відміну від тварин, в природних умовах тотипотентність виявляють і спеціалізовані клітини (при загоєнні ран). У такому варіанті на травмованій частині рослини в результаті дезорганізований проліферації клітин відбувається утворення калюсу (лат. «мозоль») [32, с.30].

Індукцію калюсу так само можна бачити при щепленні підщепи і прищепи. Спочатку калюсом є недиференційовані клітини, але в подальшому досяжна вторинна диференціація з виникненням спеціалізованих тканин і органів. Слід підкреслити, що тотипотентність відкриває величезні можливості для генетичної інженерії рослин і біотехнології, дає можливість моделювати виняткові диференціювання і емпірично вивчати феномен епігенетичної спадковості [46, с.12].

1.1.1. Культури клітин рослин як біологічні моделі

Метод культури клітин і тканин рослин має наступні переваги:

- 1) легкість клітинних моделей;
- 2) відсутність корелятивних взаємодій і контролю з боку інших тканин, органів, цілого організму, що робить можливим вивчення стан клітини на рівні первинних елементарних процесів у відповідь на впливу ззовні;
- 3) можливість швидко добувати потрібну масу в асептичних умовах;
- 4) контроль умов культивування за багатьма параметрами [36, с.24].

Культури клітин вищих рослин мають дві сфери застосування:

1. Вивчення клітини поза організмом обумовлює основну роль клітинних культур в фундаментальних дослідженнях з генетики, фізіології, цитології та молекулярної біології рослин. Популяціям рослинних клітин властиві специфічні особливості: генетичні, епігенетичні (залежні від виборчої активності генів) і фізіологічні. При довготривалому культивуванні гетерогенної за цими ознаками популяції йде розмноження клітин, фенотип і генотип якої відповідає даним умовам вирощування, популяція еволюціонує [27, с.13]. Все це вказує на те, що культури клітин є новою експериментально створеної біологічною системою. Культури клітин і тканин можуть служити адекватною моделлю при вивченні метаболізму і його регуляції в клітинах і тканинах цілого рослини.

2. Культивовані клітини вищих рослин можуть розглядатися як типові мікрооб'єкти, досить прості в культурі, що дозволяє застосовувати до них не тільки апаратуру і технологію, але і логіку експериментів, прийнятих в мікробіології.

Разом з тим, культивовані клітини здатні перейти до програми розвитку, при якій з культивованої соматичної клітини виникає ціла рослина, здатне до росту і розмноження [24, с.128]. Клітини рослин *in vitro* є зручною моделлю для вивчення багатьох фізіолого-біохімічних процесів і генетики рослинного організму.

Роль культури ізолюваних клітин і тканин в біотехнології слід розглядати в декількох напрямках. Перше пов'язано зі здатністю ізолюваних рослинних клітин виробляти цінні для медицини, парфумерії, косметології та інших галузей промисловості речовини вторинного метаболізму. Продуктивність культивованих клітин в результаті клітинної селекції може значно перевищувати продуктивність цілих рослин, що широко використовується для створення технологій промислового отримання БАР. Крім біосинтезу потрібних з'єднань, культивовані клітини здатні до біотрансформації, тобто перетворенню дешевих попередників в цінний кінцевий продукт [24, с.131].

Другий напрямок - це мікроклональне розмноження рослин, використання культури ізолюваних тканин для розмноження і оздоровлення посадкового матеріалу, що дозволяє отримувати від однієї меристеми десятки тисяч рослин на рік, при цьому створюється система безвірусного рослинництва. Третій напрям - використання ізолюваних клітин і тканин в селекції рослин. Метод відкриває нові можливості для розширення генетичних основ, полегшення і прискорення селекційного процесу, конструювання принципово нових форм рослин [22, с.10].

Таким чином, в даний час розвиток в рослинництві, фармакології, харчовій, парфумерній, хімічній промисловості пов'язане з подальшим розвитком клітинних технологій рослин і їх прискореним впровадженням у народне виробництво.

1.1.2 Основні принципи культивування рослинного матеріалу *in vitro*

Відповідно до класифікації Мурасіге, процес мікроклонального розмноження можна здійснювати наступними шляхами:

1. Утворення адвентивних пагонів тканинами експлантів.
2. Активація пазушних меристем.

3. Виникнення адвентивних пагонів в калюсі.

4. Соматичний ембріогенез в калюсних тканинах.

5. Формування придаткових ембріодів в тканині первинних соматичних зародків (розподіл первинних ембріодів).

6. Індукція соматичного ембріогенезу в клітинах експлантів [33, с.62].

Основний метод, який використовується при мікроклональному розмноженні рослин - активація розвитку вже існуючих в рослині меристем. Він заснований на знятті апікального домінування. Цього можна досягти двома шляхами:

а) додаванням в живильне середовище речовин цитокінінового і ауксинового ряду, які індукують розвиток численних пазушних пагонів.

Як правило, в якості цитокінінів використовують 6-бензіламінопурін (БАП) або 6-фурфуріламінопурін (кінетин) і зеатин. Ауксини викликають процес дедиференціювання клітини, що готує її до поділу, а цитокініни - проліферацію дедиференційованих клітин [33, с.63].

б) видаленням верхівкової меристеми стебла і подальшим мікрочеренкуванням пагонів *in vitro* на безгормональному середовищі. Отримані таким чином пагони відділяють від первинного експланту і знову самостійно переносять на свіжі поживні середовища, викликають проліферацію пазушних меристем і призводять до виникнення пагонів більш високих порядків [33, 63].

Найчастіше в якості експлантів використовують верхівкові або пазушні бруньки, які відокремлюють з пагонів і поміщають на поживне середовище з цитокінінами. Ділять пучки пагонів, черенкують і переносять на свіжо підготовлене поживне середовище. Після серії пасажів, додаючи в поживне середовище ауксини, пагони укорінують *in vitro*, а потім переносять в ґрунт, де створюють середовище, яке сприятиме адаптації рослин. На даний момент цей метод широко використовується у виробництві посадкового матеріалу технічних і овочевих сільськогосподарських культур, а також для розмноження культур промислового квітництва, тропічних і субтропічних рослин, плодових і ягідних культур, деревних рослин [9, с.51].

Другий метод - індукція адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантів. Він заснований на здатності ізольованих частин рослини при сприятливих умовах відтворювати дефіцитні органи, регенерувати таким чином цілі рослини. Можна домогтися створення адвентивних бруньок майже з будь-яких органів і тканин рослини (ізольованого зародка, листа, стебла, лусочок цибулин, сегментів коренів і зачатків суцвіть). Цей процес відбувається на поживних середовищах, що містять цитокініни в співвідношенні з ауксинами 10:1 або 100:1 [9, с.51].

Третій метод, що практикується при мікроклональному розмноженні, ґрунтується на диференціації з соматичних клітин зародишоподібних структур, які за своїм виглядом нагадують зиготичні зародки. Цей метод отримав назву соматичного ембріогенезу. На відміну від розвитку *in vivo*, соматичні зародки розвиваються асексуально (поза зародкового мішка) і за своїм зовнішнім виглядом нагадують біполярні структури, у яких синхронно спостерігається розвиток апікальних меристем стебла і кореня. Згідно Стеварду, соматичні зародки проходять 3 стадії розвитку: глобулярну, серцеподібну, торпедовидну і в кінцевому підсумку мають тенденцію розвитку в проросток [9, с.52].

Четвертий метод мікроклонального розмноження - диференціація адвентивних бруньок в первинній та пересадковій калюсній тканині. Практично він мало використовується з метою отримання посадкового матеріалу *in vitro*. Це пов'язано з тим, що при частому пасируванні калюсних тканин може змінюватися плоідність рослин регенерантів, спостерігаються структурні перебудови хромосом і накопичення генних мутацій. Разом з генетичними змінами відзначаються і морфологічні: низькорослість, аномальне жилкування листків, укорочені міжвузля, знижена стійкість до хвороб і патогенів. У той же час, деякі недоліки цього методу в селекційній роботі обертаються перевагами. У деяких випадках він є єдиною можливим способом розмноження рослин в культурі тканин [9, с.52].

1.2. Отримання калюсу і його культивування

Культура рослинних клітин і тканин ґрунтується на вирощуванні недиференційованої калюсної маси в стерильних умовах на штучних поживних середовищах.

Калюс являє собою однорідну недиференційовану біомасу, що виростає з експлантата (ізолюваний сегмент частини рослини) на поживному середовищі в асептичних умовах. У природі калюсоутворення зустрічається як реакція на пошкодження рослини, коли на місці поранення утворюється нарід (мозоль). Від інфекції калюс захищають імунні механізми організму [11, с.326].

Калюсну тканину *in vitro* можна отримати практично з будь-якої живої тканини рослини (рис. 1.2).

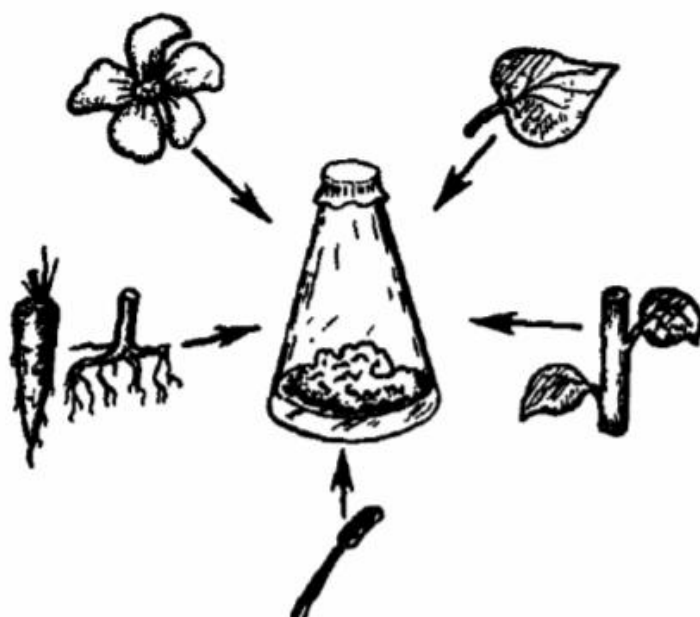


Рис. 1.2 Типи експлантів, що використовуються для отримання калюсних тканин

Підбір експлантів в основному залежить від мети дослідження. Потрібно переконатися чи підходить біологічний стан експлантів. Молоді тканини краще підходять для отримання калюсу, ніж зрілі. Кращими експлантами є тканини, відповідальні за проліферацію. Для індукції калюсогенеза небажано

використовувати здеревілі тканини, старі тканини з низьким рівнем метаболізму, погано проліферуючі тканини (м'якоть плодів та ін.), тканини, покриті воском і суберином, і т.п. [11, с.27]

Пророщування стерилізованого насіння в асептичних умовах часто дає найбільш придатний матеріал для індукції калюсу. Процес отримання первинного калюсу і його подальшого культивування вимагають стерильності. Зазвичай використовують відомі методики стерилізації або розробляють їх експериментально для кожного конкретного об'єкта [10, с.84].

Механічне пошкодження тканини експлантів є досить важливим фактором для індукції калюсогенезу. Ще з часів Габерландта швидкий розподіл калюсних клітин пов'язувався з виділенням рослиною в зв'язку з травмою некрогормонів. Утворення калюсу залежить від розмірів експлантів. Для кожного виду рослин існує мінімальний критичний розмір експлантів - мінімальна маса експлантів, при якій відбувається калюсогенез. Він сильно варіює у різних видів. При його зменшенні неможливо індукувати утворення калюсу. Наприклад, експланти з коренів моркви масою всього 3,8 мг цілком життєздатні для активного зростання калюсу, тоді як маса аналогічного експланту земляної груші занадто мала для індукції калюсогенезу. Це, очевидно, залежить від розмірів і, отже, кількості клітин в експлантів різних видів рослин. Багато тканин мають фізіологічну полярність, тому важлива певна орієнтація експлантів в просторі при перенесенні їх на поживне середовище [10, с.84].

Кінчики коренів легко утворюють калюс, якщо вони поміщені на агар горизонтально. Сегменти стебла краще утворюють калюс, якщо їх помістити вертикально, одним з кінців зануривши в агар. При цьому калюс утворюється більш інтенсивно на стороні експлантів, яка на материнській рослині звернена до кореня. У разі ізоляції експлантів з коренеплодів полярність не має істотного значення [25, с. 412].

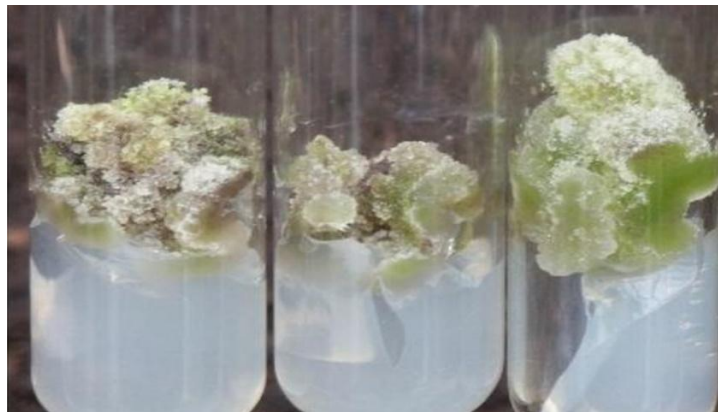
Для утворення калюсних тканин *in vitro* клітини експлантів повинні дедиференціюватися, тобто втратити специфічні характеристики вихідної тканини. Перебудова клітин експлантів різних спеціалізацій, попередня калюсогенезу,

відбувається подібним чином. Клітини експлантів втрачають речовини - ліпіди, крохмаль, білки. Фотосинтезуючі клітини втрачають хлорофіл і ліпіди хлоропластів, але при цьому зростає кількість амілопластів. Руйнується апарат Гольджі, перебудовується ендоплазматичний ретикулум і елементи цитоскелету, збільшується число полісом. Клітина синтезує РНК і ДНК, і починається експресія генів, притаманна калюсним клітинам. зникають тканиноспецифічні білки-антигени і з'являються білки, специфічні для клітин, які діляться. Ці спостереження свідчать про зміну активності генів і білкового апарату клітин при дедиференціації. В результаті процесу дедиференціації відбувається утворення *in vitro* первинного калюсу, що часто буває важким процесом, тому що тканини різних видів рослин і навіть різних частин рослини вимагають для дедиференціації і калюсогенезу різної кількості і співвідношення гормонів [25, с.415].

Калюсну тканину, яку вирощують поверхневим способом на агарі, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, які не мають строго визначеної анатомічної структури. Однак було б помилково думати, що калюсні тканини одноманітні. Дослідники ділять їх на типи за такими морфологічними ознаками, як колір, консистенція, характер поверхні, а також за інтенсивністю росту і здатності до зеленіння [31, с.65].

Залежно від консистенції калюсні тканини бувають пухкими, середньощільні і щільні. Пухкі калюси складаються з сильно оводнених клітин і легко розпадаються на дрібні агрегати. Середньо щільні калюси мають добре виражені місця меристематичної активності, їх клітини можуть бути відокремлені один від одного сильним збовтуванням. Для щільних калюсів характерні дрібні клітини, а також наявність виражених зон з камбіальними і трахеєподібними елементами. Відзначено, що компактні калюси можуть дати початок пухким тканинам, але не навпаки. У разі отримання первинного калюсу при оптимально підібраному середовищі частина експлантів зазвичай за 3-6 тижнів утворює калюси в кількості достатньому для пересадки. Для того щоб не відбулося старіння, втрати здатності до поділу і відмирання калюсних клітин, отриманий калюс переносять на свіже поживне середовище. Цю операцію називають пасируванням. Первинний калюс

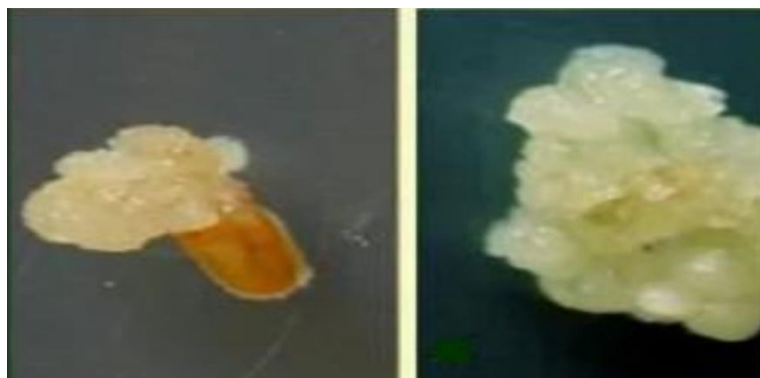
поділяють на частини, які надалі культивуються окремо. Слід звернути увагу на розміри шматочків калюсу, які переносяться на свіже поживне середовище: якщо вони занадто малі, то подальше зростання калюсу може бути пригнічено. Оптимальний розмір пересаджуваного калюсу залежить від виду рослини. В деяких випадках застосовується спосіб субкультивування без поділу отриманого калюсу на окремі шматочки, при якому після пересадки на свіже середовище, калюс продовжує рости всім обсягом [48, с.42]. На рис.1.3 (а-в) відображено утворення калюсу з різних видів експлантів.



а



б



в

Рис 1.3 Утворення калюсу: а – з проростків рослини, б – з листя рослини, в – з насінини рослини

Калюсні тканини в умовах *in vitro* можна вирощувати невизначено довго, періодично пересаджуючи їх на свіже поживне середовище. Вдало отримані лінії калюсних культур вимагають регулярної пересадки приблизно через кожні 4 тижні. Таким чином, перетворення будь-якої клітини в калюсну передуює процес глибокої біохімічної і структурної перебудови. Додавання до середовища екзогенних гормонів призводить до початку калюсогенезу. Обов'язкова умова дедиференціації клітини і її перетворення в калюсну клітинц - присутність в поживному середовищі представників двох груп регуляторів росту: ауксинів і цитокінінів [48, с.43].

1.3. Сучасні методи культивування калюсних культур рослин

Здатність до синтезу необхідних продуктів метаболізму залежить в основному від вихідної структури експлантатів, від їх наступних гістологічних особливостей, від їх диференціації в процесі калюсогенезу і від цитогенетичної характеристики клітин, добір яких йде від пасажу пересівання до пасажу, а також і від специфіки поживного середовища.

1.3.1 Особливості складу поживного середовища для культивування калюсних культур рослин

Для культивування клітин та тканин рослин застосовують різні поживні речовини. До їх складу входять макроелементи: S, P, K Ca, Mg; мікроелементи: Mn, B, Zn, Mo, I, Cu, Co; вітаміни: тіамін нікотинова кислота, біотин, рибофлавін, пантотенова кислота; вуглеводи: сахароза, глюкоза, фруктоза, лактоза; три групи фітогормонів: цитокініни, ауксини, гібереліни. Цитокініни – кінетин, зеатин та

інші синтезуються у коренях рослин. Вони відіграють першорядну роль у процесі диференціювання клітин, що приводить до утворення калюсної тканини, уповільнюють старіння органів. Ауксини – 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д), індомасяна кислота (ІМК), нафтілоцтова кислота (НОК) – синтезуються в апікальній меристемі стебла, меристемі кореня. Ауксини впливають на поділ, розтягнення, диференціювання клітин, стимулюють регенерацію пагонів і утворення коренів. Гібереліни - визивають і підсилюють ріст і витягування стебла, листків, знімають стан покою у листках і насінні, їх вносять у середовище для прискорення формування надземної частини рослин [11, 328].

Найчастіше застосовуються поживні середовища Мурасиге-Скуга, Гамборга і Евелега та ін., склад яких відображено в таблиці 1.1.

Зараз уже розроблено значну кількість живильних середовищ для культивування *in vitro* органів, тканин і клітин рослин, більшість з них є модифікаціями основних живильних середовищ. До складу будь-якого живильного середовища для вирощування культури ізольованої рослинної тканини входять наступні групи речовин:

- мінеральні солі – макро- і мікроелементи;
- вуглеводи;
- вітаміни;
- амінокислоти;
- стимулятори росту - синтетичного і натурального походження;
- вода;
- агар [18, с.33].

У зв'язку з необхідністю змінювати склад живильного середовища під час пошуку оптимуму для нової, ще невипробуваної в культурі, тканини варто зупинитися на характеристиці особливостей живлення ізольованих тканин.

Кращою формою азотного живлення рослинних тканин є нітрати, які як основне джерело азоту вводяться у середовища у концентраціях 2-25 мМ. Спроби використати джерелом азоту нітрити показали, що вони не могли замінити нітрати: низькі концентрації нітритів були недостатні для оптимального росту рослинних

тканин, а великі - токсичні. Кращі результати, ніж при використанні нітритів, отримують при застосуванні, в якості джерела азоту, амонійних солей. Однак, амоній значно менш ефективний як джерело азоту ніж нітрати. Проте, заміна 10-20% нітратів на солі амонію покращує ріст рослинних тканин. Так до складу середовища Гамборга, на якому добре ростуть дводольні і однодольні рослини, крім нітрату (25 мМ) входять і амонійні солі (2 мМ). У деяких випадках для інтенсивного росту калюсних і суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату і аміаку доцільно збільшити до 60 мМ [18, с.34].

Табл. 1.1

Склад поживних середовищ, що використовують при культивуванні клітин і тканин

Компонент середовища	Концентрація поживних середовищ, мг/л			
	Мурасіге і Скуга, 1962	Гамборга і Евелега, 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

Азот живильного середовища впливає на морфогенетичні можливості тканини: залежно від нітратної чи амонійної форми азоту індуються пагони або корені, бруньки або ембріюди [38, с.73].

При культивуванні рослинних тканин як єдине джерело азоту можна використовувати амінокислоти в L-конформації. Але для більшості культур тканин одна амінокислота або навіть їхня суміш неефективні як єдине джерело азоту, бо ріст цих культур значно повільніший, ніж на середовищах з нітратами. Це може бути обумовлене тим, що амінокислоти не завжди можуть активно дезамінуватися або аміак, що утворився, не може бути використаним для синтезу первинних

продуктів. Другою причиною може бути потреба в самих нітратах, оскільки деякі проміжні сполуки відновлення нітратів беруть участь в біосинтезі важливих азотистих метаболітів. Слід зазначити, що ріст ряду ізольованих рослинних тканин активується при введенні до складу нітратвмісного середовища окремих амінокислот, найчастіше гліцину, або їхніх сумішей, наприклад, гідролізат казеїну, пектон [38, с.74].

Сірку вводять до складу живильних середовищ у вигляді сульфату, сульфїту, цистеїну, глутатіону або метіоніну. Для більшості тканин найкращим джерелом сірки є сульфати [39, с.5].

Для росту калюсних тканин і ізольованих органів необхідним компонентом середовищ є фосфор. Тканини, які інтенсивно ростуть, особливо чутливі до вмісту фосфору у живильному середовищі і краще ростуть на середовищах багатих фосфором. Як джерело фосфорного живлення, в основному, використовується ортофосфат, але можна використовувати різні фосфати цукрів [38, с.75].

Залізо вводиться у вигляді неорганічних солей (FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) і солей органічних кислот (цитрат і тартрат заліза). Але метаболіти, які виділяють культури тканин, і рН середовища впливають на засвоєння заліза рослинними тканинами. Тому більшість середовищ містять цей елемент в хелатованій формі у комплексі з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА). Це покращує доступність заліза при рН до 8,0 впродовж всього періоду росту культури, тоді як відсутність хелатуючого агента може дуже швидко призвести до нестачі його [38, с.75].

Потреба тканини в елементах мінерального живлення залежить від її фізіологічних особливостей. Для молодих швидкоростучих тканин, необхідна наявність у середовищі високих доз калію (K^+), тоді як старі тканини, навпаки, вибагливі до наявності кальцію (Ca^{2+}). Так, оптимальна доза кальцію для молодієї тканини моркви – 0,25 мМ, для старої тканини ця доза підвищується до 3 мМ [31, с.43].

При відсутності у середовищі калію (K^+) уже в першому пасажі культури тканин моркви спостерігається пригнічення росту і некрози; у другому пасажі на такому живильному середовищі ріст припиняється і тканина відмирає. Однак

перенесення на середовище, яке нормально забезпечене калієм (K^+), поновлює ріст тканини моркви, навіть якщо перед цим її вирощували на середовищі без калію (K^+) впродовж двох пасажів [10, с.341].

В результаті ретельного вивчення мінерального живлення ізолюваних рослинних тканин дослідники дійшли висновку, що відсутність у живильному середовищі N, K, Ca, Mg, S, P призводить до загибелі культури у першому або у другому пасажі. Наявність Na^+ і Cl^- не обов'язкова, хоча додавання NaCl в середовище стимулює ріст рослинних тканин. Для більшості елементів існує оптимум концентрації, але його перевищення інколи має токсичну дію [10, с.234].

Крім макроелементів до складу більшості живильних середовищ входять мікроелементи. Додавання до живильного середовища мікроелементів особливо важливе при культивуванні тканин в рідкому середовищі. Відсутність мікроелементів зменшує інтенсивність росту культур на 40 % у першому пасажі і приводить культури до загибелі протягом двох наступних [9, с.287].

При вирощуванні тканин на агаровому живильному середовищі вони не так гостро реагують на відсутність мікроелементів, так як в агарі міститься багато мікроелементів і деякі макроелементи. Однак повнота вмісту мікроелементів в агарі викликає сумніви, а тому більшість дослідників додають повну суміш мікроелементів і до агарових середовищ. Найчастіше використовують суміш мікроелементів середовища Мурасиге і Скуга (МС) [9, с.287].

Культури тканин, навіть ті, що зеленіють на світлі не автотрофні відносно вуглеводного живлення. При ізолюванні і перенесенні на живильне середовище шматочків хлорофілоносних тканин, вони, як правило, втрачають хлорофіл. При вирощуванні на світлі одні тканини позбавляються хлорофілу (тканина серцевинної паренхіми тютюну), інші тканини на світлі зеленіють (тканини моркви, барвінку рожевого), але не здатні забезпечити себе повністю вуглеводами за рахунок фотосинтезу, і їх необхідно вирощувати на живильних середовищах, які містять вуглеводи [53, с.23].

Найкращим джерелом вуглеводного живлення для більшості рослинних тканин є сахароза або глюкоза, звичайно у концентрації 2 – 5 %. Але для деяких

тканин оптимальними джерелами вуглецю слугують фруктоза, маноза або галактоза. На середовищах з пентозами ізольовані тканини рослин не ростуть, за виключенням ксилози, яка є хорошим джерелом вуглецю для тканини моркви [27, с.198].

Полісахариди, як правило, не використовують як джерело вуглеводного живлення при вирощуванні культур рослинних тканин. Але, оскільки, деякі тканини здатні виділяти у середовище гідролітичні ферменти, наприклад, амілазу, то вони можуть рости на середовищах з розчинним крохмалем. Здатністю засвоювати полісахариди часто характеризуються тканини деревних рослин, а також тканини пухлинного походження [23, с.62]

Часто оптимальною умовою для росту тканини є наявність в середовищі різних цукрів. Так для підтримання росту тканини топінамбура оптимальною є суміш 0,1 М сахарози та 0,11 М глюкози [10, с.213].

До складу середовищ для культивування рослинних клітин, тканин і органів рослин входять вітаміни. Хоча більшість тканин, що культивуються *in vitro*, здатна до синтезу всіх потрібних для їх життєдіяльності вітамінів, але вони синтезують вітаміни в субоптимальних кількостях і при додаванні вітамінів до середовища ріст тканини покращується. Крім того, внесення вітамінів в живильне середовище може мати формативний ефект. Найважливішу роль у рості культури тканин відіграють вітаміни групи В (тіамін, піридоксин, нікотинова кислота), мезоінозит. Іноді до середовища вводять Са-пантотенат і холінхлорид. Більшість вітамінів, що додають до живильного середовища, входять до складу ферментів, які каталізують різні важливі реакції [50, с.39].

Тіамін (вітамін В1) – бере участь у процесах перетворення вуглеводів (входить до складу піруватдекарбоксилази). До середовища вводиться у кількості 0,1 – 10 мг/л.

Піридоксин (вітамін В6) – входить до складу ферментів декарбоксилювання і переамінування амінокислот. В середовища вводиться 0,1 – 1 мг/л В6 [50, с.23].

Нікотинова кислота (вітамін РР) – входить до складу окисно-відновних ферментів дегідрогеназ. В живильне середовище РР вводиться в концентрації 0,5 – 1 мг/л [6].

Найкращий вплив на ріст культури ізольованих тканин має додавання до середовища суміші вітамінів. Найчастіше використовують суміші вітамінів Уайта (складається з 3 компонентів), Мореля (6 компонентів), Хендерсона (10 компонентів) [13].

Для росту і диференціації будь-яких рослинних тканин і клітин при культивуванні їх на штучних живильних середовищах необхідна наявність у живильному середовищі стимуляторів росту. Без додавання до живильного середовища стимулюючих речовин в культурі здатні рости тільки пухлинні тканини (галові пухлини – їх утворення викликають галові кліщі; пухлини вірусного походження) і камбіальні тканини обмеженої кількості видів рослин (певних сортів моркви, а також верби і ожини). Однак при тривалому культивуванні тканини і ці останні потребують додавання до живильного середовища стимуляторів росту.

Окрему, групу гормонезалежних тканин становлять, так звані, „звиклі” тканини. Такі тканини утворюють клітини, що виникають у популяції нормальних клітин під час культивування. Вважають, що їхня поява пов’язана зі зміною активності генів [17].

До речовин, які стимулюють ріст ізольованих тканин належать фітогормони: ауксини, цитокініни та гібереліни.

Багато дослідників для отримання первинної проліферації тканини в культурі і для підтримки інтенсивного недиференційованого росту тканини в пасажах додають до живильного середовища речовини невизначеного хімічного складу. Найчастіше використовують ендосперм кокосового горіха (кокосове молоко), кінського каштана, грецького горіха, кукурудзи, пшениці. Також широко використовують дріжджовий та солодовий екстракт (із пророслих зернівок ячменю), екстракти із різних частин рослин (листіків, молодих частин стебла, плодів – томату, апельсину і кавуна). Ці екстракти виявляють рістактивуючі властивості [19].

Для росту і диференціації будь-яких рослинних клітин необхідні ауксини і цитокініни. Оскільки різні клітини і тканини в культурі відрізняються за здатністю до автономного синтезу і метаболізму окремих груп фітогормонів, то у зв'язку з цим їхній ріст у різній мірі залежить від забезпечення екзогенними регуляторами росту [17].

Із ауксинів для отримання і підтримання культури тканин найбільше використовуються β -індолілоцтова кислота (ІОК), α -нафтилоцтова кислота (НОК) і 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота (2,4-Д) у концентраціях 1–30 мг/л, 0,1–2 мг/л, 1 мг/л відповідно [48].

Для індукції калюсоутворення звичайно використовують 2,4-Д, яка у 300 разів активніша ніж ІОК і у 10 разів активніша ніж НОК. Для індукції калюсоутворення звичайно використовують високі концентрації ауксинів, а при послідуєчих пересадках тканина може рости при вмісті ауксинів у 10 разів меншому. Для отримання калюсних культур дводольних рослин в середовища додається ІОК в концентраціях 1–10 мг/л. При послідуєчих пересадках концентрацію зменшують до 0,1–0,05 мг/л [48].

Для отримання калюсу однодольних рослин використовуються досить високі дози 2,4-Д – 2–10 мг/л. Винятком є тканина ендосперму кукурудзи, яка здатна до автономного синтезу ауксину і росте на середовищі без регуляторів росту. Цитокініни, а саме кінетин, були відкриті Скугом при вивченні росту калюсу тютюну. Встановлено, що він не тільки активує клітинні поділи, але є обов'язковим компонентом індукування органогенезу. Кінетин значно підвищує ріст багатьох калюсних культур, наприклад моркви, сої, топінамбура. Кінетин вводиться в середовище у концентраціях 0,001–10 мг/л [25].

Крім кінетину для культивування ізольованих рослинних тканин використовують і інші цитокініни, зокрема, бензиламінопурин (БАП) і зеатин, які мають більш високу активність підтримки росту та індукції органогенезу. Є дані, що високі концентрації кінетину (0,1 – 1 мг/л) можуть забезпечити ріст ауксиннезалежних калюсних тканин [47].

Цитокініни разом з ауксинами беруть участь в процесах органогенезу у рослин. Для закладення у калюсі коренів або пагонів необхідні певні концентрації і співвідношення цитокініну і ауксину. Для диференціації коренів у калюсі тютюну необхідно 2 мг/л ІОК і 0,02 мг/л кінетину (100:1). Підвищення концентрації кінетину до 0,5 – 1 мг/л індукує формування стеблових бруньок. Таким чином, зміщення співвідношення концентрацій ауксин-цитокінін в бік цитокініну сприяє утворенню стеблових бруньок, а в бік ауксину – закладанню коренів. Однак, як правило, і для індукції коренеутворення необхідна наявність цитокініну в низьких концентраціях [42].

Таким чином, ауксини додають для індукції клітинного поділу і диференціації; вони активують утворення коренів, регулюють регенерацію пагона. Цитокініни активують і прискорюють процес дедиференціації, клітинного поділу, калюсоутворення, активують диференціацію стеблових бруньок. Гібереліни, як правило, не є необхідними для росту клітин у культурі, але Стюард і Стріт (1971) вказують, що при низькій густині клітин явора у суспензії гібереліни необхідні. Крім цього гібереліни активують ріст і витягування стебла, тобто сприяють отриманню рослин з потужною надземною частиною [9].

Для індукції первинного калюсу і рідше для підтримки його росту іноді до живильного середовища додають рослинні екстракти або соки певного складу, які мають рістактивуючі властивості. Серед них: кокосове молоко, ендосперм рослин, солодовий та дріжджовий екстракти, березовий сік і пасока інших рослин, кукурудзяний екстракт, томатний та апельсиновий сік, екстракти із стебел і листків, екстракти із пухлинних тканин [10].

При вирощуванні тканин найбільш поширеним способом на твердому живильному середовищі звичайно використовують агар у концентраціях 6-10 г/л. Желатинові живильні середовища не придатні для культури, так як желатина токсична для тканин рослин. Агар – це полісахарид, який добувають із деяких морських водоростей зростаючих біля берегів Далекого Сходу, Китаю та Японії. Звичайний агар має вигляд пластинок, зерен або жовтувато-білого порошку. Він утворює з водою гель, який плавиться при 1000С і загусає при 450°С. Агар втрачає

здатність утворювати гель у кислому середовищі. Агар містить 0,15 % азоту і 3,5 % зольних елементів. У його складі також були виявлені вітаміни – тіамін і біотин [49].

Бактеріальний агар „Difco” містить значно менше різних домішок і дає кращі результати, ніж звичайний агар для культури тканин. Останнім часом випробовують інші гелеутворюючі речовини, які могли б замінити агар: біогелі, поліакриламідні гелі, карагінан, перліт та інші полімери [9].

Відомо, що в нативних умовах рослинна клітина функціонує у вузьких межах коливань концентрації іонів водню. Відносна стабільність величини рН у внутрішньому і оточуючому клітину середовищах підтримується буферними системами, в яких найважливішу роль виконують білкові молекули як амфоліти. Ці особливості варто враховувати і при вирощуванні клітин тканин *in vitro*, бо до складу живильних середовищ входить ряд складних або активних компонентів, поглинання і функціонування яких залежить від міри протонізації всередині клітини і в оточуючому середовищі. Тому відносну стабілізацію рН середовища необхідно підтримувати введенням в нього хелатованих сполук або відповідних буферів. Стійкість і засвоєння цілого ряду компонентів живильного середовища залежить від величини рН. Найбільш чутливі до рН такі компоненти середовища: ІОК, ГАЗ, вітаміни (В1, пантотенова кислота). При низьких значеннях рН не відбувається желатинування агар-агару. Від рН середовища залежить доступність для тканин різних форм заліза [10].

Більшість культур ростуть на середовищах з рН 5,5–5,8. Звичайно рН готового середовища встановлюється за допомогою 10 % або 1 N розчину КОН або NaOH, або 1 N HCl перед автоклавуванням. Однак, слід враховувати, що під час автоклавування рН середовища змінюється, а саме зменшується в результаті утворення цукрових кислот. Особлива увага надається встановленню оптимального рН в суспензійних культурах, так як останні здатні змінювати його значення за рахунок метаболітів, що вони виділяють в живильне середовище. Можливо, у зв'язку з цим культура тканин арахісу здатна рости на середовищах з рН від 3,4 до

8,2 (оптимальне значення 6,4), а клітини кореня сої – на середовищах з рН від 4,5 – 5,5 [27].

Тканини деяких рослин при культивуванні *in vitro* виділяють в середовище фенольні сполуки. Середовище швидко темніє і тканина відмирає. Щоб запобігти цьому необхідно додавати в середовище активоване вугілля (1-2 г/л) [25].

На першому етапі, відразу після стерильного виділення частини рослини, до складу поживного середовища часто вводять антиоксиданти – цистеїн, глутатіон, етанол, аскорбінову кислоту, які запобігають активації гідролітичних ферментів і загибелі експлантата. На цьому ж етапі для всмоктування шкідливих продуктів метаболізму, що виділяються експлантатами, до середовища вносять активоване вугілля. Але останнє адсорбує і необхідні клітинам фітогормони, тому у присутності вугілля кількість фітогормонів має бути збільшена на порядок проти звичайної [10].

На початковому етапі культивування клітин і тканин у поживні середовища вводять дріжджовий екстракт, гідролізат козеїну, амінокислоти тощо. Ці речовини провокують проростання спор і дозволяють виявити приховану інфекцію в експлантатах. У подальшому на етапі переприщеплюваного культивування (вирощування переприщеплених клітин та тканин) використовують стандартні поживні середовища, до складу яких, в залежності від мети робот, вводять необхідні концентрації фітогормонів [9].

У наш час виробляють кілька типів готових поживних середовищ у вигляді сухих порошків, що містять усі необхідні компоненти, за винятком регуляторів росту, сахарози та агару. Готові середовища зручні для культивування відомих калюсних культур, але при вирощуванні нових тканин необхідний пошук оптимального поживного середовища для кожного об'єкта індивідуально. Стерилізацію поживного середовища проводять способом автоклавування. Не можна цим способом стерилізувати регулятори росту. Для приготування напівтвердих середовищ агар у готове середовище вводять перед автоклавуванням [25].

При перенесенні стерильних експлантатів у стерильне поживне середовище паренхімні клітини дедиференціюються, втрачають клітинну спеціалізацію, переходять до ділення, утворюючи однорідну біомасу, що отримала назву калюсу. Незалежно від того, з якого органа був отриманий первинний калюс, він є однотипною масою клітин, які лише частково відтворюють специфіку тканини інтактною рослини [23].

Культуру калюсу звичайно підтримують на поверхні твердого агаризованого середовища, періодично пересіваючи. Вплив тривалості культивування тканин і клітин і кількість пасажів можуть визвати помітні зміни як у рості і морфології тканин, так і в їх біохімічних властивостях [47].

В результаті цитогенетичної мінливості калюсні клітини втрачають здатність щодо реалізації генетичної інформації і утворення тих чи інших вторинних сполук. В той же час вихідна генетична інформація не зникає цілком, але для її реалізації потрібні специфічні умови. До таких факторів відносяться світло, фітогормони, складові живлення. Так, наявність у середовищі кінетину стимулює накопичення у калюсній культурі тканин тютюну нікотину і лігніну, а низька концентрація сахарози спричиняє накопиченню у цих клітинах убихінону-10 [25].

1.3.2 Етапи калюсоутворення культур рослин

Пріоритет у калюсоутворенні, що довгий час належав меристематично активним тканинам, зараз значною мірою затвердився за живими паренхімними клітинами. Саме вони, як такі, що зберегли протягом довгого часу здатність переходити в меристематично активний стан, відіграють першочергове значення при калюсогенезі взагалі та в умовах стерильної культури тканин *in vitro* зокрема [41].

Щоб забезпечити розвиток калюсних клітин на поживних середовищах, які містять всі необхідні для росту речовини, клітини експлантатів мають втратити здатність диференціюватися. Цьому сприяє передінкубація експлантатів на середовищі без гормонів протягом 3-6 діб [45].

Процес калюсогенезу в умовах ізолюваної культури тканин багатьох видів рослин звичайно проходить у три етапи:

- дедиференціація тканин експлантата;
- меристематизація;
- диференціація знов виникаючих тканин калюсу [25, с.57].

Перший етап – дедиференціація – проходить дуже швидко і зачіпає лише деякі з судин та особливо ділянки паренхімних тканин, що знаходяться на кордоні зрізів. З перших днів була відзначена висока проліферація (розвиток) паренхімних тканин, що прилягають до судин. На експлантатах з зони сформованої флоєми була відзначена висока проліферативна активність епітеліальних клітин секреторних каналів та каналців. Результатом усіх цих змін є формування первинного калюсу [42].

Морфологічно він ще не виражений, але в усіх експлантатах буквально з перших днів відбуваються гістологічні зміни, пов'язані в основному з дедиференціацією паренхімних клітин (по кордонах зрізів, поблизу провідних шляхів) та їх першими діленнями [27].

Другий етап – меристематизація – характеризується перетворенням структури первинного калюсу і появою перших меристематичних осередків. Поблизу верхньої поверхні калюсів проходить формування багаторядної, суцільної "захисної", або покривної зони. На нижній стороні спостерігалось формування тільки окремих меристематичних осередків. Нижня поверхня ставала нерівною, отримувала бугристий характер. В експлантатів зберігалася висока проліферативна активність усіх паренхімних клітин. Структура первинного калюсу з першими меристематичними осередками і зонами поступово отримує риси будови калюсу вторинного. На 10-й день досліджень усі калюси (випробовувались трансплантати з зони сформованої ксилеми, камбію, сформованої флоєми) були морфологічно чітко окреслені. Вони виділялись у вигляді сплошної світло-жовтої маси з верхньої сторони та рихлої бугристої, більш темного кольору – з нижньої [12].

На третьому етапі калюсогенезу – диференціації – тривала активна меристематизація. Вона відбувалася у формуванні додаткових меристематичних

осередків, а також у подальшій диференціації раніш закладених меристематичних осередків. Спостерігався перехід його до структури вторинноперетвореного калюсу. Для останнього найбільш характерним є проява органогенетичних потенцій. Так, на 72-й день у культурі ізольованих тканин можна було спостерігати утворення великої кількості білих коренів довжиною до 1,5 см [21].

Таким чином, виявилось, що калюсогенез на різних експлантатах з кореня йде однотипно. Цей процес в умовах стерильної культури характеризується динамікою формування усіх структур, що визначає його етапність і закономірність у локалізації гістологічних елементів у сформованому, зрілому стані [31].

Утворений таким чином на тканинах первинного експлантата калюс є морфологічно новою структурою. Характер його формування, як і тривалість протікання вказаних етапів, багато в чому обумовлюється гістологічними особливостями первинних експлантів. Незважаючи на різні гістологічні ознаки, що є в кожному окремому випадку, в калюсогенезі можна виділити окремі загальні структурні закономірності. Останні як в травматичному калюсогенезі, так і при утворенні калюсів у стерильній культурі, можна називати первинними, первинноперетвореними, вторинними та вторинноперетвореними, що відповідає вказаним вище загальним етапам калюсогенезу у випадках початкового введення тканин в стерильну культуру *in vitro* [32].

Протягом пасажу морфологія калюсу і його клітин змінюється, що пов'язано з проходженням чотирьох стадій росту: латентний період, тобто період від пересадки до початку мітотичної активності – росту немає; період інтенсивного поділу – калюс більш або менш щільний, складається із багатьох меристематичних ділянок клітин, що діляться; період розтягнення клітин – калюс стає більш рихлим, клітини в ньому лежать вільно, поділу майже немає; стабільна стадія – клітини сильно вакуолізовані, калюс набуває липкої консистенції [37].

Ще одна особливість у культурі калюсу – в найзовнішніших шарах "захисної" зони калюсу можна спостерігати утворення груп дрібних "дочірніх" клітин, що виникають з однієї "материнської". Це явище пов'язують з соматичним ембріогенезом [53].

Такі загальні особливості формування калюсів виявлені при первинному введенні гістологічно різних тканин в стерильну культуру [5].

Вирощування на агаризованому середовищі. Для приготування агаризованого середовища додають агар до поживного середовища до кінцевої концентрації 6-10 г/л. Значення рН середовища перед автоклавуванням доводять до 5.5-6,0. В асептичних умовах калюс (60-100 мг) відокремлюють і розміщують на поверхні агаризованого поживного середовища для подальшого росту. В результаті отримують культуру калюсної тканини, яку можна підтримувати безмежно довго, періодично її пересіваючи на нове поживне середовище [1].

Ріст тканини на агаризованому середовищі протягом пасажу характеризується S-образною кривою, до якої входять 4 фази [32].

Перша фаза – лаг-фаза, тривалість якої не більше двох діб. У цей час клітини практично не поділяються і середній розмір їх не змінюється у порівнянні з розмірами клітин вихідної рослини.

Друга фаза – фаза експоненційного росту, триває приблизно 20 діб. Для цієї фази характерна найбільша мітотична активність клітин. Максимальна кількість клітин, що діляться, випадає на 5-у та 15-у добу культивування. При цьому середній розмір клітин зменшується, приріст біомаси на цій стадії вирощування складає 13-14г з 1 л середовища на добу.

Третя фаза – фаза лінійного росту, характеризується найбільш інтенсивним накопиченням біомаси. Приріст тканини на 25–28-у добу складає 350-400 г/л на добу. В цій фазі мітотична активність зменшується, клітини збільшуються у розмірі, у них спостерігається накопичення глікозидів. На 30-у добу знижується вміст сухої речовини, стабілізується накопичення панаксозидів.

Для четвертої фази – стаціонарного росту – характерна часткова загибель клітин та поява некротичних зон. У зв'язку з цим для підтримування культури в активному стані її необхідно пересівати на свіже поживне середовище на 30-у добу вирощування (рис.1.4) [18].

Ріст культури тканини протягом пасажу супроводжується змінами рН середовища. Протягом лаг-фази і фази експоненційного росту відбувається

"підкислення" середовища в основному за рахунок поглинання відновлених форм азоту. У фазі лінійного росту спостерігається "підлужування" середовища, зв'язане з активним виносом із нього і накопиченням у тканині нітратних форм азоту. Наприкінці пасажу тканина починає поглинати аміачні форми азоту, що призводить до "підкислення" середовища [15].

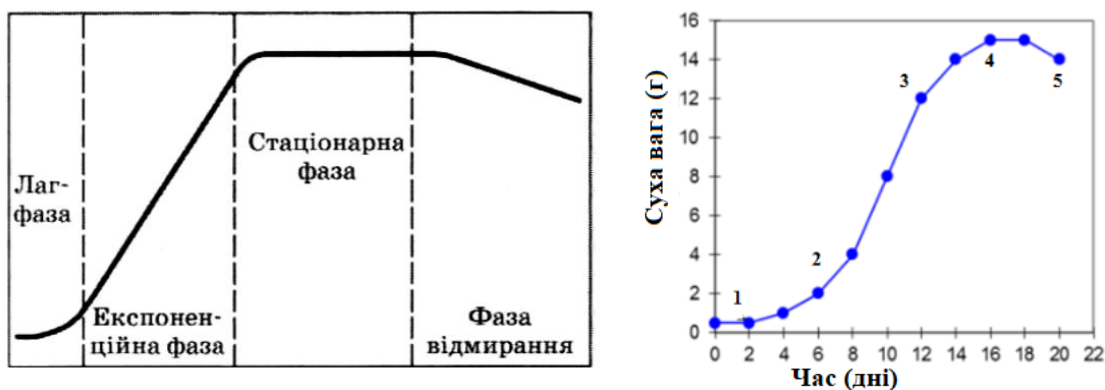


Рис.1.4 Крива росту клітинної популяції.

Динаміка накопичення розчинних цукрів у тканині рослини корелює з мітотичною активністю. Максимальна кількість цукрів накопичується у фазі експоненційного росту на 5-у та 15-у добу культивування, а по мірі накопичення біомаси (у фазі лінійного росту рослини) кількість цукрів в тканині різко знижується [35].

Якісно амінокислотний склад культури тканини в процесі культивування не змінюється. Кількісний вміст як вільних, так і зв'язаних амінокислот залежить від фази росту. Так, вільних амінокислот найбільше накопичується у фазі експоненціального росту (це, очевидно, зв'язано з активністю їх включення у процеси обміну); фази лінійного і стаціонарного росту характеризуються зменшенням кількості вільних і збільшенням вмісту зв'язаних амінокислот [18].

Культивування тканин на твердих поживних середовищах відбувається часто у різноманітних установках, де багато процесів механізовані. Процес отримання культури клітин твердофазним способом потребує використання занадто великих площ, не гарантує стерильності і дає низький вихід продукту [35].

Надзвичайно важливим для глибинного вирощування рослинних клітин у ферментерах є запобігання надмірному ціноутворенню та злипанню біомаси на внутрішніх поверхнях вище рівня культуральної рідини, а тому підбір поверхнево-активних речовин (ПАР) становить актуальну проблему технології глибинного вирощування клітин рослин. Процес культивування ведуть доти, доки триває інтенсивний синтез цільового продукту і доки не будуть вичерпані поживні речовини середовища. При визначенні кінця культивування необхідно враховувати дані мікроскопічного контролю стану культури (можливе утворення клітин, які некротують), відсутність сторонньої мікрофлори, концентрацію основних поживних речовин, рН поживного середовища біомаси тощо [5].

Відомо, що вирощування культур тканин у рідких поживних середовищах у кілька разів скорочує терміни культивування штамів. Використання рідких поживних середовищ дає додаткові можливості для вивчення процесів розвитку рослинних клітин і біосинтезу ними вторинних метаболітів у керованих умовах [27].

Вирощування на "підкладках". Лише для деяких штамів рослинних культур сьогодні можуть бути використані методи глибинного культивування. Це пояснюється передусім труднощами у досягненні гомогенізованого росту клітин або їх невеликих агрегатів. У зв'язку з цим викликає цікавість метод, який комбінує використання рідкого поживного середовища та твердого матеріалу, що підтримує тканину на поверхні – "підкладинок". Першим матеріалом при культивуванні рослинних тканин на рідких середовищах з використанням "підкладинок" був фільтрувальний папір [35].

При такому способі вирощування можна здійснити спрямований синтез вторинних речовин шляхом регулювання вмісту компонентів харчування, рН середовища, аерації та інших важливих параметрів культивування [9, с.5].

Одним з найважливіших елементів поверхневого вирощування тканин на рідких середовищах є вибір "підкладки", на якій розміщують тканини. З цією метою використовують паперові фільтри, намистинки зі скла Пірекса, кварцовий пісок, поліакриламідні гелі, пластмаси, пінополіуретани [45].

При такому методі вирощування вторинні метаболіти (алкалоїди) накопичувалися, в основному, в біомасі, а вміст їх в рідкому поживному середовищі складав не більше 54 % від їх загальної суми. Слід відзначити, що вихід біомаси і алкалоїдів у цьому випадку був не нижчий, ніж при вирощуванні на агаризованих середовищах, а використання основних компонентів харчування – сахарози, неорганічного фосфору, загального азоту – проходило більш повільно, ніж при глибинному способі вирощування [34].

Для керування процесами росту культур та синтезу ними вторинних продуктів необхідний контроль за кількістю поживних речовин у середовищі. Середовище протягом усього пасажу повинне містити компоненти живлення у кількостях, що забезпечують високу швидкість росту тканин. Відомо, що основною причиною уповільнення росту є виснаження поживного середовища. Тому удосконалення методів глибинного культивування здійснюватиметься шляхом утворення проточних режимів з по-стійним підтриманням основних компонентів середовища в оптимальній концентрації [28].

При культивуванні на рідких середовищах поверхневим методом "на підкладинці" споживання тканиною головних компонентів живлення – сахарози, неорганічного фосфору та загального азоту – менше, ніж при глибинному способі вирощування [16].

Симбіотичні асоціації на основі культивованих клітин та ізольованих протопластів. У теперішній час проводяться роботи, що направлені на отримання штучних асоціацій на основі культивованих клітин чи ізольованих протопластів вищих рослин з мікроорганізмами [14].

Протопластами називають клітини рослин, повністю позбавлені клітинної стінки, що мають лише клітинну мембрану, яка обмежує цитоплазму. Протопласти отримують обробкою клітин, що ростуть у суспензії, розчином ферментів, який містить пектиназу, целюлазу, геміцелюлазу та глюкозу, мінеральні солі, фос-фатний буфер з рН 5,7-6,0 [26].

Процедура руйнування клітинних стінок протягом 30-60 хв. при 4-8°C викликає стан шоку клітин, що позначається на збільшенні вакуолізації цитоплазми, появі численних ліпідних краплин тощо [49].

Відмиті від ферментних препаратів протопласти виходять з шокового стану, потім у них спостерігається відновлення (репарація) пошкоджених структур і розпочинається підготовка до відродження (регенерації) клітинної стінки і поділу. Щоб відвернути відродження клітинної стінки, до складу середовища вводять кумарин у концентрації 200-250 мг/л для культивування протопластів, а для стабілізації протопластів – осмотичні стабілізатори (наприклад, сорбітол, манітол) – 125 мг/л. Перебування протопластів у такому середовищі протягом 48 годин не призводить до втрати ними життєздатності, а відмиті від кумарину і стабілізаторів, вони здатні на спеціально підібраному по-живному середовищі створювати нові клітинні стінки, ділитися, давати початок рослинам-гібридам. Середовище для культивування протопластів повинно мати рН в межах 5,5-5,8, температуру 22-28°C, освітлення 100-2000 люксів. Зменшення рН середовища до 3,5 призводить до швидкого руйнування (за кілька хвилин) протопластів більшості видів рослин. При отриманні асоціацій використовується різноманітний вибір видів рослинних об'єктів та мікроорганізмів, причому останні представлені азотофіксуючими формами [26].

Вибір ціанобактерій для отримання штучних асоціацій зумовлюється їх властивостями:

- здатність до фотосинтезу в об'єднанні з азотофіксацією;
- поширення у природних асоціаціях з різними, далеко розташованими у таксономічному відношенні, групами рослин.

Утворення такого роду асоціацій представляє інтерес у вирішенні таких практичних задач, як:

- підвищення продуктивності культивованих рослинних клітин, продуцентів економічно важливих речовин;
- моделювання природних симбіотичних відносин рослин і мікроорганізмів для вивчення фіксації молекулярного азоту;
- отримання рослин з новими властивостями [27].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження слугували коренева частина женьшеню.

2.1.1. Ботаніко-фармакогностична характеристика женьшеню

Багаторічна (понад 50 років) трав'яниста рослина родини аралієвих заввишки 30-80 см. з 4-5 листочками на верхівці й соковитому корені (рис.2.1).

Відділ: Magnoliophyta / Квіткові

Клас: Magnoliopsida / Дводольні

Порядок: Araliales / аралієцвіті

Сімейство: Araliaceae / аралієвих

Рід: Panax / Женьшень

Вид : ginseng CA Mey / звичайний [38, с.90]



Рис 2.1 Женьшень звичайний

Коренева система женьшеня складається з короткого вертикального кореневища і власного кореня. Корінь рослини жовтувато-білий, товстий,

малорозгалужений, подібний на фігуру людини. Стебло тонке, прямостояче, гладеньке, всередині порожнє, 30-70 см заввишки, на верхівці увінчане розеткою з 2-6 листків. Листки черешкові, пальчастоп'ятискладсті; листочки оберненоовальні, по сраю – пилчасті [32, с.11].

Квітки двостастатеві, білі, іноді ніжно-рожеві, зібрані у верхівковий одиничний зонтик. Плід - соковита яскраво-червона кістянка. Цвіте у червні місяці. Плоди досягають у серпні. Рослина виростає в основному на Далекому Сході і в Китаї, а також у Тибеті, на Алтаї і в Сибіру. У Китаї розрізняють 15 видів женьшеню [32, с.7].

Корінь женьшеню має 18% білків, 3% ліпідів (фітостерин), 20% крохмалу, 20% пектинів, 4% цукрів, 0,25% ефірної олії, що формує специфічний запах.

Женьшень поліпшує кровопостачання мозку; збільшує споживання кисню; у більших концентраціях викликає слабке збільшення рухової активності гладкої мускулатури; володіє антидиуретичними властивостями; робить гонадотропну дію; активізує кровотворення; стимулює синтез РНК і ДНК-полімерази печінки; збільшують синтез РНК і ДНК, білка, ліпідів у клітинах кісткового мозку; підвищують рівень оксикортикостероїдів у плазмі крові; підвищують вміст допаміну й норадреналіну в стовбурі головного мозку; підсилюють активність основний аденілатциклази; зменшують кількість серотоніну в корі головного мозку; володіють вираженим антистресорною властивістю; підвищують стійкість тварин до гіпертонії; роблять протизапальну дію; прискорюють процеси загоєння ран; захищають тварин від токсичної дії деяких хімічних агентів [51, с.28].

У другій половині ХХ століття було налагоджене виробництво клітинних культур кореня женьшеню. Препарати женьшеню застосовують (рис.2.2.):

- у якості тонізуючих і загальнозміцнювальних засобів для лікування й профілактики захворювань ЦНС;
- підвищення рівня розумової й фізичної працездатності, посилення адаптаційної здатності організму, підвищуючи стійкість основних фізіологічних систем до шкідливих впливів;

- опірності організму до стресових ситуацій, несприятливим впливам зовнішнього середовища,
- у косметичній промисловості використовується як пом'якшуючий засіб [19, с.46].



Рис. 2.2 Препарати на основі женьшеню різних форм випуску

Женьшень ефективний при астенічних і депресивних станах різної етіології; при психастенічних і істеричних реакціях, що супроводжуються ступором; при різних неврозах, безсонні; при імпотенції [14, с.8].

Застосування женьшеню ефективно: у період видужання після важких захворювань, складних хірургічних втручань, затяжних ускладнень різної етіології, при тривалій фізичній і психічній перевтомі. Женьшень полегшує стан післяопераційного періоду в хірургічних хворих. У східних країнах препарати з рослини рекомендують для продовження життя й молодості. У женьшеню чітко виражена сезонність дії. Прийом його восени й узимку найбільш ефективний [14, с.19].

Прийом женьшеню був визнаний досить ефективним при астенічних і астенодепресивних станах різної етіології, істеричних реакціях, різних неврозах і безсонні. Так, невелика кількість женьшеню здатна підвищувати рівень артеріального тиску, а велике - навпаки, знижувати [14, с.10].

Для виготовлення ліків використовують корінь женьшеня. Найсприятливішим періодом збирання женьшеня є перша половина серпня, коли його легко знайти за достиглими червоними плодами. Після достигання плодів корінь стає твердішим і витривалішим для зберігання в сирому стані. Зібрані в цей час корені і в терапевтичному відношенні вважаються найповноціннішими. Викопають їх за допомогою дерев'яних, металевих або кістяних паличок, слідкуючи за тим, щоб не відірвати від кореня «шийку» і не ушкодити бічні й додаткові корені. Викопаний корінь старанно очищають м'якою сухою щіточкою від землі (мити не можна), відрізають надземну частину, кладуть в обкладену мохом середньої вологості коробочку з кори, засипають землею, яку беруть з того місця, де ріс женьшень, і в такому вигляді доставляють на приймальний пункт. Самовільна заготівля дикорослого женьшеня заборонена [17, с.87].

У медицині використовують корінь рослини, що досягають у природі лікувальної зрілості після 10 років.

Зберігати коріння в сирому стані можна не більше 5 діб. Для тривалого зберігання коріння сушать на сонці, одержуючи таким чином сировину під назвою «біле коріння». Товсті корені перед сушінням розрізають на пластинки. Якщо перед сушінням корені витримати 1 год. над кип'ячою водою, то таку сировину називають «червоним корінням». Вважається, що в червоному корінні біологічно активних речовин міститься в 2 рази більше. Зберігають сировину в щільно закритих банках або поліетиленових торбах у сухому місці [18, с.62].

Види женьшеню:

Panax ginseng (азіатський женьшень, відомий також як китайський або корейський женьшень; сімейство Araliaceae) - рослина, що володіє великим лікувальним потенціалом. Цей вид росте на високогір'ях Маньчжурії (область між Китаєм і Кореєю). Кущ *Panax ginseng* досягає близько 50 см заввишки, крона

складається з темно-зелених вертикальних листя і невеликих зелених кольорів, що розвиваються в яскраві червоні ягоди [17, с.87]. Більшу частину сирого рослинного матеріалу отримують в Південній Кореї, де женьшень вирощують під солом'яними тентами. Коли вік рослини досягає 4-6 років, і коли корінь виріс до 8-20 см та має товщину 2 см, його викопають. Тонкі частини стрижневого кореня і відгалуження відрізають, потім корінь промивають і знімають верхній шар. При висушуванні під сонцем виходить білий женьшень, а при обробці паром з наступним сушінням і додатковим висушуванні на сонці виходить червоний женьшень з гладкою поверхнею [40, с.58].

P. quinquefolium (американський женьшень), менш великий у порівнянні з азійським, використовувався корінними жителями Америки для лікування різних захворювань. В даний момент його виробництво в США, Канаді та північно-східному Китаї становить понад 1000 т сухого кореня на рік [37, с.95].

P. japonicus (японський женьшень) японські лікарі часто використовують в лікувальних цілях, однак цей вид містить менше активних інгредієнтів (гінзенозидів), ніж *P. ginseng* [37, с.94].

P. notoginseng **F. H. Chen** (нотоженьшень або san qi) також добре відомий і використовується в китайській традиційній медицині. Він ефективний при лікуванні гомеостазу, живить кров і лікує коронарний тромбоз [40, с.59].

Одним з підвидів *P. pseudoginseng* є *Himalaicus* (гімалайський женьшень), який жителі Гімалаїв використовують для стимуляції апетиту і кращого травлення. Лікувальний потенціал цієї рослини значно нижче, ніж *P. ginseng*.

P. trifolius (карликовий женьшень) - рідкісний підвид американського женьшеню, зазвичай зустрічається в Північній Америці. Корінні американці використовували *P. trifolius* для лікування головного болю, кашлю, нетравлення і інших захворювань [42].

Eleutherococcus senticosus (сибірський женьшень) не належить до роду *Panax*, з цієї причини його навіть не вважають справжнім женьшенем, незважаючи на те що він належить до сімейства *Araliaceae*. Сибірський женьшень найчастіше

використовують як більш дешевий і надає ослаблене дію аналог Р. Ginseng [40, с.59].

2.1.2. Фармакологічні та хімічні особливості женьшеню

В даний час женьшень застосовують в основному як загальнозміцнюючий засіб і для підвищення опірності організму фізичному, хімічному та біологічному стресу [36, с.82]. Виявлені в клінічних та лабораторних випробуваннях здатність модулювати імунну систему, а також антистресова і антигіперглікемічна активність - найбільш істотні риси препаратів на основі женьшеню. Більш того, багато сучасних доклінічних та клінічних дослідження вказують на існування протиракових властивостей таких препаратів [52, с.61].

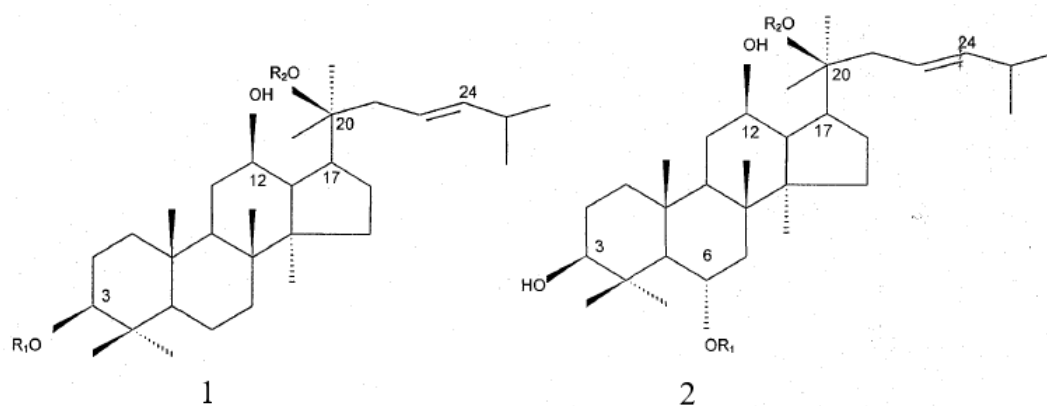
Основними компонентами женьшеню, що відповідають за його лікувальні властивості, є гінзенозиди. На даний момент більше 620 гінзенозидів було виділено з рослин роду *Panax* [40, с.58]. Молекула будь-якого гінзенозида складається з основи (сапогенін) і сахаридних бічних ланцюгів, які, в свою чергу, також можуть мати замісників більш простої структури, наприклад малоніл. Найбільш поширені гінзенозиди з протопанаксатріолъними (PPT), протопанаксادیолъними (PPD) і октілолъними (OT) сапогенінами [52, с.61].

Оскільки женьшень - одна з найбільш популярних у всьому світі рослин, використовуваних в фітомедицині, величезна кількість робіт було виконано в останні 40 років з метою розробити аналітичні методи ідентифікації, кількісної оцінки змісту і контролю якості гінзенозидів в рослинній сировині, екстрактах і комерційних продуктах.

З кореня женьшеню виділено кілька класів сполук. Вони включають тритерпенові сапоніни, основні поліацетілені і сесквітерпени, полісахариди, пептидоглікан і його аналоги, азотомісткі органічні сполуки та інші широко поширені сполуки, наприклад, жирні кислоти, вуглеводні і феноли.

Головними діючими речовинами кореня і калусних тканини женьшеню *Panax ginseng* С.А.Меу вважаються тритерпенові глікозиди, в минулому частіше звані панаксозіди. В цьому напрямку особливо багато зроблено японськими вченими. Ними було доведено, що сапоніни женьшеню відносяться до групи тритерпеноїдів дамранового ряду і являють собою новий тип глікозидор з лабільним тетрациклічним агліконом стероїдної структури [53, с.72].

На початку досліджень глікозидів женьшеню був виділений аглікон панаксادیол, будова та стереохімія якого були вивчені ЯПОНСЬКИМИ дослідниками (С30Н52О3). Російським вченим вдалося розділити суму панаксазідів на 7 груп (А, В, С, D, Е, F і G). При гідролізі менш полярних глікозидів А, В і С був виділений новий тритерцен, названий панаксатріолом. Пізніше японські хіміки підтвердили відкриття нового аглікону з формулою С30Н52С4. З інших 4 груп сапонінів (D, Е, F і G) при гідролізі, завжди виходив панаксادیол. Таким чином, глікозиди женьшеня представлені двома групами з'єднань: гінзенозідами D, Е, F і G, що містять в якості аглікону панаксادیол і гінзенозідами А, В і С, що містять в якості аглікону панаксатріол (рис. 1). В даний час відомо більше 30 індивідуальних гінзенозидів, які були виділені з різних видів роду *Panax*. З них в коріння і калюсах женьшеню часто зустрічаються десять: Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh, NG-R2 (рис. 2.3) [41, с.63].



	R ₁	R ₂
Rb ₁	-glc ² -glc	-glc ⁶ -glc
Rb ₂	-glc ² -glc	-glc ⁶ -ara(p)
Rc	-glc ² -glc	-glc ⁶ -ara(f)
Rd	-glc ² -glc	-glc
Re	-glc ² -rha	-glc
Rf	-glc ² -glc	-H
Rg ₁	-glc	-glc
Rg ₂	-glc ² -rha	-H
Rh	-glc	-H
NG-R ₂	-glc-xyl	-H

Рис. 2.3. Структурні формули гінзенозидів женьшеню: 1 - протопанаксادیол, 2 - протопанаксатріол

Гінзенозиди поділяються на дві групи: першу - Rb -групу складають глікозиди, у яких в якості аглікону протопанаксادیол: Ra1, Rb1, Rb2 , Rc, Rd, в коренях женьшеня можуть бути присутніми малоніл-похідні цих гінзенозидів. У другу - Rg -групу входять глікозиди, в якості аглікона у яких, протопанаксатріол: Re, Rf, Rg1, Rg2 , Rh []. Оскільки глікозування протопанаксатріола у женьшеня здійснюється за двома положеннями – С6 і С20, глікозиди цієї групи можна поділити на дві підгрупи: С6-глікозиди (Rh1, Rf, Rg2, NG-R2) і С6,20 - глікозиди (Re, Rg1, NG-R1). У С6 -глікозидів вуглеводи приєднані в положення С6 молекули протопанаксатріола, у С6,20 - глікозидів - відповідно в положеннях С6 і С20. Основна частина глікозидів Rg -групи інтактного рослини женьшеню представлена С6,20 -глікозидами. Крім того, було виділено гінзенозид Ro, що має в якості аглікона олеанову кислоту [51, с.90]. Ця кислота поширена в рослинному світі значно ширше, ніж протопанаксатріоли або протопанаксادیоли. Досить сказати, що

з'єднання олеанової кислоти представлені в коренеплодах цукрових буряків, звідки вони свого часу і були виділені [41, с.67].

Крім гінзенозидів, в коренях женьшеня знайдені: сесквітерпеноїди, даукостерін, поліацетилени, комплекс жирних кислот, полісахариди, ефірні масла, вільні амінокислоти, макро- і мікроелементи.

Вивчення складу і змісту гінзенозидів в різних органах показало, що гінзенозиди локалізуються в основному в паренхімних тканинах - мезофіл листа, поверхневих паренхімних тканинах черешка і стебла, корі і серцевинних променях кореня. Максимальний вміст відзначається в дрібних придаткових коренях. Детально досліджено склад гінзенозидів в дикому і культивованому женьшені, в квіткових бруньках женьшеню, що культивується в Китаї. Було встановлено, що до складу женьшеню входять глікозиди Rb і Rg-груп, співвідношення Rb/Rg в коренях вище 1, а в надземних частинах нижче 1. У літературних джерелах для характеристики складу гінзенозидів в різних частинах женьшеню використовують індекси $Rd / Rb1$ і $Rg1 / Re$ [41, с.67].

Вміст кожного глікозиду становить (у%): гінзенозид-Ra і Ra1 разом (0,01–0,03), гінзенозид-Ra2 (0,02), гінзенозид-Ra3 (0,03–0,05), гінзенозид-Rb1 (0,38–5,26), гінзенозид-Rb2 (0,9–2,3), гінзенозид-Rb3 (0,01), гінзенозид-Re (0,1–2,17), гінзенозид-Rg1 (2,77), гінзенозид-Ro (0,04–0,6). Гемолітичний індекс сапонінів на рівні близько 1000. Серед інших БАП: стероїди (0,029%); холін (0,1–0,2%), вітаміни С, В1, В2, В12, біотин, нікотинова, фолієва, пантотенова кислоти; поліацетиленові сполуки: фалькаринол, фалькаринтріол, панаксидол, гептадека-1-єн-4,6-дин-3,9-діол; десять нових поліацетиленів, названих гінзеноїнами А, В, С, D, E, F, G, H, I і K; вуглеводи: сахароза, специфічні трисахариди, пектинові речовини, крохмаль, водорозчинні полісахариди (до 38,7%), що значно більше, ніж у інших далекосхідних аралієвих (2,3–5,7%), лугорозчинні полісахариди (7,8–10%; полісахариди гідролізуються до глюкози, галактуронової кислоти, арабінози, ксилози, рамнози та галактози); жирні кислоти; макро- (К, Са, Mg, S, P, Fe) та мікроелементи (Cu, Co, Mn, Al, Si, Mo, Zn, Cr, накопичує Ag). Етерна олія (0,05–0,25%, у культурі – до 0,96%) містить сесквітерпени (80%), серед яких переважає фарнезол (до 5–6%). В етерній олії з

бутонів квіток (до 0,2%, за допомогою газової хроматографії) виявлено 128 сполук, 40% олії припадає на сесквітерпени та 20% – на (Z)-фарнезен. У траві знайдені гінзенозиди, флавоноїди: кемпферол, кемпферол-3-галактозид, кемпферол-глюкогалактозид та ін. [17, с.95].

Гінзенгозиди женьшеню стимулюють холестероловий метаболізм, підвищують ліпопротеїн-ліпазну активність плазми крові, проявляють нейролептичну, антистресорну, знеболювальну, гіпертензивну, холіноміметичну, гістаміно-, атропіно-, папавериноподібну активність. Гінзенозид-Rb1 та гінзенозид-Rg1 високоефективні при раку шлунка, гінзенозид-Rg1 гальмує ріст «саркоми-180» у мишей. Останнім часом велику увагу приділяють пептидам женьшеню. Так, виділено пептид з екстракту женьшеню, який показав у дослідах з культурою клітин нирок хом'ячка стимуляцію проліферації клітин; цей пептид складається з чотирьох амінокислот: гліцину, аргініну, глютаміну і валіну у співвідношенні 1:1:1:1. Пептидна частина глікану панаксану А становить усього 1,7% від загальної маси молекули, але має вирішальне значення для гіпоглікемічної активності. Полісахаридні фракції з коренів женьшеню та клітинної маси культурної тканини женьшеню виявляють імуностимулювальну активність. Пептидоглікани – панаксани А, В, С і D регулюють рівень цукру у крові, арабіногалактани – гінзенан Ра, гінзенан Рв і гінзенани S-IA і S-IIA впливають на активність ретикуло-ендотеліальної системи і проявляють антикомплементарну властивість. Полісахариди, отримані з листя женьшеню, мають протипухлинну дію. препарати женьшеню мають адаптогену, тонізуючу та імуномодулюючу дію, посилюють працездатність, зменшують втому при великих фізичних навантаженнях і стресі; використовують при нервовому й фізичному виснаженні, анемії, неврастенії, істерії, астенічних станах, зумовлених різними захворюваннями: діабетом, туберкульозом, малярією тощо; у період одужання у післяопераційний період, при підвищеному і зниженому тиску, для поліпшення діяльності серцево-судинної системи, при вірусному гепатиті, для лікування статевих розладів, атеросклерозу та гастритів різного походження тощо [49, с.98].

2.2. Методи досліджень

У дослідженнях з культури *in vitro* використовували загальноприйняті методи викладені в роботах з біотехнології рослин [18]. Як первинні експланти використовували кореневища женьшеню.

2.2.1. Приготування поживного середовища

Для зручності і прискорення процесу приготування живильних середовищ готували концентровані (маточні) розчини макро- і мікросолей, вітамінів і регуляторів росту. Розчини зберігають у холодильнику при 2-4°C у посуді із темного скла не більше 4-6 тижнів. Маточні розчини макросолей готують у концентраціях, що у 10 разів перевищують потрібні. Маточні розчини мікроелементів готують у концентраціях, що у 100 разів перевищують потрібні, з розрахунку, щоб в 1 мл маточного розчину містилась маса речовини, яка потрібна для приготування 1 л середовища [23].

Склад поживного середовища для отримання калюсу на 1 л:

Макросолі МС100 мл

Мікросолі МС 1 мл

Fe-хелат 5 мл

Вітаміни МС 1 мл

2,4-Д 0,5мг/л

ІОК 2,0 мг/л

Кін 0,5мг/л

Сахароза 20 г

Агар-агар 8 г

pH 5.6-5.82 [45].

Наважку агару переносили в термостійку склянку, заливали половинним об'ємом (від об'єму середовища) дистильованої води, залишали для набухання на 20 хв. і нагрівали на плитці до 80-100°C постійно помішуючи. В мірний циліндр наливали 100-150 мл дистильованої води, додавали точно відміряну кількість макро- та мікроелементів, вітамінів, сахарозу та інші складові середовища. Потім додавали раніше приготовлений розчин агару. Середовище доводимо до необхідного об'єму дистиллятом. Доводимо рН середовища до потрібного значення, використовуючи КОН. Розливаємо тепле середовище у пробірки, закриваємо фольгою. Середовища стерилізували автоклавуванням протягом 20-25 хвилин при тиску 1атм [11].

Розчини вітамінів готували у концентрації 1 мг/мл. Розчиняли у бідистильованій воді.

Розчини фітогормонів готували таким чином: цитокініни (кінетин, зеатин, БАП) спочатку розчиняємо у невеликій кількості 1N розчину лугу або кислоти, ауксини (ІОК, НОК, 2,4-Д) - у краплі етанолу, підігривають і додаємо відповідний об'єм бідистильованої води; гібереліни розчиняють у бідистильованій воді. Концентрація розчинів 1 мг/мл. Розчини вітамінів і фітогормонів (ІОК, зеатин, гіберелін) розливали по 3-5 мл. Вуглеводи і органічні добавки зважували і додавали безпосередньо до середовища [10, с.213].

2.2.2. Отримання стерильного посуду

Чистий посуд (чашки Петрі, пінцети, посуд для розсадження експлантів), попередньо загорнуту в папір або фольгу, інструменти стерилізували сухим жаром в сушильній шафі при температурі 160 °C протягом 1,5-2,0 ч.

2.2.3. Робота в ламінарному боксі

Всю подальшу роботу проводили в ламінарному боксі з дотриманням стерильності [1]. Робота в ламінарному боксі включала ряд послідовних процедур, передбачених інструкцією приладу:

- 1) Поміщали всі необхідні інструменти (пальник, сірники, чашки Петрі, 70% розчин етилового спирту, вата, пінцети, скальпелі) на стіл ламінарії;
- 2) Включали продув, закривали ламінар;
- 3) Включали UV світло на 15-20 хвилин в струмі стерильного повітря;
- 4) Після закінчення стерилізації, джерело ультрафіолетового світла вимикали, залишали бокс в струмі стерильного повітря на 15-20 хвилин для видалення надлишку озону.

Безпосередньо перед роботою в боксі інструменти стерилізували ще раз, поміщаючи в фарфоровий або скляний стакан з 96%-вим етиловим спиртом і обпалювали кожен з них в полум'ї спиртівки. Стерильні інструменти використовували тільки для одноразової маніпуляції. Перед повторним використанням їх знову обробляли спиртом і обпалювали. Руки попередньо обробляли ватою, змоченою в 70% -му розчині етилового спирту. На коліна клали мокрий рушник, з метою безпеки [9, с.35].

2.2.4. Метод індукції калюсогенеза

Вихідний матеріал ретельно промивали мильним розчином, потім споліскували ледь рожевим розчином KMnO_4 (перманганату калію) і переносили в робочий стерильний бокс.

Стерильними інструментами розрізали вихідний матеріал на шматочки по 1-2 см і поміщали в попередньо простерилізовані марлеві мішечки для подальшого

занурення в місткості з стерилізуючими розчинами (розчин сулеми, хлораміну, діациду, етанол). Експозиції витримування в стерилізуючих розчинах [20].

Вихідний матеріал кілька разів промивали стерильною дистильованою водою, щоб відмити від стерилізуючого розчину. Стерильний рослинний матеріал ділимо на сегменти. Використані інструменти опускали в склянку з спиртом і обпалювали у полум'ї спиртівки, після чого поміщали між сторінки стерильного щільного паперу.

Вихідний рослинний матеріал поміщали на поверхню агаризованого середовища в чашки Петрі і ставили в камери для вирощування (в термостат). Вирощували в темряві за температури $+26^{\circ}\text{C}$. Через 3-4 тижні на поверхні зрізу помітне утворення первинної калюсної тканини.

Клітини рослин, що знаходяться в завершальній стадії диференціації, під дією індукторів клітинного поділу – цитокінінів і ауксинів, переходять в дедиференційований стан й відновлюють меристематичну активність. Після утворення первинного калюсу в асептичних умовах його відділяють від експлантата і пересаджують на нове агаризоване живильне середовище [10, с.104].

2.2.5. Метод культивування калюсної культури

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

Культури інкубували на світлі при $+25-26,5^{\circ}\text{C}$. Їхнє субкультивування проводили через кожні 2 тижні. Культивування здійснювали за підтримки постійного значення рН (6-8). Підтримку заданого рН здійснювали додаванням 1н розчинів КаОН та НСІ. Температура культивування підтримувалась в межах $26-28^{\circ}\text{C}$ завдяки термостатування зовнішнім змішувиком в оболонці реактора. У процесі культивування здійснювали постійний контроль за значенням рН середовища, температурою та вмістом розчиненого кисню [19].

Перемішування маси здійснювали за допомогою магнітної мішалки на швидкості 6 об/хв.

Для виявлення наявності тритерпенових глікозидів використовували тонкошарову хроматографію (ТШХ) на пластинах «Silufol» («Kavalier», Чехословаччина) з нейтральною системою розчинників хлороформ-метанол-вода (100:40:7) за стандартною методикою. Як контроль використовували водно-спиртові екстракти коріння. Під час визначення вмісту сапонінів у біомасі калюсів використовували показник відносного вмісту глікозидів, який розраховувався (напівкількісно) за площею плям фракцій глікозидів після прояву хроматограм. В якості контролю була прийнята концентрація ТГ в органах інтактних рослин [21].

2.2.6. Математичні та статистичні методи дослідження

Обробку даних виконували із застосуванням стандартних програм та статистичне опрацювання результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [33]. Під час виконання досліджень і при оформленні роботи використовували внутрішній додаток Windows XP, пакет прикладних програм Microsoft Office.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Технологічна схема виробництва

Поживне середовище – основний фактор культивування рослин, який впливає на калюсоутворення. Основою усіх живильних середовищ є мінеральні солі, необхідні рослині. Важливим фактором, що регулює диференціацію і морфогенез ізольованих тканин, є наявність в ПС регуляторів росту - ауксинів, цитокінінів, гіберилінів [2, с.10].

В технологічній схемі для процесу культивування БАР передбачено використання апарата, який має корпус у вигляді циліндричної обичайки, всередині якої на валу обертається касета в порожнині якої знаходяться носії імобілізованих клітин, наприклад нерегулярні насадки - кільця Рашига. Насадки засипаються між стінками касети так, що забезпечується нерухомість носіїв моношару клітин і це унеможливує механічне ушкодження біомаси [25, с.73].

При культивуванні під час обертання касети поживне середовище повільно перетікає через поверхню носіїв імобілізованих клітин, що знаходяться в касеті. Аерація імобілізованого клітинного шару забезпечується за рахунок дифузії кисню повітря з газової фази в рідину та під час занурення шару насадки у культуральній рідині (КР). Частота занурення у КР і знаходження частини касети у газовій фазі регулюється швидкістю обертання валу і є регульованим параметром культивування, що визначає оптимальний рівень гідродинамічного стану КР. Дане технічне рішення ферментеру виключає прямий контакт клітин з бульбашками газової фази і виключає контакт клітин моношару з потоками від перемішувального пристрою і аераційною газовою фазою, що дозволяє сформувати моношар клітин з концентрацією клітин з 106 до 108 [48].

Блок - схема виробництва:

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

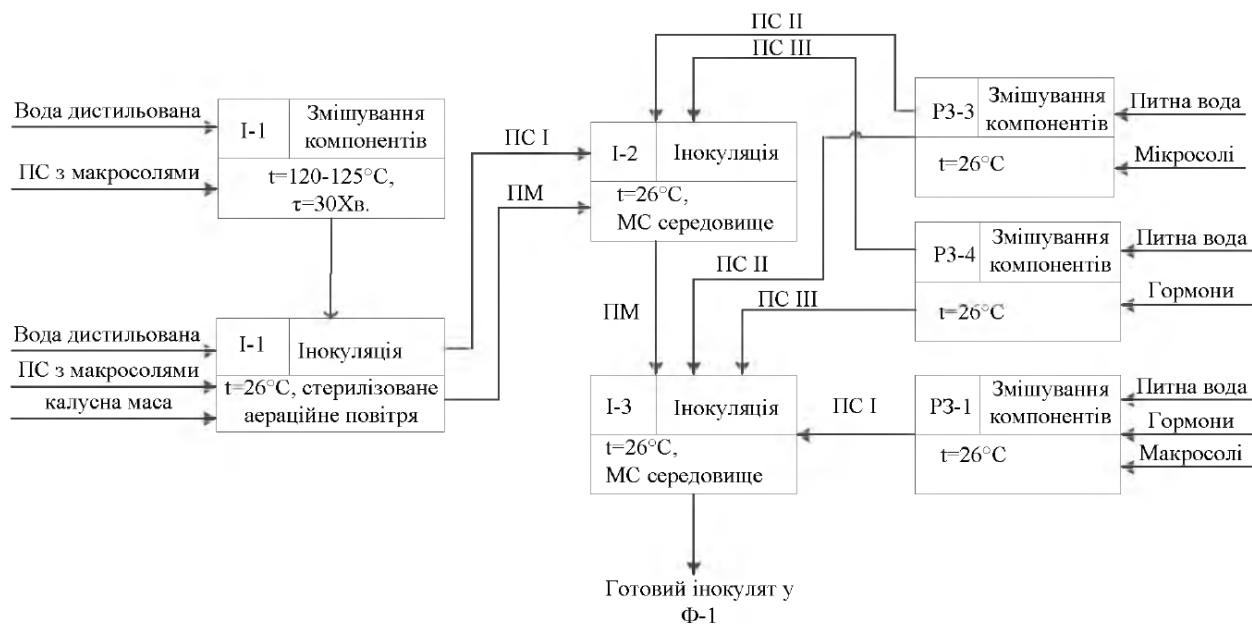


Рис. 3.5 Етап приготування ПМ і ПС I, II, III для робочої ферментації

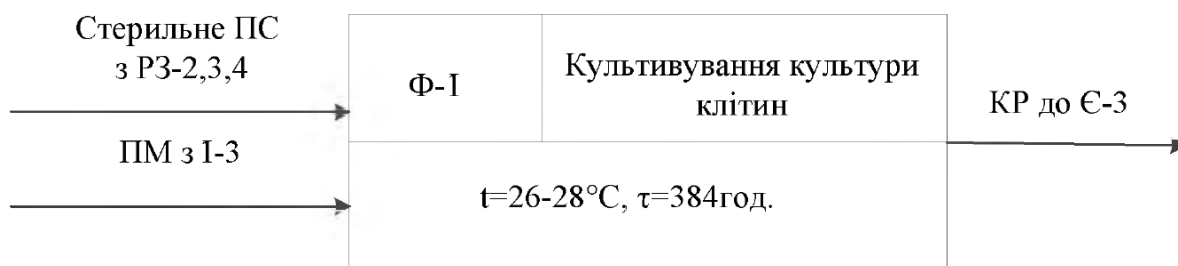


Рис. 3.6 Етап культивування

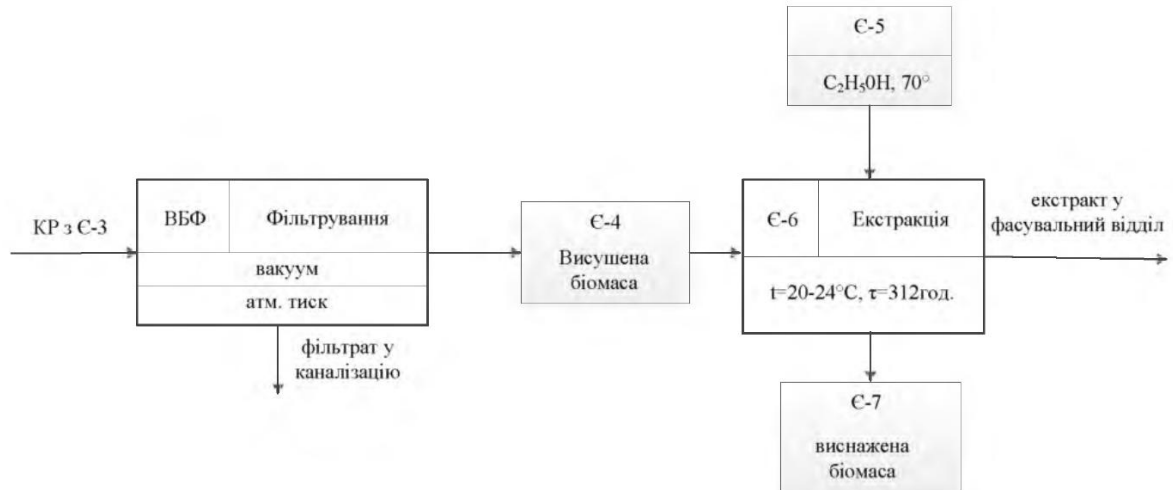


Рис. 3.6 Етап фільтрування та одержання екстракту

3.1.1 Опис технологічного процесу виробництва

Калюсну масу женьшеню вирощували і зберігали в лабораторних умовах. Посівний матеріал вирощували у три стадії [49, с.31].

В ферментер 9 завантажували дистильовану воду, розчин макроелементів. В оболонку апарата подавали глуху пару. Апарат герметизували. Суміш, перемішуючи, нагрівали до 120-125°C. З метою стерилізації витримували її 30 хв. Конденсат водяної пари, який є перегрітою водою, спрямовували у лінію спецканалізації через холодильник для зниження тиску конденсату до атмосферного і зниження його температури до 30...50°C.

У простерилізований апарат, що містить стерильний розчин макроелементів, додавали стерильні розчини мікросолей і вітамінів та гормонів. В оболонку подавали охолоджувальну (зворотну) воду, за рахунок чого стерильне поживне середовище охолоджується до температури культивування 26°C [49, с.29].

Після досягнення відповідної температури апарат з'єднували з атмосферою через індивідуальний фільтр. Готовий інокулят стерильним повітрям перетискали з 9 у середній інокулятор, в якому вже знаходиться стерильне поживне середовище (ПС) ПС I, ПС II та ПС III далі проводили аналогічний процес культивування. Для 22 ПС I готували в окремому реакторі-змішувачі 16. Підготовлене нестерильне ПС I

готове нестерильне ПС насосом 2 постійним потоком подавали у нагрівач 18, в який одночасно подавали гостру пару. Гаряче ПС спрямовували в змішувач - витримувач 19, в якому власне відбувається стерилізація ПС [50].

Далі гаряче стерильне середовище проходило крізь холодильник типу “труба в трубі” 20, охолоджується до температури культивування 260С і надходило у попередньо простерилізований великий інокулятор 22. Додавали ПС II та ПС III, апарат засівали посівним матеріалом з 11. Приготування поживних ПС II і ПС III Приготування ПС II і ПС III для інокуляції та культивування проводили паралельно з вирощуванням посівного матеріалу в інокуляторах [51].

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

Етап культивування. Для культивування біомаси поживне середовище готували в реакторі-змішувачі 5. Стерилізацію проводили перепускаючи через лінію УНС-20 у простерилізований ферментер за схемою: 5, тоді насосом 6 подавали в рекуператор, далі у нагрівач 18, витримувачі 19, рекуператор і, холодильник, у інакулятор 9. Одночасно в нагрівач 18 подавали гостру пару під тиском 3 атм з температурою 132,9°С, а в холодильник - охолоджувальну воду. На виході середовище повинно становити 26...28°С. Після завантаження у ферментер 9 ПС і посівного матеріалу, подавали стерильне аераційне повітря [48].

Проводять культивування, підтримуючи температуру 26...28°С подачею охолоджувальної води або пари в оболонку ферментера 9. Стерильне аераційне повітря одержували в глибинному фільтрі 23. На виході з фільтра потік повітря розгалужується і спрямовується крізь індивідуальні фільтри в 9 і 22. По закінченні вирощування біомаси культуральну рідину (КР) за 9 годин перекачували насосом 27 у буферну ємність 28 [48].

Конденсат водяної пари спрямовували у лінію зворотної каналізації через конденсаційний горщик. Використовували водяний фільтр де відбувається очистка газових викидів після аерації, який періодично наповнювали водою і з якого періодично забруднену воду дренували в каналізацію. Фільтрування КР з буферної

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

Одержання екстракту. Після завантаження біомаси в перколятор 37 з ємності 39 подавали розбавлений етанол. Перемішування при цьому здійснювали насосом 40, який працював в режимі рециркуляції. Екстрагент, що просочується крізь шар біомаси в 116 43, періодично повертали з 43 за допомогою насосу 45. Екстракт зливали в ємність 43. Залишок в перколяторі промивали чистою водою. Відкривали днище перколятора, промитий залишок вивантажували у відкриту ємність 44, встановлену на пересувний транспортний засіб за допомогою якого виснажену і промиту біомасу транспортували на звалище [42, с.76].

3.2. Оптимізація поживного середовища

Для ініціації калюсних культур клітин в якості експлантів використовували кореневище женьшеню.

Кореневище стерилізували спочатку 20 секунд в 70%-му етанолі. Після стерилізації його ополіскували, а потім триразово промивали протягом 20 хв в стерильній дистильованій воді. Потім розрізали на експланти і розмістили на безгормональні середовища 1-3 (табл. 3.1). Після трьох пасажів через місяць сформувався первинний калюс, який перемістили на середовища 4-7 (табл. 3.2). Після розростання отримані первинні калюси перемістили на варіанти середовищ 8, 9, 12, 13. Тривале субкультивування калюсів здійснювали послідовно на парах середовищ 10-11, 14-16 і 15-17.

Для варіантів 8-15 мінеральна основа по Гамборгу (B5); для варіантів 16-17 мінеральна основа по Мурасіге - Скуга (MS); загальні для всіх варіантів - сахароза 30 г/л, гідролізат казеїну 500 мг/л, мезоінозит 100 мг/л, тіамін 1 мг/л, піридоксин 1 мг/л, нікотинова кислота 5 мг/л, пантотенат кальцію 10 мг/л, агар 7 г/л.

Табл. 3.1

Склад поживних середовищ для ініціації калусоутворення (без регуляторів росту)

Речовина	Кількість на 1 л середовища		
	Середовище 1	Середовище 2	Середовище 3
Мінеральна основа	MS	MS	B5
Сахароза	30 г	-	30 г
Глюкоза	-	20 г	-
Тіамін	-	1 мг	-
Піридоксин	-	1 мг	-
Агар	5 г	7 г	5 г

Табл. 3.2

Склад поживних середовищ для вирощування калусної культури женьшеню

Речовина	Кількість на 1 л середовища			
	Середовище 4	Середовище 5	Середовище 6	Середовище 7
Сахароза	30 г	30 г	-	-
Глюкоза	-	-	20 г	20 г
НУК	-	1 мг	1 мг	1 мг
Кінетин	-	0,1 мг	0,1 мг	-
2,4-Д	-	-	-	5 г
БАП	-	-	-	0,1 мг
Агар	5 г	5 г	5 г	5 г

Табл. 3.3

Склад регуляторів росту (мг/л) в поживних середовищах для вирощування калусних

варіант середовища	2,4-Д	НУК	Кінетин	6 БАП
8	-	1	-	0,5
9	-	0,1	0,05	-
10	5	2	0,05	-
11	5	2	-	0,05
12	1	0,1	0,05	-
13	2	1	0,5	-
14	0,5	1	-	0,3
15	0,5	1	-	0,05
16	2	1	-	0,3
17	0,5	1	0,05	-

культур клітин женьшеню

Для вирощування первинного калюсу використовували середовища 4-7 (табл. 3.2). Для подальшого вирощування калюсів використовували кілька варіантів середовищ, що відрізняються за складом регуляторів росту і мінеральної основи. Склад середовищ представлений в табл. 3.3 [16].

Культивування отриманих ліній проводили в темряві при 26°C. Цикл субкультивування становив 4 тижні. Для вирощування калюсних культур використовували чашки Петрі (d=60 мм), калюс при пересіванні ділили на 4-6 частин стерильним скальпелем і пінцетом в ламінарному боксі.

Розрахунок ростових характеристик проводили за такими формулами :

1) Питому швидкість росту μ визначали за формулою :

$$\mu = \ln_{n+1} - \ln_n / t_{n+1} \quad (3.1)$$

де n - порядковий номер аналізу, t - час. Для отримання величини питомої швидкості росту в експоненті визначали межі на графіку, де μ максимальна і відносно постійна. У цих межах справедлива формула:

$$\mu_{cp} = (\Delta \ln X_t / X_{t+\Delta t}) / \Delta t \text{ (сут.}^{-1}\text{)}. \quad (3.2)$$

Для цього побудували графік зростання культури в напівлогарифмічному вигляді ($\ln X / X_0$), далі визначали відрізок кривої, де точки лежать приблизно на одній лінії. поєднуючи між собою не менше трьох точок, розраховували величину μ , справедливу для даного періоду.

2) Час подвоєння τ (сут.) Визначали за формулою:

$$\tau = \ln 2 / \mu, \quad (3.3)$$

де μ - питома швидкість росту.

3) Індекс зростання I визначали за формулою:

$$I = X_{\max} / X_0, \quad (3.4)$$

де X_{\max} - максимальне і X_0 - початкове значення параметрів [43].

Попередній фітохімічний аналіз біомаси двох ліній калюсних культур клітин женьшеню (вирощених на двох різних середовищах: B5 і MS, вік культур 18 діб) був проведений за допомогою хроматографії на тонкій пластині силікагелю (ТШХ). Повітряно-суху біомасу (40 мг) екстрагували 3 рази по 1 мл 70% (за обсягом) етилового спирту протягом 25 хвилин на ультразвуку, після чого центрифугували при 10000 об/хв протягом 10 хвилин і відбирали супернатант в грушоподібну колбу . Об'єднані спиртові екстракти випарювали під вакуумом при температурі 45оС. Отриманий сухий екстракт розчиняли в 1 мл дистильованої води і наносили на патрон для твердофазної екстракції Superclean ENVI-18. Патрон промивали в 3 мл води, аналіти змивали 3 мл етанолу. Отриманий розчин випаровували під вакуумом при 45 оС. Перед аналізом екстракти розчиняли в 1 мл 70% (за обсягом) етилового спирту.

Очищені екстракти (по 10 мкл) наносили на хроматографічну пластинку Kieselgel 60 (Merk, Німеччина). Для поділу глікозидів використовували систему етилацетат - крижана оцтова кислота - вода (32:9:9 за обсягом). Хроматограми проявляли реактивом анісовий альдегід - сірчана кислота.

«М'який» лужний гідроліз отриманих екстрактів здійснювали наступним чином. До 0,4 мл очищеного спиртового екстракту додавали 50 мкл водного розчину КОН (86 мг/мл). Отриману суміш інкубували в ультразвуковій ванні протягом 15 хвилин . Перед аналізом гідролізат нейтралізували , додаючи 50 мкл крижаної оцтової кислоти. [17-23].

Для отримання калюсних культур клітин на кореневищах женьшеню виявилось ефективним послідовне використання двох середовищ, спочатку безгормонального (2-3 пасажу) з подальшим перенесенням на середовище з оптимальної комбінації гормонів .Відповідно до проведених досліджень, оптимальна методика отримання калюсних культур клітин женьшеню може бути представлена наступною схемою. Після стерилізації з внутрішньої

частини кореневища вирізали експланти у вигляді квадратних пластин зі стороною 5 мм і товщиною 2 мм. Експланти витримували кілька пасажів на поживних середовищах без регуляторів росту (варіанти 1-3) для ініціації первинного калюсоутворення. Потім утворені первинні калюси відокремлювали від експлантів і переносили на середовища 4-7 для завершення калюсоутворення. Подальший стабільне зростання калюсу вдалося отримати на середовищі 7 (табл. 3.2).

Отримані калюсні культури пасеровано на середовищах 8, 9, 12 і 13 (з основою по В5). Відмінною особливістю калюсів на цих середовищах була тверда консистенція. Для розпушування калюси були перенесені на середовища 10 і 11 з вмістом 5 мг/л 2,4 Д і 2 мг/л НУК. Після утворення пухкого калюсу його перенесли на середовища 14 (В 5) і 16 (MS) - з меншим вмістом ауксинів.

Сформований пухкий калюс характеризувався повільним, але стабільним зростанням. Для поліпшення росту отриманих калюсних культур вони були пересажені на поживні середовища (15 і 17) з іншим змістом фітогормонів. В результаті проведених робіт було отримано кілька стабільно зростаючих ліній калюсних культур клітин женьшеню, вирощуваних на двох варіантах поживних середовищ: одне середовище з мінеральною основою по В5, що містить 2,4 Д, НУК, БАР в якості регуляторів росту (середовище 15), інша – з мінеральною основою по MS, що містить 2,4-Д, НУК, кінетин (середовище 17). Зовнішній вигляд отриманих калюсних культур клітин представлений на рис. 3.1.

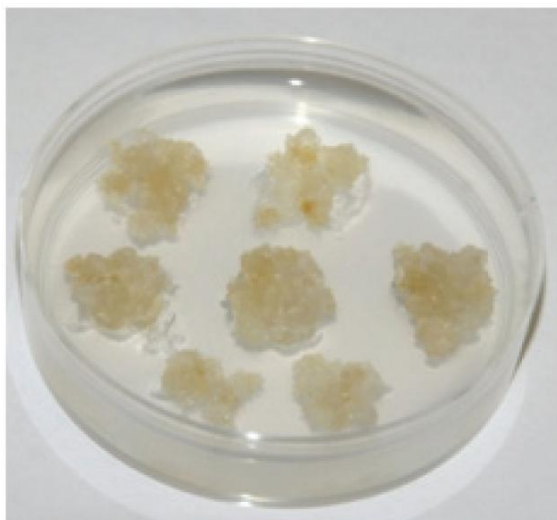


Рис. 3.1 Калюсні культури женьшеню на середовищах 15 і 17 відповідно

Для найбільш активно зростаючих калюсних ліній женьшеню були визначені ростові характеристики і побудовані ростові криві зі зміни сухої ваги калюсу, які представлені на рис. 3.2, рис. 3.3 в напівлогарифмічній системі координат.

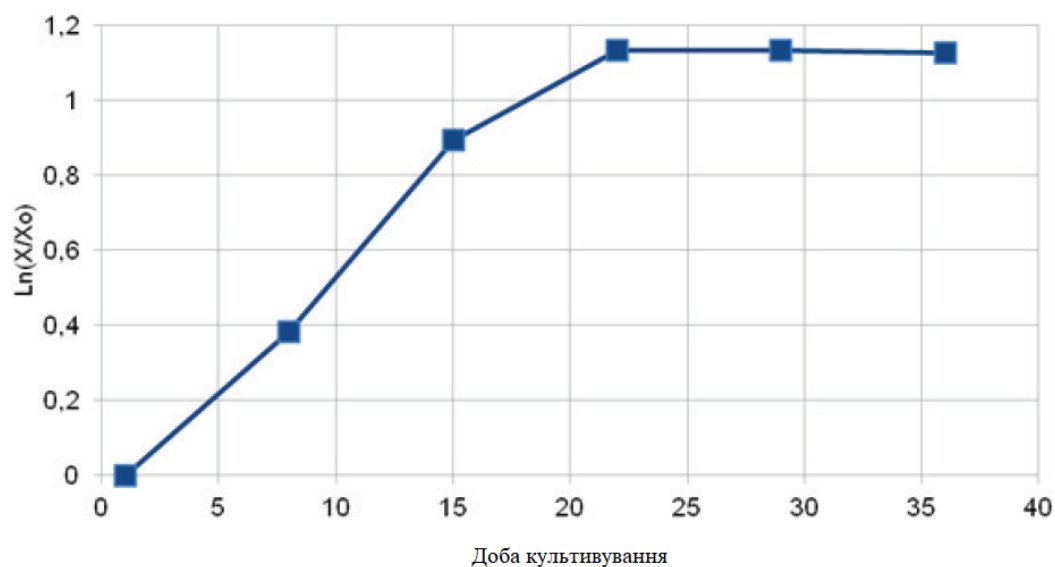


Рис.3.2 Збільшення сухої маси калюсу на середовищі 15

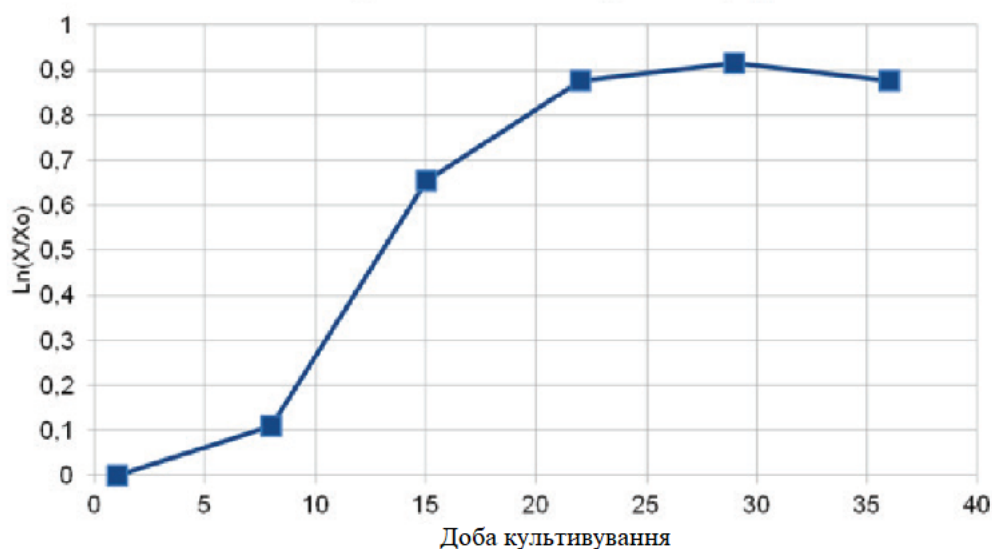


Рис. 3.3 Збільшення сухої маси калюсу на середовищі 17

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що обидві вивчені калюсні лінії на даному етапі мають стабільну швидкість

зростання, достатню для накопичення біомаси (табл. 3.4). Причому трохи активніший ріст відзначений на середовищі 17 (MS). Однак для більшої оптимізації умов вирощування цієї культури необхідно провести подальші дослідження.

Табл. 3.4

Основні ростові характеристики калюсних культур клітин женьшеню, розраховані по сухій біомасі

Параметр	На середовищі 15	На середовищі 17
Питома швидкість росту (μ)	0.064	0.093
Час подвоєння (T, сут.)	10,83	7,45
Індекс зростання (I)	3.09	2.40

Було проведено попередній фітохімічний аналіз спиртових екстрактів з біомаси двох найбільш інтенсивно зростаючих калюсних ліній женьшеню, які вирощували на двох різних поживних середовищах 15 і 17 (мінеральна основа по B5 і MS відповідно). Біомасу для аналізу відбирали на 18 добу культивування, аналіз проводили за допомогою хроматографії в тонкій пластині силікагелю (ТШХ). Результати ТШХ представлені на рис. 3.4.

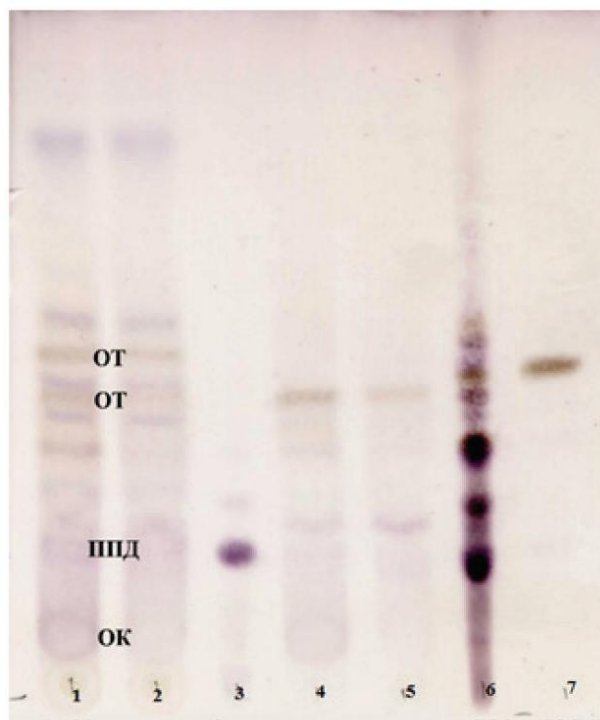


Рис. 3.4 Результати ТШХ екстрактів з біомаси калусних культур клітин

Отримані результати свідчать про присутність в спиртових екстрактах з біомаси досліджених ліній калюсу женьшеню декількох трітерпенових глікозидів - імовірно, похідних окотілола (характерна коричневе забарвлення при прояві ТШХ пластинки реактивом анісовий альдегід - сірчана кислота), а також протопанаксادیола і олеанолової кислоти (характерна синя забарвлення).

При проведенні м'якого лужного гідролізу екстрактів відбувалася зміна рухливості хроматографічних плям деяких глікозидів, що дозволяє припустити наявність ацільних замісників у відповідних з'єднаннях.

Таким чином, в отриманих калусних лініях женьшеню найбільш високі значення параметрів зростання даної культури відзначені на середовищі Мурасіге-Скуга, що містить 2,4 дихлорфеноксоцтову кислоту (2,4- Д), α - нафтилуксусну кислоту (НУК) і кінетин.

3.3 Економічна ефективність проекту

Надалі приведені економічне обґрунтування доцільного використання запропонованої зміни в технології. Проведені всі необхідні розрахунки, які наведені в таблиці 3.5

Табл. 3.5

Техніко-економічні показники виробництва

Найменування показника	Значення
1. Обсяг виробництва кг/рік	12.600
2. Виторг від реалізації продукції, грн./рік	3272220
3. Ціна грн./кг	259,7
4. Собівартість грн./кг	207,7
5. Інвестиційні витрати, грн.;	140598,7
6. Рентабельність продукції, %	25
7. Фондовіддача, грн./грн.	46,8
8. Строк окупності інвестиційних витрат, років	2

Розрахунок виробничої потужності проектного виробництва

Виробнича потужність проектного цеху (М) визначається по ведучому обладнанню по формулі:

$$M = A \cdot \Pi \cdot \Phi_d \quad (3.5)$$

де А – кількість однотипового обладнання, шт.;

Π – максимальна продуктивність одиниці обладнання кг/год

Φ_д – дійсний фонд роботи одиниці обладнання, год/рік

$$M = 1 \cdot 1,97 \cdot 7500 = 14775 \text{ кг/год}$$

Перевіримо відповідність заданої виробничої програми (В) розрахунковій величині (М). Обов'язкова умова при цьому: М > В. Оптимальне співвідношення цих величин повинно бути наступним:

$$K_{\text{інт}} = \frac{B}{M} \geq 0,85$$

$$K_{\text{інт}} = \frac{12600}{14775} = 0,85$$

Розрахунок поточних витрат

Собівартість одиниці продукції і річні поточні витрати визначаємо укрупнено. Розрахунок потреби в матеріальних ресурсах на запланований обсяг продукції визначається по кожному виду матеріалів у рецептурі і визначається по формулі:

$$P_j = H_{ji} \cdot B_i \quad (3.6)$$

де P_j – витрати $j^{\text{го}}$ компоненту сировини на 1 кг $i^{\text{го}}$ продукту;

H_{ji} – питома норма $j^{\text{го}}$ сировини чи матеріалу на 1 кг $i^{\text{го}}$ продукту;

B_i – виробництво $i^{\text{го}}$ продукту по проекту, кг/рік.

Розрахунок потреби сировини, матеріалів можна здійснити у виді таблиці 3.6.

Табл. 3.6

Потреба в сировині і матеріалах

Найменування компоненту	Норма витрати на 1 кг готового продукту	Об'єм виробництва, кг	Потреба
Калус клітин женьшеню	0,2	12600	2520
Живильна середа	0,4	12600	5040
Суцільний гомогенат клітин калуса	0,05	12600	630
Густий екстракт панаксозидів	0,1	12600	1260
Спирт етиловий 70%	2	12600	25200

На підставі розрахованої потреби в матеріальних ресурсах визначається їх вартість, що надалі використаємо для розрахунку собівартості продукції. Вартість сировини і матеріалів наведена у таблиці 3.7

Табл.3.7

Вартість сировини і матеріалів

Найменування компонента	Ціна, грн.	Потреба		Вартість, грн.	
		на 1 кг	на рік	на 1 кг	на рік
Калус клітин женьшеню	200	0,2	2520	40	50400

Живильна середа	50	0,4	5040	20	25200
Суцільний гомогенат клітин калуса	500	0,05	630	25	315000
Густий екстракт панаксозидів	300	0,1	1260	30	378000
Спирт етиловий 70%	15	2	25200	30	378000
Всього				145	768630

На підставі отриманих даних, складаємо калькуляцію собівартості продукції, яка наведена у таблиці 3.8.

Табл. 3.8

Собівартість продукції

Статті витрат	Витрати (собівартість)	
	На 1 кг, грн	на рік, грн
Сировина і матеріали	145	1827000
Допоміжні матеріали	10,15	127890
Енергозатрати	14,5	182700
Заробітна плата осн. вироб. робітників	7,25	91350
Нарахування на з/п	2,75	34650
Загальновиробничі витрати	14,49	182574
Виробнича собівартість	194,14	2446164
Адміністративні витрати	5,8	73080
Витрати на збут	7,76	97776
Собівартість	207,7	2617020
Ціна виробництва	259,7	3272220
Відпускна ціна	311,6	3926160

Визначення ціни і обсягу реалізації продукції

1) Ціна виробництва розраховується по формулі:

$$C_{\text{вир-ва}} = C_C + P_p = C_C \cdot 1 + \frac{R}{100} \quad (3.7)$$

де C_C – собівартість одиниці продукції, грн/од;

P_p – прибуток, одержуваний від реалізації одиниці продукції, грн/од;

R – рівень рентабельності, що задається, визначається розміром прибутку.

$$C_{\text{вир}} = 207,7 \cdot 1 + \frac{25}{100} = 259,7 \text{ грн}$$

2) Відпускна ціна продукції включає ціну виробництва і податок на додаткову вартість (20%):

$$C_{\text{відп}} = C_{\text{вир}} + \text{ПДВ} = C_{\text{вир}} \cdot 1 + \frac{20}{100} \quad (4.4)$$

$$C_{\text{від}} = 259,7 + 1 + \frac{20}{100} = 311,6 \text{ грн}$$

3) Обсяг реалізації продукції розраховується по формулі:

$$P = C_{\text{від}} \cdot B \quad (4.5)$$

де C – відпускна ціна одиниці продукції, грн/од;

B – річний випуск продукції, кг.

$$P = 311,6 \cdot 12600 = 3926160$$

Розрахунок інвестиційних (капітальних) витрат

Під інвестиційними витратами розуміють первісні інвестиції (капітальні вкладення), що забезпечують реалізацію продукту.

При визначенні суми інвестиційних витрат, у першу чергу, необхідно визначити вартість основних фондів проектного виробництва, що включають вартість обладнання і виробничих будинків і споруджень.

1) Розрахунок вартості обладнання

Розрахунок первісної вартості устаткування здійснено у таблиці 3.9

Табл. 3.9

Первісна вартість устаткування

Назва обладнання	Кількість одиниць	Ціна, грн./од.	Вартість грн.
Біореактор	1	20000	20000
Екстрактор	1	5600	5600

Сбірник живильної речовини	1	700	700
Сбірник готового продукта	1	700	700
Фільтри	3	1440	4320
Разом	28400		
Невраховане обладнання			2840
Транспортування			3976
Комплектація обладнання			426
Заготівельно-складські витрати			340
Трубопроводи			1420
Монтаж			7100
Спеціальні роботи			3408
Всього			47910

Вартість обладнання з урахуванням ПДВ:

$$S_{yc} = S_{yc} \cdot 1 + \frac{20}{100} = 57492 \text{ грн} \quad (3.8)$$

2) Розрахунок вартості будинків і споруджень

Вартість будинків і споруджень визначається виходячи зі структури капітальних вкладень хімічної промисловості, у якій вартість устаткування складає 60%, а витрати на будинки і спорудження відповідно – 40% від сумарних капітальних вкладень.

Розрахунок здійснюється по формулі:

$$S_{yc} = \frac{S_{об} \cdot 40}{60} \quad (3.9)$$

де $S_{об}$ – вартість устаткування, грн.

$$S_{yc} = \frac{47910 \cdot 40}{60} = 31940 \text{ грн}$$

У вартість будинку додатково включаються:

- 1) опалення і вентиляція – 7% – 2235,8 грн.
- 2) водопровід і сигналізація – 12% – 3832,8 грн
- 3) внутрішнє висвітлення – 5% – 1597 грн
- 4) внутрішні водостоки – 1% – 319,4 грн

5) зовнішній благоустрій – 14% – 4471,6 грн

$$\sum S_{yc} = 12488,5 \text{ грн.}$$

3) Визначення інвестиційних витрат проводять враховуючи передінвестиційні витрати, витрати на будівельно-монтажні роботи, витрати на обладнання, накладні витрати і витрати на закупівлю пускової партії сировини і матеріалів. Сума витрат наведена у таблиці 3.10

Табл. 3.10

Інвестиційні витрати

Найменування	Сума, грн.
Передінвестиційні витрати	4898,7
Вартість будинків і споруджень	12488
Витрати на устаткування	57492
Накладні витрати	6998
Вартість пускової партії сировини	57330
Інші витрати	1392
Разом	140598,7

Показники ефективності проектного виробництва

1) Розрахунок фондівіддачі виконується по формулі:

$$\Phi_{\text{від}} = \frac{P'}{OF} \quad (3.10)$$

де $\Phi_{\text{від}}$ – фондівіддача основних виробничих фондів, грн/грн;

P' – чистий обсяг продаж, тобто вартість реалізованої продукції без ПДВ, грн;

OF – вартість основних фондів, грн.

$$\Phi_{\text{від}} = \frac{3272220}{69980,5} = 46,8$$

Чистий обсяг продаж розраховується по формулі:

$$P' = B \cdot C_{\text{вир-ва}} \quad (3.11)$$

де B – річний обсяг випуску продукції, нат. од;

$C_{\text{вир-ва}}$ – ціна виробництва одиниці продукції, грн/од.

$$P' = 259,7 \cdot 12600 = 3272220$$

2) Рентабельність продукції розраховується по формулі:

$$R_{np} = [(C_{\text{вир-ва}} - C_{\text{од}})C / \text{од}] \cdot 100 \quad (3.12)$$

де $C_{\text{вир-ва}}$, $C_{\text{од}}$ – відповідно ціна виробництва і собівартість виготовлення одиниці продукції, грн/од.

$$R_{np} = \frac{259,7 - 207,7}{207,7} \cdot 100\% = 25\%$$

3) Строк окупності інвестицій визначається по формулі:

$$T_{ок} = \frac{K}{P_p} \quad (4.11)$$

де K – сума інвестицій витрат, грн;

P_p – прибуток від реалізації річного обсягу продукції, грн/рік

Прибуток від реалізації розраховується по формулі:

$$P_p = (C_{\text{вир-ва}} - C_{\text{од}}) \cdot B \quad (4.13)$$

де B – річний обсяг виробництва, нат. од.

$$P_p = 259,9 - 207,7 \cdot 12600 = 65520 \text{ грн/рік}$$

$$T = \frac{140598,7}{65520} = 2 \text{ роки}$$

Оскільки термін окупності менше 6 років, то інвестиції використовуються ефективно.

4) Рентабельність основних фондів розраховується по формулі:

$$R_{оф} = \frac{P_p}{ОФ} \cdot 100 \quad (3.14)$$

$$R_{оф} = \frac{655200}{69980,5} \cdot 100\% = 93,6\%$$

Таким чином, можна зробити висновок, що запропоновані у дипломній роботі технічні рішення є економічно вигідними. Строк окупності виробництва складає 2 року, що є дуже добрим показником.

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при виробництві калюсних культур женьшеню

Виходячи з технологічної частини пояснювальної записки в процесі виробництва мають місце такі небезпечні виробничі фактори:

1. Фізичні:

- підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може відбутися через тіло людини;
- підвищений рівень електромагнітних випромінювань;
- лабораторний посуд, що може у процесі роботи руйнуватися (наприклад скляний посуд).
- підвищена температура повітря робочої зони;
- підвищена вологість повітря.

2. Хімічні:

- хімічні речовини, що проникають в організм людини через органи дихання, кишково-шлунковий тракт і слизові оболонки.

3. Психофізіологічні:

- нервово-психічні перевантаження (перенапруга аналізаторів. монотонність праці, зоровий дискомфорт).

Підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може відбутися крізь тіло людини. Джерелами є електронагрівальні пристрої, комп'ютер, спеціальні пристрої. Підвищена вологість і висока температура повітря під час роботи з технічним електрообладнанням хімічних лабораторій, пари кислот і лугів можуть руйнувати ізоляцію проводів, різко погіршуючи її діелектричні властивості,

і, отже, сприяють переходу напруги на неструмопровідні частини електроустаткування. Небезпека – протягом усього робочого часу.

Підвищений рівень електромагнітних випромінювань. Джерелом є комп'ютер. Використовується для обробки та аналізу наукових даних. Хоча зараз сучасні комп'ютери випускають із захисними екранами або спеціально нанесеним на дисплей захисним шаром, це не вирішує проблеми впливу електромагнітного випромінювання на користувача комп'ютером. Є випромінювання, яке йде із задніх стінок комп'ютера при його роботі, якщо ця частина комп'ютера не захищена. Також додатковими джерелами служать периферійні пристрої комп'ютера - принтери, сканери та ін. Відмінною ж особливістю сучасних комп'ютерів є збільшення робочих частот центрального процесора і периферійних пристроїв, а також підвищення споживаної потужності до 400 - 500Вт. У результаті цього рівень випромінювання системного блоку на частотах 40 - 70 ГГц за останні 2 - 3 роки збільшився в тисячі разів і став набагато більш серйозною проблемою, ніж випромінювання монітора. Тривалість дії фактора – близько 20 год/ тиждень (половина робочого часу).

Лабораторний посуд, що може у процесі роботи руйнуватися (наприклад скляний посуд). Джерело – скляний посуд. Тривалість роботи зі скляним посудом – близько 15 год/тиждень.

Хімічні речовини, що проникають в організм людини через органи дихання, кишково-шлунковий тракт і слизові оболонки. Джерело – випари хімічних речовин, що знаходяться в лабораторії. Також під час проведення дослідів в лабораторії з хімічними речовинами, внаслідок недотримання правил охорони праці та невиконання прийнятих методик можуть при контакті з організмом людини викликати травми. Тривалість – протягом всього робочого часу, 40 год/тиждень.

Нервово-психічні перевантаження (перенапруга аналізаторів. монотонність праці, зоровий дискомфорт). Джерело – робота на комп'ютері. Тривалість дії фактора – близько 20 год/ тиждень (половина робочого часу), що вкладається в норму (не більше 6 год/день).

Підвищена температура повітря робочої зони. Джерело – електронагрівальний прилад – колбонагрівач. Тривалість дії фактора – 4 год/тиждень.

Підвищена вологість повітря. Джерело - випари води при визначенні сухого залишку пробита інших дослідів, що потребують нагрівання проби. Тривалість дії фактора – 4 год/тиждень.

4.2 Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних або шкідливих виробничих факторів при виробництві калюсних культур женьшеню

1. Небезпечне значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може відбутися крізь тіло людини. Забезпечення електроенергією електроприладів здійснюється від щита з розподільними трансформаторами, під'єданого до електричного ввідного пристрою через захисний вимикальний пристрій. Усе електроустаткування при напрузі понад 42В, а також устаткування і механізми, які можуть бути під напругою, занулені. Усі розетки мають маркування, із значенням напруги, яка подається. Всі елементи електричних приладів, по яких проходить струм мають біти надійно захищені від випадкового дотику. При експлуатації електронагрівальних приладів необхідно слідкувати за тим, щоб вони були розміщені якнайдалі від легкозаймистих речовин, матеріалів, предметів і конструкцій. Металеві та неметалеві електропровідні конструкції, комунікації та виробниче обладнання повинні бути заземленими. В них допускається напруга 42 В. Інколи в науково-дослідницьких роботах необхідно застосовувати установки з напругою 220 В і більше. Такі установки спричиняють особливу небезпеку. Робота на установках з напругою більше 220В повинна виконуватись не менше, ніж двома особами, одна з яких повинна мати кваліфікацію, яка дає право на виконання самостійних робіт на таких установках. Останні обладнуються захисним огороженням, заземленням, блокуванням, сигналізацією, рубильником в колах

живлення, плакатами та відповідно затвердженою інструкцією. Не можна залишати без нагляду не виключені електро- і радіоприлади, допускати до них сторонніх осіб.

В кабінетах, де є комп'ютерна техніка також існує потреба щодо вжиття необхідних заходів безпеки. Використання нової обчислювальної техніки потребує дотримання певних заходів безпеки при її експлуатації. В кабінеті повинна підтримуватись оптимальна температура 17-21°C, вологість 40-60 %. При роботі з обчислювальною технікою важливо враховувати оптимальні умови освітленості. В кабінеті забороняється доторкатися до електрообладнання, клем, електродротів, арматури і відкривати дверці електрошаф. Для персональних комп'ютерів дозволяється подавати напругу не більше 42 В. Приєднувати до електромережі комп'ютери з більш високою напругою живлення можна лише за допомогою шлангових дротів з подвійною ізоляцією. Їх штепсельні розетки, крім гнізд для робочих контактів, повинні мати ще одне гніздо для заземлення контакту. Справність ПК слід випробовувати один раз в 3 місяці.

2. Підвищений рівень електромагнітних випромінювань. Щоб уникнути несприятливого впливу електромагнітного випромінювання від комп'ютера на користувача необхідно:

- по можливості, варто придбати рідкокристалічний монітор, оскільки його випромінювання значно менша, ніж у поширених ЕЛТ моніторів (монітор з електронно трубкою).

- при покупці монітора необхідно звернути увагу на наявність сертифікату.

- системний блок і монітор повинен знаходитися якнайдалі від вас.

- не залишайте комп'ютер включеним на тривалий час якщо ви його не використовуєте, хоча це і прискорить знос комп'ютера, але здоров'я корисніше. Так само, не забудьте використовувати "сплячий режим" для монітора.

- у зв'язку з тим що електромагнітне випромінювання від стінок монітора набагато більше, постарайтеся поставити монітор в кут, так що б випромінювання поглиналося стінами. Особливу увагу варто звернути на розстановку моніторів в офісах.

- по можливості скоротіть час роботи за комп'ютером і частіше переривайте роботу.

- комп'ютер повинен бути заземлений.

3. Лабораторний посуд, що може у процесі роботи руйнуватися (наприклад скляний посуд). Щоб уникнути руйнування скляного посуду, його спочатку перевіряють за допомогою полярископа.

Під час зборки скляної апаратури гумові пробки та трубки підбирають по розміру скла, а руки захищають рушником чи ганчірками для уникнення порізів при руйнуванні пристроїв. Забороняється закривати нагріті скляні посудини притертими пробками до їх охолодження.

Мити хімічний посуд передбачено у приміщеннях, які мають раковини, мийки та обладнання для її зберігання та сушки. Не дозволяється у раковину викидати чи зливати концентровані розчини кислот та лугів, хромову суміш, речовини з неприємним запахом та інші реактиви. Вони зливаються у спеціальні ями для виключення небезпеки опіку.

Під час розбору апаратури потрібно дотримуватися обережності при торканні до гарячого скляного посуду та нагрівачам. Гарячі колби ставлять на листовий азбест.

4. Хімічні речовини, що проникають в організм людини через органи дихання, кишково-шлунковий тракт і слизові оболонки. Щоб уникнути потрапляння хімічних речовин до організму людини, необхідно дотримуватися правил техніки безпеки в хімічних лабораторіях. Також, як додатковий профілактичний захід використовують засоби індивідуального захисту.

Щоб уникнути або зменшити шкідливий вплив хімічних речовин на організм дослідника, необхідно чітко притримуватись наступних заходів з охорони праці:

- 1) перед початком робіт проводити інструктаж на робочому місці з виконавцями робіт;
- 2) спостерігати за повною герметичністю систем;
- 3) проводити систематичний нагляд за роботою вентиляційних систем;

4) роботи проводити тільки в спеціальному одязі та спеціальному взутті з обов'язковим використанням засобів індивідуального захисту (спецодяг із кислотостійких тканин, бавовняні, лляні тканини та резинові рукавички, а для захисту очей – спеціальні окуляри та ін.);

5) всі робочі місця забезпечувати необхідною кількістю води та нейтралізуючих речовин.

Спецодяг, спецвзуття та індивідуальні засоби захисту повинні повністю захищати людину від шкідливої дії токсичних речовин.

5. Нервово-психічні перевантаження (перенапруга аналізаторів. монотонність праці, зоровий дискомфорт). Порушення зорових функцій у користувачів комп'ютерів пов'язані, в основному, з трьома групами факторів:

- параметрами освітлення робочого місця;
- характеристиками дисплея;
- специфікою роботи за комп'ютером.

Тому, необхідно звернути увагу на забезпечення раціонального освітлення на робочому місці, використання сучасних дисплеїв з покращеними характеристиками, дотримання режимів праці та відпочинку, а також необхідно щоб центр екрана дисплея був нижчий від кута зору людини.

6. Підвищена температура повітря робочої зони. Захист від прямої дії теплового випромінювання здійснюється екрануванням - встановленням термічного опору на шляху теплового потоку. Екрани захищають людину не тільки від теплових променів, а й оберігають від дії іскор і розжарених та гарячих бризок, виплесків рідин та викидів шлаків та окалини. Полегшенню тепловіддачі від тіла людини сприяє підвищення швидкості руху повітря, що омиває тіло. Здійснюється це за допомогою вентиляційних систем. Отже необхідна витяжна шафа з використанням теплоізолюючого матеріалу.

При необхідності виконання робіт в зоні підвищеної температури повітря або в гарячих реактивних зонах користуються засобами індивідуального захисту від інфрачервоних випромінювань - термозахисним одягом, ізолюючими апаратами органів дихання, спеціальними рукавичками.

7. Підвищена вологість повітря. Для зменшення вологості слід уникати технологічних процесів з відкритими поверхнями випаровування рідини. Технологічне обладнання повинно бути герметизоване, а для видалення пари - обладнане витяжками. Як засіб видалення вологи із повітря приміщення використовується вентиляція. В приміщеннях, де діють оптимальні норми мікроклімату, слід встановлювати апарати для кондиціонування повітря.

4.2.1. Розрахунок загального освітлення

Для створення сприятливих умов праці важливе значення має раціональне освітлення. Недолік освітлення робочого місця перешкоди у здійсненні робіт, веде до погіршення зору, зниження продуктивності праці і може стати причиною нещасних випадків. Для нормальної зорової роботи без перенапруги очей використовується в лабораторії як загальне штучне, так і місцеве, тобто комбінована система освітлення. Освітлення робочого місця повинно бути близьким по спектрального складу до сонячного світла як найбільш гігієнічному; рівномірним і стійким; без різких тіней і блеклості в поле зору; відповідної кольоровості і не бути джерелом додаткових шкідливих і небезпечних факторів (за надлишку тепла, шуму, електро- і пожежонебезпеки) [53]

Освітлення робочого місця нормується згідно з Державними будівельними нормами України: ДБН В.2.5-28-2006 Інженерне обладнання будинків і споруд. Природне і штучне освітлення.

Мінімальна освітленість встановлюється в залежності від розряду виконуваних зорових робіт. Для IV розряду зорових робіт вона складає 300...500 лк.

Перевіримо освітленість робочого місця на відповідність розряду зорової роботи. За даними вимірювань рівень природної освітленості поверхні, де розташований ПК, складає 200 лк за освітленості тієї же поверхні відкритим небосхилом в 20000 лк, тобто КПО = 1%, що не відповідає нормативному КПО.

Для штучного освітлення у приміщенні використовуються люмінесцентні лампи.

Розрахунок штучного освітлення проведемо для лабораторії площею 20 м², ширина якої складає 5м, довжина – 4м, висота – 3м.

Скористаємося методом використання світлового потоку. Для визначення потрібної кількості світильників, які повинні забезпечити нормований рівень освітленості, визначимо світловий потік, що падає на робочу поверхню за формулою:

$$F = \frac{E \cdot K \cdot S \cdot Z}{\eta}, \text{ де} \quad (1)$$

F – світловий потік, що розраховується, Лм;

E – нормована мінімальна освітленість, Лк; *E* = 300 Лк;

S – площа освітлюваного приміщення (у нашому випадку *S*=20м²);

Z – відношення середньої освітленості до мінімальної (зазвичай приймається рівним 1,1... 1,2, в нашому випадку *Z* =1,1);

K – коефіцієнт запасу, що враховує зменшення світлового потоку лампи в результаті забруднення світильників в процесі експлуатації (його значення залежить від типу приміщення і характеру робіт, що проводяться в ньому, в нашому випадку *K* = 1,5);

η – коефіцієнт використання світлового потоку, (виражається відношенням світлового потоку, що падає на розрахункову поверхню, до сумарного потоку всіх ламп, і обчислюється в долях одиниці; залежить від характеристик світильника, розмірів приміщення, забарвлення стін і стелі, що характеризуються коефіцієнтами відбиття від стін ($\rho_{\text{стн}}$) і стелі ($\rho_{\text{стелі}}$)), значення коефіцієнтів дорівнюють $\rho_{\text{стн}} = 40\%$ і $\rho_{\text{стелі}} = 60\%$.

Обчислимо індекс приміщення за формулою:

$$I = \frac{S}{h(A+B)}, \text{ де} \quad (2)$$

S – площа приміщення, *S* = 20м²; *h* – розрахункова висота підвісу, *h* = 2,9 м; *A* – ширина приміщення, *A* = 4 м; *B* – довжина приміщення, *B* = 5 м.

Підставивши значення отримаємо:

$$I = \frac{20}{2,9 \cdot (4 + 5)} = 0,77$$

Знаючи індекс приміщення, знаходимо $\eta = 0,22$.

Підставимо всі значення у формулу для визначення світлового потоку F :

$$F = \frac{300 \cdot 1,5 \cdot 20 \cdot 1,1}{0,22} = 45000 \text{ Лм}$$

Для освітлення використані люмінесцентні лампи типу ЛБ 40-1, світловий потік яких $F = 4320 \text{ Лм}$. Розрахуємо необхідну кількість ламп у світильниках за формулою:

$$N = \frac{F}{F_{\text{л}}}, \text{ де} \quad (3)$$

N – кількість ламп, що визначається; F - світловий потік, $F = 45000 \text{ Лм}$; $F_{\text{л}}$ - світловий потік лампи, $F_{\text{л}} = 4320 \text{ Лм}$

$$N = \frac{45000}{4320} = 11.$$

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки при виробництві калюсних культур женьшеню.

Причини пожеж і загорянь в гідрохімічній лабораторії можуть бути такі:

- несправний пристрій, чи порушення режиму роботи систем опалення, вентиляції і кондиціонування повітря;
- несправний пристрій, чи перевантаження електричних установок і мереж (неправильний вибір перетинів чи проводів підбор електроустаткування, несправність засобів захисту мереж від перевантажень і ін.);

- самозапалювання і самозаймання речовин і матеріалів при неправильному їхньому збереженні чи застосуванні;
- необережне поводження з вогнем (паління в невстановлених місцях, недбале проведення вогневих робіт, залишення без догляду електронагрівальних приладів і т.п.).

До небезпечних факторів пожежі відносяться:

- відкритий вогонь чи іскри;
- підвищена температура повітря, предметів і т.п.;
- токсичні продукти горіння;
- дим (високодисперсна аерозоль із твердими частками);
- знижена концентрація кисню;
- вибух.

Загальні вимоги до систем запобігання пожеж і пожежного захисту регламентується міждержавними стандартами системи стандартів безпеки праці ГОСТ 12.1.004-91 і ГОСТ 12.1.010-76 і спеціальною нормативно-технічною документацією.

Для пожежної профілактики порушення режиму роботи необхідно:

- 1) користуватися електроспоживачами, шнури живлення яких мають триполюсну вилку з попереджувачим включенням заземлюючого проводу;
- 2) не вмикати в електромережу електроспоживачі, шнури живлення яких мають пошкоджену ізоляцію;
- 3) не вмикати в електромережу електроспоживачі, які мають пошкодження або ненадійно з'єднані з електрошнуром живлення, вилками, розетками та подовжувачами;
- 4) не вмикати електроспоживачі в розетки, які не мають захисних, направляючих;
- 5) не застосовувати для опалення приміщень нестандартного (саморобного) електронагрівального обладнання або ламп розжарювання;

б) при користуванні електроспоживачами, які мають окремий, самостійний провід заземлення, перед включенням його в електромережу перевірити наявність та надійність приєднаного проводу до відповідних клем;

7) самостійно не замінювати зіпсовані електрозапобіжники, електролампи, не проводити ремонт електроспоживачів та електромережі;

8) не залишати без догляду працюючі електроспоживачі;

9) по закінченні робочого дня вимкнути вимикач на електроспоживачі та від'єднати провід живлення від розетки електромережі. При цьому слід пам'ятати, що від'єднуючи вилку електроспоживача від розетки, її слід тримати за корпус, а не смикати за провід живлення, бо можна висмикнути один з проводів і потрапити під дію електричного струму.

Профілактика пожеж від перевантажень:

- при проектуванні необхідно правильно вибирати переріз провідників мереж і схем за допустимою величиною струму;

- в процесі експлуатації електричних мереж не можна включати додатково електроприймачі, якщо мережа на це не розрахована;

- для захисту електрообладнання від струмів перевантаження найбільш ефективні автоматичні і електронні схеми захисту, виключателі, теплові реле і плавкі запобіжники.

З метою попередження можливостей загоряння і виникнення пожеж у гідрохімічній лабораторії необхідно:

- робочі місця і проходи звільнити від зайвих предметів;

- не працювати з легкозаймистими речовинами на відкритому вогні і поблизу електронагрівальних приладів;

- легкозаймисті речовини зберігати в товстостінному посуді з притертим корком (ємністю не більше 1 л), поміщеному у металеву скриню;

- у процесі виконання роботи перевіряти крани газових пальників.

Для забезпечення пожежовибухобезпеки важливе значення має підтримка необхідного теплового режиму обладнання за допомогою природної або механічної вентиляції, а також тепловідводів спеціального призначення. Необхідно прийняти

ряд заходів, для забезпечення гасіння пожеж. До них відносяться будівництво димових люків для видалення та обмеження розповсюдження диму, який виникає при пожежі, будівництво спеціальних сходів, забезпечення під'їздів до споруд, будівель та джерел води. Для гасіння пожеж використовують вогнегасники (пінні, рідинні, газові).

При виникненні пожежі рекомендуються наступні дії:

- вивести людей і матеріальні цінності з небезпечної зони;
- викликати пожежну охорону;
- вжити заходи по локалізації пожежі;
- по можливості, вжити заходи по гасінню пожежі.

Безпека при вибухах забезпечується встановленням мінімальної кількості вибухонебезпечних речовин, які використовують у лабораторіях; використання обладнання, яке розраховане на тиск вибуху; застосування активних систем зменшення вибуху та засобів попереджування.

Для запобігання пожеж і вибухів необхідно виключити можливість утворення вибухонебезпечного середовища, підвищення температури і тиску даного середовища вище максимально допустимих значень горючості..

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Виробничі фактори виробництва калюсних культур женьшеню, що впливають на навколишнє середовище

Проблема профілактики негативного впливу біологічних чинників виробничого середовища на організм людини та навколишнє природно середовище набуває все актуальнішого соціально-гігієнічного й медико-біологічного значення.

При виробництві калюсних культур женьшеню споживається велика кількість води та повітря, які забруднюються мікроорганізмом-продуцентом, органічними та мінеральними речовинами. Склад стічних вод та відпрацьованого повітря дуже складний.

У процесі виробництва калюсних культур женьшеню робітники підпадають під вплив таких виробничих чинників, як мікроклімат та біологічний фактор, до якого належить багатокomпонентний органічний пил, що включає умовно-патогенну мікрофлору [37].

Мікроорганізми зазвичай не вважаються патогенними для людини, проте інколи здатні викликати отруєння їжі токсинами. Їх спори здатні виживати при значному та тривалому нагріванні, тому не вмирають при звичайних методах приготування їжі. При проростанні спор при зберіганні продуктів, ці бактерії викликають утворення слизкого шару на поверхні продуктів, за що відповідають довгі полісахариди, які вони секретують. При неправильному поводженні в лабораторії з даними мікроорганізмами можливе виникнення отруєння працівників.

У повітрі ці бактерії знаходяться у вигляді спор завдяки їхньому пасивному та активному розсіюванню, причому їхня кількість залежить від багатьох факторів. Вивчення мікобіоти повітря має важливе санітарно-гігієнічне та фітопатологічне значення. Підвищена кількість бактерій у повітрі виробничих приміщень під час

виробництва калюсних культур женьшеню негативно впливає на здоров'я персоналу. Потрапляючи в легені при диханні, спори можуть осідати на слизових оболонках та уражувати їх внаслідок заселення та виділення токсичних речовин. Ступінь ураження та клінічні прояви захворювання залежать від кількості спор у повітрі, чутливості та імунного статусу організму [9].

За даними літератури, вплив на здоров'я працюючих здійснюють не лише спори/клітини бактерій, але й клітинні фрагменти, яким досі приділяють мало уваги. Доведено, що дрібні частинки (менше 2,5 мкм) чітко зумовлюють побічні ефекти на здоров'я людей. Встановлено, що значна кількість імунологічно активних часток мають розміри суттєво менші, ніж спори, що виділяються з поверхонь, забруднених грибами. Дуже маленькі частинки (0,3 мкм) кількісно перевищували кількість спор більш ніж у 320 разів. Проблема розпізнавання таких часток полягає в тому, що дрібні й дуже дрібні клітинні фрагменти неможливо виявити традиційними методами дослідження зразків біоаерозолів. Проте попередніми знахідками фрагментів міцелія (великі фрагменти, що виявляються при світловій мікроскопії) підтверджена така можливість.

Показано, що концентрація фрагментів бактерій у повітрі приміщень досягає рівня від 29 до 146 частинок у 1 м³, тобто до 6,3 % усіх елементів. Бельгійські вчені повідомили, що частинки бактерій часто відриваються від забруднених поверхонь і деякі з цих фрагментів залишаються життєздатними і можуть проростати [8].

Бактеріальні клітини можуть викликати захворювання алергенного характеру. У осіб з серйозними імунодефіцитними станами може бути пряма інфекція. Основним шляхом потрапляння бактерій та їх спор в організм є шлунково-кишковий тракт та органи дихання [1].

5.2. Методи очистки стічних вод при виробництві калюсних культур женьшеню

З метою уникнення забруднень навколишнього середовища необхідно очищати стічні води виробництва калюсних культур женьшеню.

1. Механічні методи усунення забруднень

Суть механічного методу полягає в тому, що із стічних вод видаляють механічні домішки (нерозчинні). Механічне очищення дозволяє видаляти з стічних вод до 60–75 % нерозчинних домішок. Цей метод очистки стічних вод є найбільш дешевим.

Спорудження для механічної очистки стічних вод: решітки (або УФС – установка фільтрувальна самоочищаюча) і сита; пісколовки; первинні відстійники; мембранні елементи [20].

Для затримання великих частинок органічного і неорганічного походження застосовують решітки і сита. Максимальна ширина складає 16 мм. Далі стоки проходять через пісколовки, де відбувається осадження дрібних частинок під дією сили тяжіння і жироловки, за допомогою якої відбувається видалення з поверхні води гідрофобних речовин шляхом флотації.

Для звільнення стічних вод від дуже маленьких частинок застосовують фільтрування шляхом пропускання через шар зернистого матеріалу. Досить поширеними є мембранні фільтри. Після такої очистки стічні води направляють на первинні відстійники для видалення зважених частинок, здебільшого органічного походження [2, 18]. Як показали дослідження, в осад випадає більше 80 % зважених речовин. Зниження БСК складає 20–30 %.

Так, кору видаляють зі стічних вод за допомогою барабанних і сітчастих фільтрів. Волокна фільтрують через сітчасті фільтри з подальшим відстоюванням в горизонтальних або вертикальних відстійниках [33, 35, 39].

Механічну очистку як самостійний метод застосовують тоді, коли освітлена вода після цього способу очистки може бути використана в

технологічних процесах виробництва і спущена у водойми без порушення їх екологічного стану. У всіх інших випадках механічна очистка слугує першим етапом очистки стічних вод [31, 33].

2. Фізико-хімічні методи усунення забруднень

Фізико-хімічна очистка полягає в тому, що в стічні води вводять речовину-реагент (коагулянт чи флокулянт). Вступаючи в хімічну реакцію з домішками, які знаходяться у воді, ця речовина сприяє повному видаленню нерозчинних домішок, колоїдів і частини розчинних з'єднань [2, 41]. При цьому зменшується концентрація шкідливих речовин в стічних водах, розчинні з'єднання переходять в нерозчинні чи розчинні, але не шкідливі, змінюється реакція стічних вод (відбувається їх нейтралізація) тощо. В залежності від необхідного ступеня очистки стічних вод фізико-хімічна очистка може бути завершальною чи другою стадією перед біологічною.

Найчастіше з фізико-хімічних методів застосовуються коагуляція, окислення, сорбція [28, 29], екстракція і т.д. [31, 37].

3. Біологічні методи усунення забруднень

Серед методів очищення стічних вод велику роль відіграє біологічний метод, заснований на використанні закономірностей біохімічного і фізіологічного самоочищення річок й інших водоймищ.

Біологічна очистка передбачає деградацію органічних речовин стічних вод мікроорганізмами (бактеріями і найпростішими) [2, 18]. На даному етапі відбувається мінералізація стічних вод, видалення органічного азоту і фосфору, головною метою є зниження БСК₅. Можуть використовуватися як аеробні, так і анаеробні організми.

Очисні установки біологічної очистки можна розділити на два основних типи:

- установки, в яких очистка відбувається в умовах, близьких до природних;
- установки, в яких очистка відбувається в штучно створених умовах.

До першого типу відносяться установки, в яких відбувається фільтрування очищаючих стічних вод через ґрунт (поля зрошування і поля фільтрації) і

установки, які представляють собою водойми (біологічні ставки) з проточною водою. В таких установках дихання мікроорганізмів киснем відбувається за рахунок безпосереднього поглинання його з повітря. Кліматичні умови і велика площа, яка використовується обмежує розвиток природних методів очистки стічних вод.

В установках другого типу мікроорганізми дихають киснем за рахунок подачі його через поверхню води (реаерація) чи за рахунок механічної аерації. В таких умовах процес очистки відбувається більш інтенсивно, так як створюються кращі умови для розвитку активної життєдіяльності мікроорганізмів [37].

Важливим є те, що навіть 90–95 % технічна ефективність споруд біологічної очистки (біоставки, поля зрошування, поля фільтрації) не гарантує достатнього видалення зі стічних вод органічних речовин. Біологічно очищені стічні води мають високу кольоровість (до 400 °). Запах стічних вод зникає при розведенні в 200 разів. ХСК біологічно очищених вод досягає 280–350 мг O₂/л. При відведенні таких стічних вод у поверхневі водойми вода в них має неприємний запах на відстані до 20 км нижче ділянки випуску. Він зникає лише при розведенні в 2–5 разів. У 3–4 рази зростає кольоровість води у водоймах, різко знижується концентрація розчиненого у воді кисню. У десятки разів зростає вміст завислих частинок [15, 36, 39].

З технічної точки зору розрізняють декілька варіантів штучної біологічної очистки. На даний момент основними є активний мул (аеротенки), біофільтри і метанотенки (анаеробне бродіння) [31].

У біофільтрах стічні води пропускаються через шар грубозернистого матеріалу, покритого тонкою бактерійною плівкою. Завдяки цій плівці інтенсивно протікають процеси біологічного окислення. Саме вона служить діючим початком в біофільтрах.

Аеротенки – величезні резервуари із залізобетону. Тут очисне начало – активний мул з бактерій і мікроскопічних організмів. Бактерії склеюються в пластівці і виділяють ферменти, що мінералізують органічні забруднення. Мул з пластівцями швидко осідає, відділяючись від очищеної води. Інфузорії, джгутикові,

амеби, коловертки й інші найдрібніші тварини, пожираючи бактерії, що не злипаються в пластівці, омолоджують бактерійну масу мулу.

Особливістю анаеробних методів очистки є отримання в якості концентрованих кінцевих продуктів метану та CO_2 . При використанні таких методів не потрібна аерація і утворюється незначна кількість надлишкового мулу. Особливістю аеробних методів очистки є забезпечення водних біоценозів киснем. Кисень використовується для окислення забруднювачів, які містяться у воді шляхом отримання мінеральних з'єднань і біомаси [32, 34].

При анаеробному розкладанні органічних речовин з утворенням метану лише 8 % енергії витрачається на приріст біомаси, 3 % складають теплові витрати і 89 % переходить в метан. Анаеробні мікроорганізми ростуть дуже повільно і потребують велику концентрацію субстрату.

Аеробний процес: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{мікробна біомаса} + \text{тепло}$.

Анаеробний процес: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + \text{мікробна біомаса} + \text{тепло}$.

Очищення стоків з високою концентрацією забруднюючих речовин краще використовувати анаеробний метод очистки. Перевагою цього методу в порівнянні з аеробним є отримання енергетично цінного біопалива. Також, слід відзначити, що анаеробний процес здійснюється при невеликих потребах в електроенергії, не потребує додаткових поживних речовин в процесі ферментації, майже не вимагає технологічного обслуговування, відсутність запаху, оскільки реактор закритий.

Інтенсивність процесу очистки стічних вод в тій чи іншій установці визначається окислювальною потужністю установки, під якою розуміють число грамів кисню, який отримують з 1 м^3 установки за добу і використовують для зниження біологічної потреби в кисні стічних вод, окислення амонійних солей до нітритів і нітратів, а також для підвищення вмісту в стічних водах розчинного кисню. Окислювальна потужність для різних установок коливається в широких межах [31].

4. Дезінфекція стічних вод

Для остаточного знезараження стічних вод, які скидаються у природні водойми застосовують установки ультрафіолетового опромінювання. Для

зnezараження біологічно очищених стічних вод разом з ультрафіолетовим опроміненням застосовують також хімічну обробку – хлором або хлорним вапном впродовж 30 хвилин. Хлорування застосовують також для видалення речовин, що мають неприємний запах [15, 36, 39]. Для дезинфекції використовують і фізико-хімічні прийоми (ультразвук, електроліз, озонування та ін.) [16, 31, 38].

5.3. Заходи щодо поліпшення впливу виробництва калюсних культур женьшеню на організм людини

З метою уникнення негативного впливу бактерій на організм людини рекомендовано дотримуватись наступних заходів безпеки:

- До технологічних заходів відносяться такі як автоматизація та механізація процесів виробництва калюсних культур женьшеню, дистанційне керування процесом, герметизація резервуарів.

- Санітарно-технічні заходи: обладнання робочих місць місцевою витяжною вентиляцією або переносними місцевими відсмоктувачами.

- Лікувально-профілактичні заходи: організація і проведення попередніх та періодичних медичних оглядів, дихальної гімнастики, лужних інгаляцій, забезпечення лікувально-профілактичним харчуванням і молоком та ін.

- Особлива увага повинна приділятися застосуванню засобів індивідуального захисту, перш за все для захисту органів дихання (фільтруючі і ізолюючі протигази, респіратори, захисні окуляри, спеціальний одяг) [27].

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Акушская А.С. Комплексное фармакогностическое и фармакоэкономическое изучение женьшеня с точки зрения ресурсосберегающих технологий / А.С. Акушская, В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Журнал «Известия Самарского научного центра РАН». – 2014. – №16, №1 (5). - С.973-976.
2. Акушская А.С. Корень женьшеня: современный взгляд на создание препаратов и их применения в медицинской практике / А.С. Акушская, В.А. Куркин // Медицина XXI века: тенденции и перспективы: II международная научная Интернет-конференция. - 2013. - С. 10-14.
3. Акушская А.С. Культивирование женьшеня настоящего в Самарской области как вклад в сохранение вида / В.А. Куркин, А.С. Акушская, М.В. Шнытко, Л.А. Клейн // Известия Самарского научного центра РАН. - 2013. - Т. 15, №3(6).-С. 1722-1724.
4. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів / О.В. Дубровна, Т.В. Чугункова, А.В. Бавол [та ін.]. – К.: Логос, 2012. – 428 с.
5. Белокурова В.Б. Методи біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин / В.Б. Белокурова // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 58-72.
6. Бугара И.А. Клеточная селекция каллусных культур *Glycine max* на устойчивость к осмотическому стрессу / И.А. Бугара, Э.А. Юнусова // Экосистемы. – 2016. – Вып. 8. – С. 83–87.
7. Бунцевич Л. Л. Выращивание женьшеня в культуре *in vitro*, разработка напитков с применением его экстрактов / Л. Л. Бунцевич, Н. М. Агеева, М. А. Костюк // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2014. – № 30 (06). – С. 33-44.
8. Бунцевич Л. Л. Свойства женьшеня, биотехнологический способ культивирования и применение продуктов его переработки в пищевой

- индустрии [Текст] / Л. Л. Бунцевич ; СКЗНИИСиВ // Достижения науки и техники АПК. - 2004. - №7. - С. 20-21.
9. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко // М.: Наука, 1964. – 272 с.
10. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 146 с.
11. Величко Н.А. Оптимизация условий культивирования каллусной ткани *Digitalis purpurea* L. / Н.А. Величко, Я.В. Смольникова // Биотехнология и общество в XXI веке. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 326–329.
12. Ветчинкина Е.М. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* / Е.М. Ветчинкина, И.В. Ширнина, С.Ю. Ширнин [и др.] // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. – 2012. – № 7. – С. 109–118.
13. Викторов А.П. Фитопрепараты: рациональный подход к медицинскому применению / Фітотерапія. Часопис. - 2011. - №3. - С. 3 - 12.
14. Громова О. Н. Совершенствование технологии культивирования штамма женьшеня, разработка капель для приема внутрь и буккальных пленок на его основе [Текст] : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук : 14.04.01 / О. Н. Громова. - СПб., 2011. - 20 с.
15. Григорьев Р. О. Обнаружение тритерпеновых гликозидов в культуре клеток женьшеня вьетнамского / Р. О. Григорьев, А. Г. Ключин, Д. В. Кочкин и др. // Сборник материалов III научно-практической конференции с международным участием и Научной школы по клеточной биотехнологии Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере, 4 - 8 июня 2018 г. – Издательский дом СВФУ Якутск, 2018. – С. 44–46.
16. Гуля Н.И. Основные этапы клонального микроразмножения в условиях *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов растений / Н.И. Гуля, Е.В. Маслова, И.В. Петрова // Биология – наука XXI века: 20-я Международная школа-конференция молодых ученых (18-22 апреля 2016 г., Пущино). – Пущино: ООО «Буки Веди», 2016. – С. 221.

17. Гумерова Е.А. Получение каллусных культур *Glaucium flavum* Crantz (Papaveraceae) / Е.А. Гумерова, А.В. Плотникова, К.Р. Шкильменская [и др.] // Биотехнология и общество в XXI веке. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 26–31.
18. Демидова, Е. В. Влияние состава питательных сред на ростовые характеристики и содержание тритерпеновых гликозидов суспензионной культуры клеток женьшеня японского (*Panax japonicus* var. *repens*) / Е. В. Демидова, О. В. Решетняк, А. М. Носов // Биотехнология. - 2006. - № 2. - С. 32-39.
19. Дендрофлора України. Дикорослі й культивовані дерева і кущі. Покритонасінні. Ч. 2. Довідник / М.А. Кохно, Н.М. Трофименко, Л.І. Пархоменко [та ін.] / за ред. М.А. Кохна, Н.М. Трофименко. – Київ : «Фітосоціоцентр», 2005. – 716 с.
20. Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні. – Київ: «Алефа», 2007. – 232 с.
21. Дячок В.В. Математична модель процесу екстрагування із рослинної сировини / В.В. Дячок // Хімічна промисловість України. - 2001. - №4. - С.52-55.
22. Егорова Н.А. Микроразмножение эфиромасличных растений с использованием культуры изолированных тканей и органов *in vitro* / Н.А. Егорова, А.Г. Кривохатко, И.В. Ставцева [и др.] // Таврійський вісник аграрної науки. – 2013. – № 1. – С. 9–14.
23. Калашникова Е.А. Биологические основы клеточной селекции растений // Докл. ТСХА. – 2003. – № 275. – С. 110–112.
24. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. // К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
25. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 724 с.

26. Куркин В. А. Определение сапонинов в сиропе женьшеня / В. А. Куркин, А. С. Акушская // Химико-фармацевтический журнал. - 2014. - Т. 48, № 4. - С. 35-37.
27. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве. Курст лекций для аспирантов по направлению подготовки 35.06.01 Сельское хозяйство / В.Н. Дышко. – Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. – 69 с.
28. Коляновська Л.М., Бандура В.М. Аналіз сучасних методів та факторів, що впливають на процес екстрагування / Збірник наук. Праць ВНАУ. - №2 (85). - 2014. - С. 130-135.
29. Костюк Р.В. Розвиток інноваційної діяльності біотехнологічних підприємств у сучасних умовах // Актуальні проблеми економіки. - 2009. - №8 (98). - С. 79-84.
30. Кочкин Д.В. Обнаружение в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus* Var. *Repens* редкого тритерпенового гликозида женьшеня – гинзенозида малонил-RG1 / Д.В. Кочкин, Б.А. Галишев, Е.С. Глаголева [и др.]. // Физиология растений. – 2017. – Т. 64, № 5. – С. 337–345.
31. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ: учеб. пособие: в 2 ч. / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2013. – Ч. 2. – 192 с.
32. Кривохатко А.Г. Биотехнологические приемы регенерации растений в культуре тканей и органов и клонального микроразмножения полыни эстрагон (*Artemisia dracunculoides* L.): дисс. ... канд. биол. наук (03.00.20 «биотехнология») / А.Г. Кривохатко. – Симферополь, 2014. – 181 с.
33. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – Київ: Наукова думка, 2005. – 272 с.
34. Лаевская Н.И. Изучение влияния режимов сушки на показатели качества биомассы клеточной культуры женьшеня / Н. И. Лаевская, Ю. С. Селютина, И. Е. Каухова, Н. С. Пивоварова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 3. – С. 62–64.

35. Остроженкова Е. Г. Влияние состава питательной среды на рост селективных штаммов *Panax ginseng* С. А. Меу. и *P. quinquefolius* L. и содержание в них суммарной гликозидной фракции [Текст] / Е. Г. Остроженкова; Санкт-Петербургская гос. химико-фармац. акад. // Растительные ресурсы. - 2011. - Т. 37, № 4. - С.108-113.
36. Плаксина Т.В. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений / Т.В. Плаксина, Г.Н. Пищева // Бюллетень ботанического сада-института ДВО РАН. – 2014. – Вып. 12. – С. 22–30.
37. Пат. 1G33SUA, 5МПК С12№5/00, С12№5/02. Живильне середовище для одержання і вирощування калусних тканин рослин / В. А. Кунах, Л. К. Алпатова, Л. П. Мо-жилевська. – Заявл. 19.03.1993; Опубл. 25.12.1996, Бюл. № 4.
38. Расторгуев С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений: монография/ С.Л. Расторгуев. - Мичуринск: Изд-во Мичуринского ГАУ, 2009. - 170 с.
39. Решетников В.Н. Биотехнология растений и перспективы ее развития / В. Н. Решетников, Е. В. Спиридович, А. М. Носов // Физиология растений и генетика. — 2014. — Т. 46, № 1. — С. 3—18.
40. Соболюкова Г. И. Получение каллусов женьшеня вьетнамского *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., синтезирующих тритерпеновые гликозиды/ Г. И. Соболюкова, Д. В. Кочкин, М. В. Титова и др. // Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова. – 2018. – Т. 65, № 3. – С. 39–49.
41. Самылина И.А. Женьшень (*Panax ginseng* С.А. Меу) / И.А. Самылина, А.А. Сорокина, Н.В. Пятигорская // Фарматека. – 2010. - № 16. – С. 93-95.
42. Сметаніна. К.І. Рослинні ліки. Проблеми розробки лікарських засобів рослинного походження / Фарм. Часопис. - 2011. - №2. - С. 95-98.
43. Суханова Е. С., Черняк Н. Д., Носов А. М. Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток *polyscias filicifolia* и *polyscias fruticosa* // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 44–50.

44. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / В.М. Ковальов, О.І. Павлій, Т.І. Ісакова. – Харків: Прапор, вид-во НФАУ, 2000. – 704 с.
45. Физиологические характеристики суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* при масштабировании процесса выращивания [Текст] / М. В. Титова [и др.] // Биотехнология. - 2015. - № 3. - С. 71-80.
46. Широков А.И. Основы биотехнологии растений: электронное учебно-методическое пособие / А.И. Широков, Л.А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.
47. Шнытко М.В. Инновационные разработки в области выращивания женьшеня в условиях Среднего Поволжья / М.В. Шнытко, Л.А. Клейн // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты». – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2011. – С. 154.
48. Якимова О.В. Индукция каллусогенеза в культуре изолированных органов *Origanum vulgare* L. / О.В. Якимова, Н.А. Егорова // Масличные культуры. – 2014. – Вып. 2. – С. 159–160.
49. Якимова О.В. Исследование влияния некоторых факторов на каллусообразование у Melissa (*Melissa officinalis* L.) в культуре *in vitro* / О.В. Якимова, Н.А. Егорова // Вестник удмуртского университета: Биология. Науки о земле. – 2014. – Вып. 4. – С. 39–45.
50. Choi, K.T. Botanical characteristics, pharmacologic al effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C. A. Meyer/ K.T. Choi // *Acta Pharmacol Sin.* - V. 29. - 2008. - P. 1109-1118.
51. Iola-Boldura O.M. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) / O.M. Iola-Boldura, F. Radu, S. Popescu [et al.] // *Bull. UASVM Hort.* – 2010. – Vol. 67, No. 1. – Pp. 308–313.
52. Lee S.Y. Chemical constituents and biological activities of the berry of *Panax ginseng* / S.Y. Lee, Y.K. Kim, N. Park., Ch. S. Kim, Ch.Y. Lee, S.U. Park // *Journal of medical plants research.* – 2010. – No. 4. – P. 349-353.

53. Leelavathi D. Callus induction and regeneration of multiple shoot from in vitro apical bud explant of *Origanum vulgare* an important medicinal plant / D. Leelavathi, N. Kuppan // International journal of research in pharmacy and chemistry. – 2013. – Vol. 3 (4). – Pp. 898–903.
54. Shin B.K., Kwon S.W., Park J.H. 2015. Chemical diversity of ginseng saponins from *Panax ginseng*. *J. Ginseng Res.* 39(4): 287-298.

ДОДАТКИ

Додаток А

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

T-2	Холодильник	1	Тип: труба в трубі, Площа теплообміну 20 м ²	Діаметр кожуха 700. Довжина труб 9000.
P-2	Реактор-змішувач для приготування нестерильного ПС I	1	Об'єм 50 м ³ Споряджений перемішу вальним пристроєм	Внутрішній діаметр 3200 Габаритна висота 6220
Лінія УНС-20				
H-2	Насос	1	Тип : відцентровий ЗК-6	
T-1	Рекуператор	1	Тип: пластинчатий теплообмінник, 100 м ²	2935×730×1770
Hг	Нагрівач	1	Ємність нагрівача 0,1 м ³	
B-1,2,3	Витримувачі	3	Тип: ємність. Об'єм – 5,1 м ³	Діаметр 600. Висота 6000.
T-2	Холодильник	1	Тип: пластинчатий теплообмінник, 40 м ²	1795×730×1770
9	Ферментер	1	Об'єм – 80 м ³ . Ферментер з пневматичним перемішуванням (з аерліфтом). Коефіцієнт масопередачі за киснем досягає 1,5 – 3 кг О ₂ /(м ³ ·год). Корпус ферментера споряджений оболонкою. Матеріал апарата – сталь Х18Н10Т, оболонка Ст.3.	Внутрішній діаметр 3200. Габаритна висота 8890.
H-3	Насос	1	Тип: відцентровий Марка: Х 8/18 Продуктивність: 8 м ³ /год	
PЗ-3	Реактор-змішувач для приготування нестерильного ПС II	1	Об'єм 0,063 м ³ Споряджений перемішу вальним пристроєм	Внутрішній діаметр 400 Габаритна висота 500
H-4,5	Насос	2	Тип: одноплунжепний	

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

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