

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ТАКСИФОЛІНУ ІЗ
КУЛЬТУРИ ТКАНИН МОДРИНИ ОЛЬГІНСЬКОЇ»

Виконав : здобувачка вищої освіти групи 162БТ621(3,10д)-01
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія

Кристіна ПОДРІЗ

Керівник: Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології,
к.фарм.н, доцент Антоніна СІЧКАР

Рецензент: Провідний науковий співробітник лабораторії
імунітету, біотехнології та якості Інституту рослинництва імені
В.Я. Юр'єва НААН України, к.біол.н., с.н.с. Олена БІЛИНСЬКА

АНОТАЦІЯ

Робота присвячена організації виробництва таксифоліну із культури тканин модрина ольгінської. В роботі проаналізовано дані літератури про процеси виробництва, обрано раціональну технологію, основні технологічні параметри та розглянуто екологічні аспекти. Розроблено рекомендації щодо способу одержання експлантату з модрина ольгінської, наведено промислову технологію з використанням сучасного обладнання, проведено необхідні технологічні розрахунки. Робота містить 3 розділи, 9 рисунків, 3 таблиці, 30 джерел літератури.

Ключові слова: модрина ольгінська, таксифолін, культура тканин рослин, експлантат, технологія

ANNOTATION

The work is devoted to the organization of taxifolin production from *Larix olgensis* tissue culture. It has been analyzed in the work the literature data on production processes, selected the rational technology, basic technological parameters and considered environmental aspects. Recommendations are developed on the method of obtaining an explant from *Larix olgensis*, industrial technology using modern equipment is presented, and the necessary technological calculations are carried out. The work contains 3 sections, 9 figures, 3 tables, 30 sources of literature.

Keywords: *Larix olgensis*, taxifolin, plant tissue culture, explant, technology

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	6
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	14
2.1 Характеристика готового продукту.....	14
2.2 Характеристика сировини.....	17
2.3 Характеристика біологічних об'єктів.....	21
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	25
3 Технологічна частина.....	31
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	31
3.2 Розрахунок і вибір обладнання	34
3.3 Опис технологічного процесу.....	37
3.4 Схеми виробництва.....	44
3.5 Контроль виробництва.....	48
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	49
Висновок.....	50
Список використаної літератури.....	52
Додатки.....	56

					162.01.06.00 000 ПЗ			
Змн..	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Подріз К.А.				Організація виробництва таксифоліну із культури тканин модрини ольгінської Пояснювальна записка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Січкара А.А.						2	50
.						НФаУ Кафедра біотехнології		
Н. контр.								
Затвердив	Хохленкова Н.В.							

ВСТУП

Актуальність теми. Однією із задач біотехнології є одержання діючих речовин або активних фармацевтичних інгредієнтів лікарських засобів із культури тканин рослин. Застосування з цією метою культур рослинних клітин та тканин має переваги у порівнянні з використанням плантаційної та дикорослої сировини, а саме можливість цілорічного вирощування біомаси, незалежність від кліматичних та географічних факторів, більш висока якість та стандартність сировини [23].

Таксифолін (інша назва дигідрокверцетин або дигідрофлавонол) є важливим природним активним фармацевтичним інгредієнтом, який, можуть виділяти на підприємстві з кореня модрини ольгінської. З огляду на структуру таксифоліну, який містить серед функціональних груп більше фенольних гідроксильних груп, речовина рослинного походження має різноманітну біологічну активність, у тому числі протизапальну, антипроліферативну, антиоксидантну та антианафілактичну. Через різноманітну дію таксифолін має високий потенціал у використанні, як складова дієтичних добавок, продуктів здорового харчування та лікарських засобів [22].

Нині випускаються дієтичні добавки, спортивні добавки та лікарські засоби, що містять таксифолін (дигідрокверцетин), як за кордоном, так і в нашій країні.

Мета роботи. Розробити технічні заходи для організації виробництва таксифоліну із культури тканин модрини ольгінської з урахуванням сучасних технологічних вимог і потреб фармацевтичної і харчової промисловості.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Провести аналіз технологічних способів виробництва таксифоліну.
2. Провести аналіз і підсумувати дані сучасної спеціальної літератури

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		3

про методи одержання культури тканин рослин *in vitro* з точки зору можливості їх використання як сировини для одержання цільового продукту — вторинного метаболіту рослин — таксифоліну.

3. Обґрунтувати вибір раціональних умов та параметрів для технології культивування рослинної суспензійної культури модрини ольгінської з подальшим одержанням таксифоліну.

4. Обґрунтувати склад оптимального поживного середовища для високої продуктивності рослинної суспензійної культури модрини ольгінської.

5. Обґрунтувати вибір та розрахувати параметри біореактора для технологічного процесу одержання таксифоліну.

6. Розробити схеми виробництва таксифоліну з суспензійної культури модрини ольгінської, визначити критичні технологічні параметри і розрахувати матеріальний баланс процесу.

7. Оцінити екологічні аспекти виробництва таксифоліну з суспензійної культури модрини ольгінської.

Об'єктом роботи є таксифолін, одержаний із суспензійної культури тканин модрини ольгінської.

Предметом роботи є технологічний процес виробництва таксифоліну.

Методи. Класичні методи аналізу, проведення синтезу, порівняння, абстрагування, узагальнення та використання графічних методів для креслень обладнання і схем.

Практичне значення отриманих результатів. Результати роботи дозволяють організувати цех з виробництва таксифоліну, із суспензійної культури тканин модрини ольгінської на фармацевтичному підприємстві, а саме на базі практики ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»» для задоволення потреб фармацевтичної галузі через великий попит на таксифолін.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						4
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

За темою роботи опубліковано тези:

Подріз К. А., Січкара А. А., Криклива І. О. Дослідження щодо вдосконалення виробництва таксифоліну із культури тканин модрини ольгінської. *Фармацевтичні технології, стандартизація та забезпечення якості лікарських засобів* : матеріали II Науково-практичної Internet-конференції з міжнар. участю 22 травня 2025 року. Харків : НФаУ, 2025. С. 197–198.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						5
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Загальна характеристика таксифоліну і галузей його застосування

Речовина таксифолін була вперше видобута з кори псевдотсуги Мензіса (або Дугласії тисолистої) — вічнозеленої хвойної рослини — японськими вченими за допомогою екстракції гарячою водою. За останні роки таксифолін також був виявлений у деяких фруктах, але його вміст в них виявився надзвичайно низьким. Оскільки все більше країн в усьому світі дозволяють таксифоліну входити до переліку дозволених до використання речовин у фармацевтичній і харчовій промисловості, попит на таксифолін також зростає, в той час як його виробництво далеке від задоволення потреб ринку. Тому дослідження щодо вдосконалення виробництва речовини мають важливе практичне значення. Фактично, за традиційним методом виробництва таксифолін одержують з модрина, що є сировиною, шляхом екстрагування гарячою водою або ультразвукового екстрагування. Наведені методи не тільки мають низьку ефективність екстрагування, при їх задіянні також споживається велика кількість модринової сировини. Цей факт є дуже несприятливим для навколишнього середовища, адже модрина є важливою деревною породою для послаблення наслідків зміни клімату, покращенні якості повітря, створюючи в містах більш здорове середовище для життя. Тому дуже важливо досліджувати ефективне використання лісових ресурсів і вивчати нові альтернативи цим ресурсам і методи виробництва біологічно активних речовин [1, 2, 22].

Значення біологічних властивостей таксифоліну (дигідрокверцетину) у сучасній практичній фармації велике, оскільки таксифолін гальмує процеси перекисного окиснення ліпідів клітинних мембран, попереджає шкідливий

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

вплив вільних радикалів, передчасне старіння клітин і розвиток багатьох захворювань, сприятливо впливає на шкірні покриви, нормалізує синтез колагену та еластину в шкірі, рівень тригліцеридів і холестерину в крові, гальмує дію гіалуронідази, має потужну протизапальну та протиалергенну активність, впливає на регуляторні механізми імунної системи організму людини, покращує еластичність еритроцитів, знижує в'язкість крові, покращує мікроциркуляцію і кровообіг на рівні капілярів, і навіть за деякими публікаціями виявлено його антидепресивну та антипаркінсонічну активність. Зважаючи на такий широкий перелік біологічних властивостей, таксифолін використовують при лікуванні захворювань шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної системи, ендокринної системи, органів дихання, захворюваннях органів зору тощо. Таксифолін має низьку токсичність, що робить доступним його споживання в достатньо великих дозах, активність проявляється при концентрації приблизно $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ % при повній відсутності мутагенної активності для людини [2, 9].

Таксифолін (5,7,3',4'-флаван-он-ол) належить до підкласу флаванолів флавоноїдів, які, у свою чергу, є класом поліфенолів. Структурна формула таксифоліну приведена на рис. 1.2.

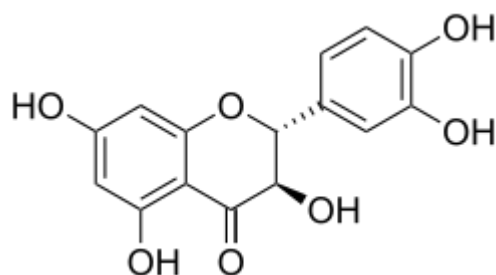


Рис. 1.2 – Структурна формула таксифоліну

Таксифолін має два стереоцентри на С-кільці, на відміну від кверцетину, який не має жодного. Наприклад, (+)-таксифолін має (2R,3R)-конфігурацію, що робить його 1 із 4 стереоізомерів, які містять 2 пари енантіомерів [3, 29].

1.2 Особливості процесу екстракції флавоноїдів з калусної біомаси

Сьогодні для одержання лікувальних та профілактичних засобів застосовують більше 3000 видів рослин, з них приблизно 100 культивують. Попит на сировину на основі лікарських рослин швидко зростає, і за оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) може збільшитися більш як на 5 трильйонів доларів США в 2050 році. Українські степи і ліси багаті на рослинну сировину, з якої одержують лікарські препарати і дієтичні добавки завдяки наявності біологічно активних речовин. Але постійне використання лікарських рослин і зневажливе ставлення до довкілля приводить до знищення рослинної флори. Слід зауважити, що багато рослин занесене до розрядів рідкісних, зникаючих, вразливих. Також негативним фактором є вплив на якість сировини різних екологічних чинників. Сучасний стан довкілля в нашій країні не дозволяє використовувати багато рослин як лікарську сировину. Тому неодноразово в програмах зі збереження рослинних ресурсів наголошується на значенні методів культури *in vitro* та переваги цих методів порівняно з традиційними. Описано введення деяких рослин в культуру *in vitro* та дослідження фітохімічного складу їх калусної біомаси та їх біологічної активності. Для отримання максимальної кількості біологічно активних речовин важливим є підбір параметрів процесу екстракції з калусної біомаси, які мають бути обґрунтованими: вибір розчинника, кратність і тривалість процесу екстракції, величина гідромодуля, температурний режим тощо. Тому підбір певних умов культивування, проведення екстракції біомаси лікарських рослин є актуальним.

Сучасний метод культури клітин, тканин та органів дозволяє вирішити декілька питань щодо якості сировини. Перевагою методу є те, що завдяки

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						8
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

йому отримують велику кількість біомаси, незважаючи на умови навколишнього середовища, пору року та інші фактори.

Доведено, що найкращим методом вилучення біологічно активних речовин, зокрема флавоноїдів, з рослинної сировини є екстракція. Для калусної біомаси також використовують метод екстракції для вилучення флавоноїдів. На процес екстракції впливають багаточисленні технологічні фактори, однак дані щодо їх впливу на екстракцію флавоноїдів з калусної біомаси в науковій літературі ще дуже обмежені, несистематизовані та неоднозначні.

Так, наприклад, Костик Х. В. зі співав. калусну біомасу було одержано біотехнологічним методом культивування *in vitro* з насіння арніки гірської. Використовували середовище Мурасиге-Скуга для проростання насіння та середовище Мурасиге-Скуга з фітогормонами для одержання калусної біомаси. Отримано калусну біомасу при рН 5,5–5,8 з додаванням ауксинів та цитокінінів. Із ауксинів для підтримання культури тканин використано β -індолілоцтову кислоту у концентрації 2,0 мг/л та α -нафтилоцтову кислоту у концентрації 0,1 мг/л. Також до середовища додавали кінетик (0,5 мг/л), який не тільки активізував клітинні поділи, але й прискорював ріст калусних культур. Проводили культивування за температури 23 °С, освітлення 2000 лк та 16-годинного фотоперіода. Через 50 діб отримували калусну біомасу з подальшим проведенням екстракції. Для вивчення залежності вмісту флавоноїдів і повноти екстракції вченими з сировини було отримано етанольні екстракти за різних значень певних факторів, таких як концентрація екстрагента, співвідношення сировина : екстрагент та спосіб екстракції. Використовували як екстрагент етанол різної концентрації: 20 %, 40 %, 70 % і 96 %. Співвідношення сировина : екстрагент склала 1:10, 1:20 і 1:40. Водно-етанольні екстракти з флавоноїдами отримували на апараті з мішалкою та на апараті Сокслета методом настоювання. Далі одержані екстракти було піддано фільтруванню через паперовий фільтр в мірну колбу.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

Вченими у кожній серії дослідів змінювалися значення тільки одного з факторів при незмінних значення інших факторів [10–15].

Для порівняльного якісного визначення флавоноїдів як у траві, так і в калусній біомасі проводять кольорові реакції. Для кількісного визначення флавоноїдів у сировині використовують метод спектрофотометрії, що ґрунтується на здатності флавоноїдів формувати зафарбовані хелатні комплекси зі спиртовим розчином алюміній хлориду у середовищі розведеної хлороводневої кислоти. Якщо максимум поглинання спиртових розчинів близький до специфічних спектральних характеристик певного флавона в межах 408–420 нм, то кількісний вміст суми флавоноїдів визначають в перерахунку на рутин. З метою визначення вмісту суми флавоноїдів використовують питомий показник поглинання комплексу розчину стандартного зразка рутину з алюміній хлоридом, який за даними літератури становить 191. Якщо максимум поглинання лежить в області 421–435 нм, то це є характерним до спектральних характеристик флавона – кверцетину. У таких випадках використовують інший показник поглинання комплексу розчину кверцетину, стандартного зразка кверцетину з хлоридом алюмінію, що дорівнює за даними літератури 778.

Для калусної біомаси з трави та насіння арніки гірської кращим екстрагентом виявився 70 % етанол: з калусної біомаси вилучалося 5,62 % флавоноїдів, що було на рівні вилучення флавоноїдів з рослинної сировини — 6,12 %. Зміна концентрації етанолу, як підвищення до 96 %, так і зниження до 40 % і 20 %, призводило до зниження кількості вилучених флавоноїдів відповідно на 3,46 %, 5,14 %, 2,56 %. Кращим способом екстракції виявилася екстракція з використанням етанолу на апараті Сокслета. Кращим співвідношенням сировина : екстрагент, за якого вилучалася максимальна кількість флавоноїдів, виявилось 1:20. Зменшення

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

кількості сировини в даному співвідношенні (1:40) і збільшення кількості сировини (1:10) призводило до зменшення виходу флавоноїдів.

Подібні умови і вихід біологічно активних речовин з калусної біомаси спостерігалися і в інших дослідженнях [14, 24–28].

1.3 Загальна характеристика ринку виробництва таксифоліну

В Україні випускаються різні дієтичні добавки з таксифоліном: таблетки для розсмоктування по 50 мг № 20 «Дигідрокверцетин» (виробник ТОВ «БіоФлавід»), таблетки для розсмоктування з ДГК і вітаміном С (ТОВ «БіоФлавід»), краплі під язик ДГК "Р", дигідрокверцетин, 3000мг, 15мл (ТОВ «БіоФлавід»), рідка форма з пропіленгліколем як розчинником «ДГК "Р"» (ТОВ «Taxifolia»), гліцериновий розчин по 15 мл у флаконах «Дигідрокверцетин-G Taxifolia» (ТОВ «Taxifolia»), капсули «Дигідрокверцетин кардіо», 20 капсул по 50 мг у пачці (ТОВ «Taxifolia»). Капсули містять комплекс з дигідрокверцетину, коензиму Q10 та екстракту шоломника байкальського для здоров'я серця, судин та нормалізації АТ. ТОВ «Таксифолія» — виробник високочистого дигідрокверцетину з природних джерел (модрини сибірської та даурської). Компанія «Біофарм» виробляє капсули «Дигідрокверцетин», 60 капсул по 50 мг, ТОВ «Еліт-фарм» пропонує таблетки «Капіляр» з таксифоліном, по 40 таблеток в пачці.

На ринку України представлені також дієтична добавка «Dihydro-Kwercetyna, Taxifolin», 60 капсул, марки «Kenau» (Польща), спортивна дієтична добавка «Таксифолін» (GymBeam, Німеччина) закордонних виробників.

Таксифолін пропонується компанією ТОВ «БіоФлавід» для харчової промисловості у вигляді порошку або рідини як унікальний природний біофлавоноїд з деревини модрини, що допомагає продовжити термін

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						11
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

придатності продуктів, зберігає якість та робить їх кориснішими для здоров'я. Відмічається, що ефективність підтверджена багаторічними дослідженнями та успішним впровадженням у виробництво багатьох країн світу [1, 4–7].

1.4 Методи виробництва таксифоліну в світі

У світі субстанцію таксифоліну одержують з деревини модрина сибірської (*Latix Sibirica Ledeb*) або даурської (*L. dahurica Turcz.*) з різним ступенем очищення: від 93,0 до 97,5 % [5].

Незважаючи на наявність великої кількості патентів щодо одержання субстанції таксифоліну, до недавнього часу не було прийнятної технології одержання сполуки з високим ступенем очищення. Методи переосадження з розчинників призводили до аморфного продукту, при чому були наявні залишкові кількості речовин (смолоподні домішки), що не піддавалися ідентифікації. Такі домішки в значній мірі обумовлює невелику розчинність таксифоліну, також і в гарячій воді. В ході вивчення джерел літератури було з'ясовано, що ступінь очищення субстанції таксифоліну впливає і на її антиоксидантну активність. Тоді українське підприємство ТОВ «TAXIFOLIA» впровадила новітню технологію очищення субстанції таксифолін з виходом продукту за основною речовиною 97,0 – 98,0 %, з вмістом води не більше 5 %. Така субстанція вже може бути використаною для парентерального препарату на основі таксифоліну [4, 5].

Таксифолін, як і багато інших флавоноїдів, являє собою слабку органічну кислоту, оскільки до його структури входить декілька гідроксильних груп, здатних дисоціювати. Дисоціювати може декілька гідроксильних груп, кожна з них характеризується «мікроскопічною» константою дисоціації. Віднести кожен з таких «мікроскопічних» констант

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

до дисоціації певної гідроксильної групи речовини складно. Однак, вченими за допомогою спектрів ЯМР ^{13}C було доведено, що ступінь дисоціації гідроксильних груп зростає в послідовності 5-ОН < 4'-ОН < 7-ОН. Тому відомо, що таксифолін здатний утворювати солі з основами, як з органічними, так і неорганічними (тобто з катіонами металів).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						13
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Таксифолін (3,5,7,3,4-пентагідрокси флаванон або 3,5,7,3',4' — пентаоксифлаванол або дигідрокверцетин) є флавоноїдом, який міститься, окрім модрина ольгінської, в корі французької морської сосни (*Pinus pinaster*), цибулі (*Allium L.*), корі ялиці Дугласа або Дугласії тисолистої (*P. menziesii*), неклейкому рисі (*Oryza sativa ssp. indica*), відвареному з бобами адзуки (адзуки-меші) або квасолі кутастої (*Vigna angularis*), у кедрі гімалайському (*Cedrus deodarama*), в китайському тисі (*Taxus chinensis var. mairei*) та в екстракті силімарин, що є природною композицією біологічно активних речовин з насіння розторопші плямистої (*Silybum marianum*).

Таксифолін знайдено в продуктах рослинного походження, таких як фрукти, овочі, вино, чай і какао.

Субстанція таксифолін не описана в ДФУ і в інших закордонних фармакопях. Ступінь очищення субстанції, вміст сторонніх домішок, має важливу роль в застосуванні препарату, що необхідно враховувати при розробці технології одержання сполуки. Найбільше чистота речовини впливає на антиоксидантну активність [5].

Таксифолін (дигідрокверцетин)

Кількісний вміст: 98–102 % (у перерахунку на суху речовину)

Зовнішній вигляд: світло-сірий, світло-жовтий або жовтий дрібний порошок (рис. 2.1)

Проходить крізь сітку: 80 меш

Номер CAS:480-18-2

Сертифікати: ISO, KOSHER, Halal

Пакування: 25 кг/барабан або 1 кг/пакет.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						14
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рис. 2.1 – Зовнішній вигляд порошку таксифоліну

Таксифолін — це тверда кристалічна речовина з температурою плавлення від 240–240,5 °С. Молекулярна формула речовини $C_{15}H_{12}O_7$, молекулярна маса становить 304,25 г/моль. Ця сполука демонструє добру розчинність в етанолі 96 %, киплячій воді, оцтовій кислоті та етилацетаті, у той час як вона дуже мало розчинна в холодній воді та практично нерозчинна в бензені.

Хоча таксифолін має низьку розчинність у воді, але при підвищеній температурі вона збільшується. Так, якщо за температури 20 ° С розчинність становить 0,1 %, то вже при 40°C — 0,3 %, далі за температури 60 °С — 1,0 % і при 90°C відбувається розчинення від 3 до 5,3 % речовини. Помічено, що з ростом ступеня очищення таксифоліну розчинність його у воді зростає приблизно в три рази. У водно-спиртових розчинах таксифолін добре розчиняється, при чому із зростанням концентрації етанолу від 30 до 90 % розчинність речовини зростає від 0,3 % до 18 %. Проте розчини є нестабільними тривалий час.

У неполярних розчинниках, таких як гексан, хлороформ таксифолін не розчиняється.

Ідентифікація таксифоліну проводиться за ІК-спектром, який повинен відповідати ІК-спектру стандартного зразка таксифоліну. Також УФ спектр та спектр у видимому діапазоні поглинання розчину субстанції в області від 225 нм до 400 нм має максимуми поглинання при 291 ± 2 нм і мінімум при 251 ± 2 нм.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

Втрата в масі при висушуванні повинна бути не більше 5 %.

Етанольний розчин 5 % має бути прозорим.

Питоме оптичне обертання становить від + 18,20 ° до + 18,40 ° в перерахунку на суху речовину.

Із залишкових органічних розчинників в субстанції може бути етанол в кількості не більше 2,0 %.

Важкі метали визначаються в кількості не більше 0,001%.

Кількість сульфатної золи в субстанції — не більше 0,1%.

При визначенні сторонніх домішок кожної окремої домішки в субстанції має бути не більше 4,0 % при загальній сума домішок — не більше 5,0 %.

Також для активних фармацевтичних інгредієнтів важливим є показник — мікробіологічна чистота, при чому при визначенні цього показника загальне число аеробних бактерій (ТАМС) має бути не більше 10^3 КУО/г ; загальне число дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) не більше 10^2 КУО/г.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						16
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.2 Характеристика сировини

Модрина (*Larix*) — рід дерев родини соснових (Pinaceae). Більшість дерев роду зазвичай є високими, зростають в лісах і в основному використовуються в будівництві, декорації, виробництві паперу та інших галузях промисловості. В останні роки з постійним поглибленням досліджень деякі породи дерев використовують для добування смоли, переробки скипидару, добування природних активних речовин та іншої хімічної або фармацевтичної сировини.

Однак через тривалий цикл росту модрини селекція нових сортів займає тривалий час, і ефект є повільним, важко покращити ознаки нащадків, а період накопичення природних активних речовин тривалий, що обмежує діапазон застосування модрини. З розвитком науки і техніки отримання вторинних лікарських метаболітів стало новим напрямком у сучасних дослідженнях біотехнології рослин через технологію культури тканин. Тому дуже важливою є наукова робота з генетичного вдосконалення видів модрини, підготовка активних інгредієнтів та дослідження шляхів біосинтезу вторинних метаболітів шляхом створення ефективної та стабільної системи культури тканин для видів модрини.

У нашій країні зростає кілька рідкісних видів модрини, серед яких, далекосхідна модрина ольгінська (*Larix gmelinii* var. *olgensis*). У природі рідкісний вид. Дерево до 25–30 м висотою і 70–80 (до 150) см в діаметрі, рідко прямоствольне. Кора стовбура темно-сіро-бура, у старих дерев сильна. Молоді пагони світло-коричневі або бежево-рожеві, густо опушені рудими волосками. Хвоїнки довгі, до 35–40 мм довжиною, 0,5–1 мм шириною, знизу сизі, зверху зелені (рис. 2.2). Дерево невибагливе до вологості ґрунту, світлолюбиве та вітростійке. Дорослі дерева формують товсту кору (до 20 см

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						17
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

товщиною), яка оберігає їх від пожеж та дозволяє рости в зоні більш високої теплозабезпеченості [20, 22].



Рис. 2.2 – Модрина ольгінська

Вченими досліджувався матеріал модрини ольгінської (*Larix olgensis*) [22]. Матеріали ретельно промивали під проточною водою з-під крана протягом 15 хвилин, потім стерилізованим скальпелем зрізали пагони (0,5–1 см) та замочували їх у 70% (об./об.) етанолі протягом 5 хвилин, а потім молоді пагони промивали стерильною дистильованою водою протягом 2 хвилин. Після цього ці експлантати стерилізували в ламінарній проточній шафі, використовуючи 6 % розчин гіпохлориту натрію NaClO протягом 40 хвилин. Нарешті, промивали стерильною дистильованою водою тричі по 30 секунд кожен раз.

При одержанні експлантатів робочий стіл заздалегідь простерилізовують протягом 40 хвилин. Протирають пластину, скальпель та пінцет ватою, що містить 75 % етанолу, а потім стерилізують їх на спиртовому пальнику для подальшого використання. Асептичні пагони модрини були відібрані як експлантати для культивування калусу, а умови культивування були такими: середовище Мурасиге-Скуга (МС), яке використовується для росту експлантатів. При використанні середовища з різними концентраціями та комбінацією 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти, 6-бензиламіноаденіну, нафталіноцтової кислоти та агоніста-модулятора кінетину, і доведення

значення рН до $5,8 \pm 0,1$. Час освітлення становить 12 годин на день, і реєструються характеристики індукції калусу, такі як швидкість утворення калусу, маса свіжого та сухого калусу після 50 днів культивування в інкубаторі з постійною температурою $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Крім того, кожні два тижні проводять перевірку морфології калусу за допомогою світлового мікроскопа.

Для гістологічного дослідження відбирають калусні культури з хорошим ростом та різним рівнем індукції та фіксують 2,5% глутаральдегідом протягом 24 годин при кімнатній температурі. Після фіксації зразки промивають 3-4 рази 0,1М фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 7,2), а зразки тканин зневоднювали відповідно до етанольного ряду (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95%) протягом 15 хвилин, а потім поміщали в абсолютний етанол на ніч. Після цього зразки тканин поміщали до ізоамілацетату на 30 хвилин та сушили в сушарці за постійної температури протягом 60 хвилин.

Рівномірно зростаючий калус відбирали та розділяли на три групи, по 10 колб у кожній групі, та інокулювали у тверде середовище МС + 6-бензиламіноаденину 1,0 мг/л + 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти 2,0 мг/л + КТ 0,1 мг/л. Калус культивували в інкубаторі з постійною температурою та трьома умовами освітлення: 24 години/день повного освітлення, 12 годин/день світлового освітлення та 24 години/день повної темряви. Освітлення 3000 лк, а температура культури $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, а потім через 50 днів підраховували швидкість індукції калюсу.

Свіжий калус піддавали ліофілізації за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ та тиску 0.0001 МПа протягом 24 годин. Висушений калус подрібнювали на порошок у ступці та просівали через 40 меш. Кожен зразок точно зважували з точністю до 0,2 г, а таксифолін екстрагували, додаючи 30 мл метанолу та використовуючи ультразвук 90 Гц протягом 30 хвилин. Після цього екстракт фільтрували, фільтрат випаровували насухо, розчиняли в метанолі та доводили до 10 мл у волюметричній колбі. Оброблений розчин фільтрували

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

через мікропористу мембрану з розміром пор 0,22 мкм для ВЕРХ-детектора. Об'єм введеного зразка становив 20 мкл, а температуру колонки підтримували на рівні 30 °С. Бінарний елюент складався з А (метанолу) та В (води): 45%:55%, і використовувалася процедура градієнтного елюювання. Використовували колонку cosmosil 02485-81 C18 (250 мм × 4,6 мм / 5 мкм). Швидкість потоку підтримувалася на рівні 1 мл/хв. УФ-спектр таксифоліну був отриманий з довжиною хвилі детектування 290 нм.

У дослідженні [22] пагони модрини використані як експлантатне джерело індукції калусу, а система культивування калусу модрини була створена за допомогою технології культивування рослинних тканин. Ці дані показали, що середовище МС з гормонами 2,4-дихлорфеноксоцтовою кислотою, 6-бензиламіноаденином та агоністом-модулятором кінетином демонструє високий потенціал індукції калусу модрини, а швидкість індукції досягала 83,4%. Крім того, залежно від умов культивування, текстура та колір поверхні отриманого калусу також відрізняються, текстура змінюється від крихкої до твердої, а поверхня поступово переходить від жовтого рідкого калусу до коричневого калусу і, зрештою, до світло-коричневого калусу. Крім того, було також виявлено, що фотоперіод також мав великий вплив на утворення калусу, а світлове культивування тривалістю 12 годин/день було найбільш придатною світловою умовою для індукції калусу, а швидкість індукції була на 17,4% вищою, ніж за інших умов.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						20
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.3 Характеристика біологічних об'єктів

2.3.1 Характеристичний аналіз калусу

Дослідження вчених показали, що період індукції та ріст калусу модрина відрізнялися, що залежало від гормональної обробки, концентрації та регуляторів росту. Діапазон індукції калусу становить 50–80%, і це означає, що тип культури з регулятором росту (70–80%) легше утворює калус, а найвищий рівень індукції становить 83,4 %, що спостерігається при складі фітогормонів: МС + 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) 2 мг/л + 6-бензиламіноаденіну (6-БА) 1,0 мг/л + КТ 0,1 мг/л. Крім того, індукція калусу відбулася в середньому через $28,58 \pm 2,97$ – $51,07 \pm 3,49$ днів після інокуляції, а найшвидше утворення калусу відбулося приблизно через 28 днів при такому складі компонентів: МС+2,4-Д 0,1 мг/л + 6-БА 2,0 мг/л, що може бути пов'язано з впливом 6-БА на стимулювання органогенезу та ріст недиференційованих тканин. Крім того, свіжа та суха маса калусу модрина, утвореного в кожному варіанті обробки, відображала ріст калусу, і ріст калусу в кожному варіанті обробки був різним.

Найвища отримана вага калусу модрина в дослідженнях вчених у свіжому вигляді становила $3,30 \pm 0,23$ г, тоді як найвища суха маса становила $1,25 \pm 0,19$ г при складі компонентів: МС + 2,4-Д 2,0 мг/л + нафталіноцтова кислота (НОК) 1,0 мг/л, це вказує на те, що ауксин (як НОК, 2,4-Д) мав найбільший вплив на свіжу та суху масу калусу, що може бути пов'язано з безперервною проліферацією клітин тканин модрина, спричиненою ауксином, а відповідна концентрація ауксину сприяла його росту.

У дослідженні за допомогою оптичного мікроскопа вчені спостерігали характеристики утворення калусу з самого початку, і було помічено, що утворений модриною калус, мав невелику форму та був багатий на дрібні вакуолі, що було подібно до попередніх таких досліджень. Одночасно було помічено, що текстура поверхні калусу, утвореного в складі компонентів МС

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

+ 2,4Д 2 мг/л + 6-БА 1,0 мг/л і + КТ 0,1 мг/л, також в складі МС+ 6-БА 1,0 мг/л і + НОК 0,1 мг/л та МС+ 6-БА 2,0 мг/л і + КТ 0,1 мг/л з відносно високою швидкістю індукції, змінювалася з крихкої на тверду, а поверхня поступово переходила від жовтого рідкого калусу до коричневого, і, вже пізніше, до світло-коричневого калусу. Порівняльний аналіз показав, що зі збільшенням мітогену в комбінації 6-БА та 2,4-Д швидкість поділу калусу збільшувалася та кількість калусу також збільшувалася, а текстура калусу була пухкою та придатною в майбутньому для диференціації культури. У комбінації НОК та 6-БА, хоча коефіцієнт індукції досяг 78,5 %, проте на пізній стадії було значним потемніння, а тверда текстура не сприяла подальшому субкультивуванню.

Характеристики утворення калусу модрини спостерігали за допомогою оптичного мікроскопа (рис. 2.3). Для дослідження було обрано кілька комбінацій з вищими показниками індукції (МС + 2,4Д 2 мг/л + 6-БА 1,0 мг/л і + КТ 0,1 мг/л, також в складі МС+ 6-БА 1,0 мг/л і + НОК 0,1 мг/л та МС+ 6-БА 2,0 мг/л і + КТ 0,1 мг/л), і було виявлено, що калус, утворений у МС + 2,4Д 2 мг/л + 6-БА 1,0 мг/л і + КТ 0,1 мг/л, мав світло-жовтий колір, пухку текстуру та багато дрібних вакуолей, тому він був придатним для диференціації культури.

Враховуючи викладене вище, середовище з такими компонентами: МС + 2,4-Д 2 мг/л + 6-БА 1,0 мг/л + КТ 0,1 мг/л було обране вченими як найкраще для умов індукції калусу пагонів модрини.

2.3.2 Гістологічний аналіз поверхневої структури калусу модрини

Поверхнева структура калусу модрини постійно змінюється в різних циклах культивування. Один і той самий калус демонструє відносно три різні структури з різними циклами росту. Калус, культивований протягом 10 днів, мав на поверхні очевидні опуклості, тріщини на поверхні та пухке розташування; вже після 20 днів культивування поверхня калусу почала вмінатися, розташування стало щільним; рух по цій структурі вказував на

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

різні періоди розвитку на одному й тому ж шматку калусу. Калус після 30 днів безперервного культивування був щільно укладений, а на місці тріщин з'являлася структура ембріоїдного тіла. Форма та розмір ембріоїдної структури не сильно відрізнялися, переважно була куляста форма, що пов'язано зі стадією розвитку калусу.



1) МС + 2,4Д 2 мг/л + 6-БА
1,0 мг/л і + КТ 0,1 мг/л

2) МС+ 6-БА 1,0 мг/л і +
НОК 0,1 мг/л

3) МС+ 6-БА 2,0 мг/л і +
КТ 0,1 мг/л

Рис. 2.3 – Вплив різних комбінацій та концентрацій гормонів на сиру та суху масу калусу пагонів модрини, а також різниця в кожній обробці, що відображає ріст калусу (масштабна шкала: 5 мм) [22]

2.3.3 Аналіз впливу світлової обробки на швидкість індукції калусу

Світло відіграє важливу роль у формуванні калусу, диференціації та синтезі вторинних метаболітів. Швидкість індукції калусу модрини становила 26,3% у темряві при 24 год/добу, і зі збільшенням часу культивування більша частина калусу ставала коричневою, що свідчить про твердість калусу. Свіжа та суха маса калусу спочатку збільшувалися, а потім зменшувалися, і через 40 днів культивування свіжа маса досягла

максимального значення ($2,78 \pm 0,67$ г), тоді як і суха маса досягла піку через 40 днів ($0,68 \pm 0,15$ г). При 24-годинному світловому культивуванні рівень індукції калусу модрини становив 47 %, але більша частина калусу була світло-жовто-коричневою. Колір поверхні при 24-годинному світловому культивуванні калусу був темним, а вага свіжої та сухої речовини постійно зростала, і максимальна вага свіжої речовини становила $2,27 \pm 0,53$ г, тоді як максимальна суха маса – $1,67 \pm 0,22$ г. Показано, що рівень індукції калусу становив 64,4 % при 12-годинному світловому культивуванні, що на 17,4% вище, ніж при світловому 24-годинному культивуванні. Більше того, індукований калус модрини був світло-жовтим, жовто-зеленим і щільнішим. Максимальна вага свіжої речовини досягала $2,94 \pm 0,62$ г. Тому вченими зроблений висновок, що 12-годинне світлове культивування найбільш кращий світловий режим для індукції калусу пагонів модрини.

2.3.4 Вплив концентрацій екзогенних гормонів на накопичення таксифоліну в калусі модрини

Для досліджень зміни вмісту калусу модрини, зміни вмісту саме таксифоліну в калусі пагонів модрини, було відібрано кілька гормональних комбінацій з високою швидкістю індукції та проведено аналіз за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Так вміст таксифоліну в 6-БА 1 мг/л + НОК 0,1 мг/л становив 0,477%; вміст таксифоліну в 2,4-Д 2 мг/л + 6-БА 1 мг/л становив 0,113 %, тоді як вміст сполуки в 2,4-Д 4 мг/л + 6-БА 2 мг/л становив лише 0,037 %. Аналіз результатів показав, що низькі дози 6-БА та НОК є корисними для накопичення таксифоліну в калусі, а збільшення концентрації 2,4-Д пригнічує накопичення сполуки та інших вторинних метаболітів. Крім того, вміст речовини в корені 30-річної модрини олгенської (*Larix olgensis*) становить близько 0,7%, тоді як вміст таксифоліну в калусі, отриманому за допомогою культури рослинних тканин, сягав до 0,4 %, що свідчить про те, що індукція калусу є ефективним та швидким методом одержання вторинних метаболітів, а продуктивність краща [22].

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

2.3 Біосинтез цільового продукту

Флавоноїди є найпоширенішим вторинним метаболітом, що міститься в рослинах, зі значним позитивним впливом на здоров'я.

Таксифолін або дигідрокверцетин — це 3,5,7,3',4'-пентагідроксифлаванон, що належить до класу поліфенолів.

У рослині таксифолін та споріднені сполуки біосинтезуються фенілпропаноїдним шляхом, і більшість етапів біосинтезу охарактеризовані в сучасній науковій літературі, проведено реконструкції біосинтетичних шляхів. Для експресії таких шляхів використовуються мікробні та рослинні платформи для одержання сполук, споріднених з таксифоліном, або шляхом реконфігурації генетичних ланцюгів або біотрансформації цілих клітин.

Таксифолін — це підклас флаванонів, ізофлаванон в групі флавоноїдів. Основна структура таксифоліну складається з двох фенільних груп (кільце А та кільце В), які з'єднані гетероциклічним кільцем (кільце С) (рис. 2.4).

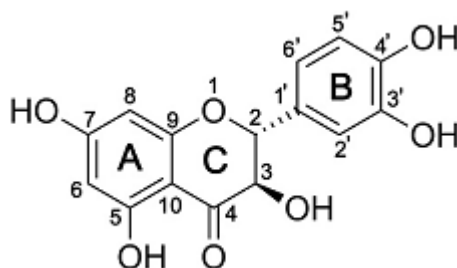


Рис. 2.4 – Структура таксифоліну

Структура речовини містить 3-гідроксильну групу в кільці С, яке з'єднане з кільцем В у положенні вуглецю-2. Це пентагідроксифлаванон, що містить п'ять гідроксильних груп у таких положеннях 3-, 3'-, 4'-, 5- та 7-. Назва речовини таксифолін за IUPAC – (2R, 3R)-2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-2,3-дигідрохромен-4-он. Біологічно активна речовина має

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

(2R, 3R)-конфігурацію та є кон'югованою кислотою (+)-таксіфоліну (1-), енантіомеру (-)-таксіфоліну. Таксифолін має два стереоцентри на С-кільці та 4 стереоізомери. Таксифолін з конфігурацією (2R, 3R) є одним із стереоізомерів і складається з 2 пар енантіомерів. У флавононолів відсутній подвійний зв'язок між гідроксильною та карбонільною групами.

Фенілпропаноїдний шлях відповідає за синтез різноманітних фенольних метаболітів, у тому числі флавоноїдів. Ці сполуки, як і подібні фенольні метаболіти, можуть індукуватися стресом і виконують значну роль у захисті рослин як антиоксиданти, наприклад, для захисту від ультрафіолетового опромінення. Структурнофункціональні дослідження флавоноїдів показали, що положення їхніх подвійних вуглецевих зв'язків і модифікацій, таких як глікозилювання та метилювання, а також гідроксильних груп, визначають їхні антиоксидантні властивості.

Утворення рослинних флавоноїдів здійснюється за допомогою біосинтетичних шляхів: шикіматного (кільце В) та ацетатного (кільце А) і відбувається у хлоропластах рослин. Завдяки сучасним біологічним методам досліджень є з'ясованим біологічний синтез флавоноїдів у рослинній клітині. Ідентифікований весь каскад біохімічних перетворень показаний на рис. 2.5.

Всі флавоноїди мають єдиного попередника – шикімову кислоту, у зв'язку з чим виділено шикіматний шлях походження одного бензольного кільця та ацетатний шлях — другого. Відомо, що починається утворення ароматичного остова майбутньої молекули флавоноїдів за шикіматним шляхом з конденсації еритрозо-4-фосфату і фосфоенолпірувату (ФЕП). При злитті молекул-попередників утворюється продукт 7-фосфо-3-дезоксид-арабіногептулозонова кислота, яка, замикаючись у кільце, у свою чергу, перетворюється на 3-дегідрохінну кислоту. Наступним етапом є процес дегідратації та перетворення на 3-дегідрошикімову кислоту, яка далі

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

перетворюється в шикімову кислоту, відповідно сполуку, що дала назву всьому циклу.

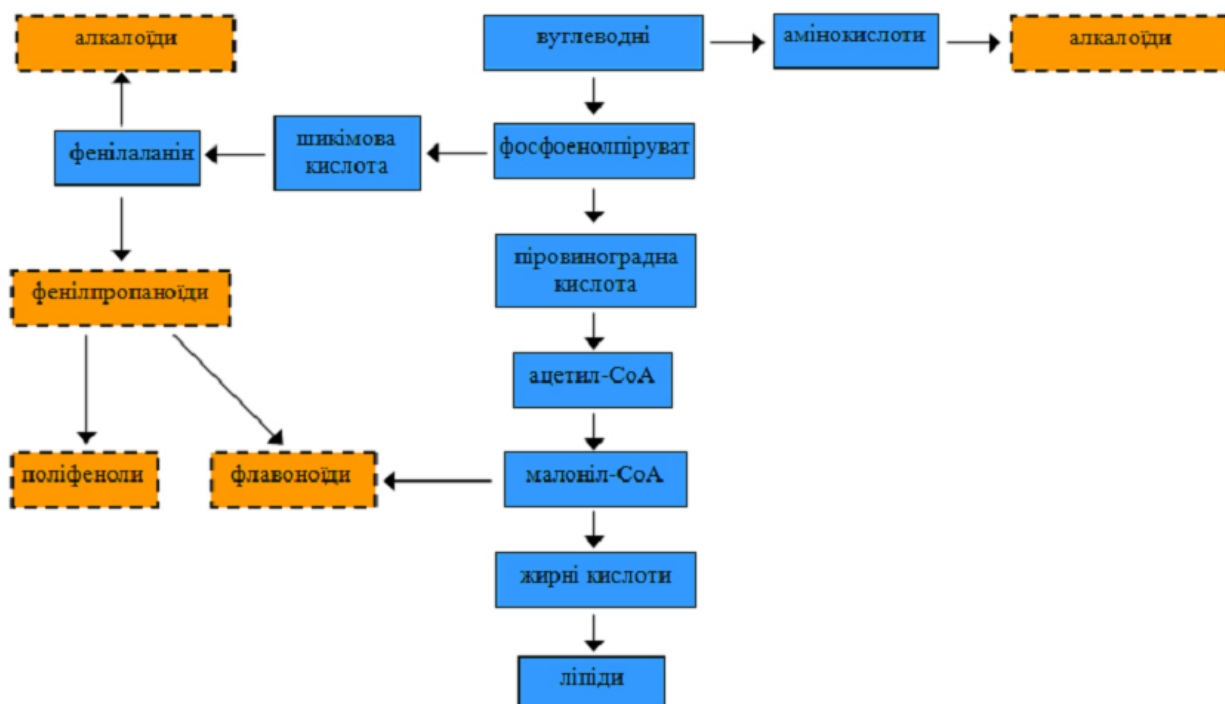


Рис. 2.5 – Схема синтезу рослинною клітиною флавоноїдів (пунктиром виділені класи вторинних метаболітів)

Подальші перетворення в рослинах спрямовуються на збільшення у циклі кількості подвійних зв'язків: фосфорилювання шикімату, приєднання ще молекули ФЕП із подальшим дефосфорилюванням. Усі описані перетворення призводять до появи такого проміжного продукту – хоризмової кислоти, з якої через виникнення префенової кислоти часто утворюється L-триптофан. Остання сполука є попередником усіх індольних сполук. Або може утворитися амінокислота L-фенілаланін, з появою якого спряжені всі подальші реакції синтезу флавоноїдів. Тобто доведено розділення шикіматного шляху на дві гілки, а третя гілка вже може відокремлюватися у випадку появи амінокислоти L-тирозину з L-фенілаланіну. Формуванням двох незамінних для організму людини амінокислот завершується шикіматний шлях. Цей шлях є важливою ланкою первинного метаболізму

клітин рослин як джерело вказаних амінокислот. Всі подальші реакції пов'язані з перетворенням попередника – амінокислоти L-феніلالаніну (рис. 2.6).

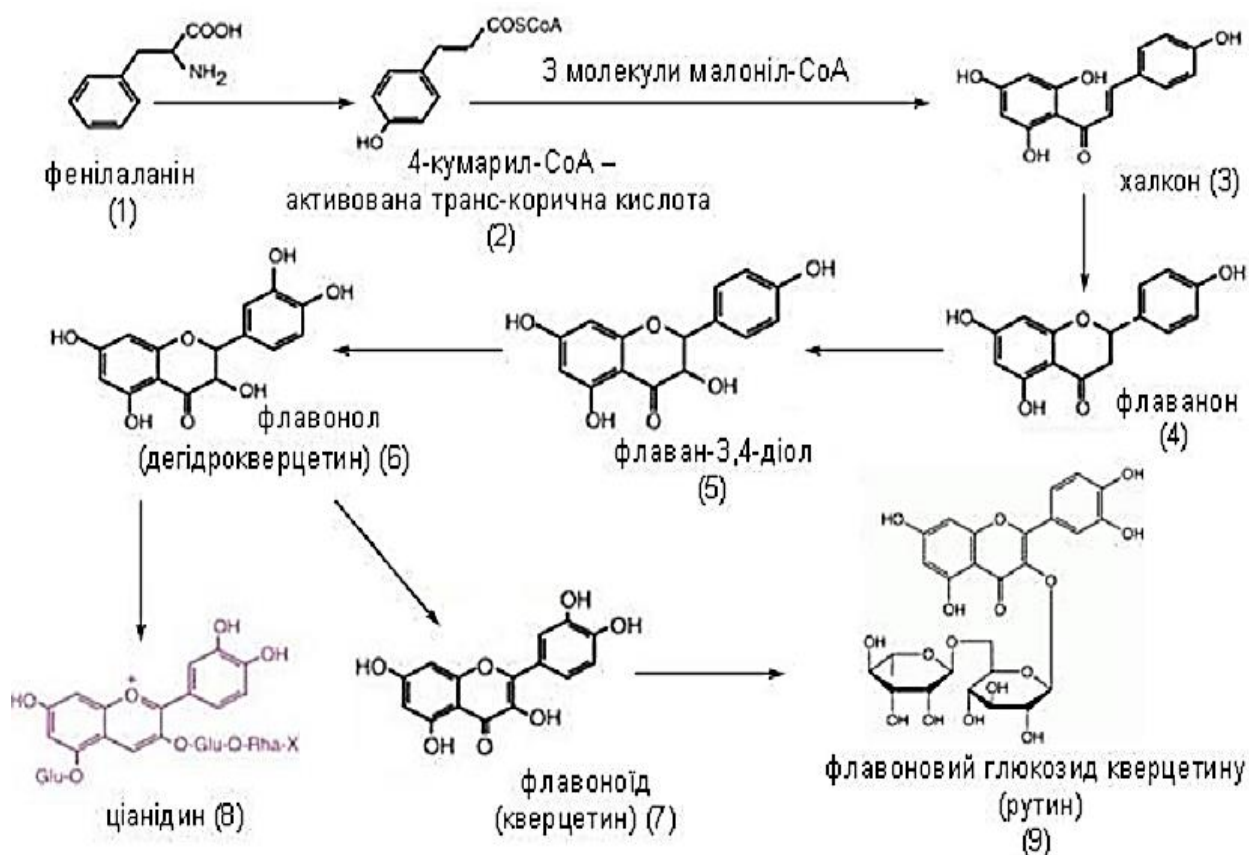


Рис. 2.6 – Схема синтезу флавоноїдів

У новому метаболічному каскаді першою реакцією є дезамінування амінокислоти-попередника (1 — феніلالаніну) за допомогою ферменту феніلالанін-аміак-ліази (ФАЛ) з появою транскоричної кислоти (2). Далі відбувається парагідроксилювання транскоричної кислоти з появою 1,4-кумарової кислоти (пара-кумарової кислоти). Ця кислота вважається найпростішою фенольною сполукою, яка синтезується в рослинах. Кислота вступає у багаточисленні реакції і є основою для синтезу різноманітних класів фенолів, серед яких утворення флавоноїдів відбувається як ще одне перетворення 1,4-кумарової кислоти і є відгалуженням у комплексі інших перетворень. При цьому 1,4-кумарова кислота попередньо активується коензимом А і вступає далі в реакцію з трьома молекулами активованої

малонової кислоти. До бічного аліфатичного ланцюга відбувається приєднання трьох ацетатних фрагментів. Далі після внутрішньомолекулярного замкнення ацетатних фрагментів за участю ферменту халконсинтази утворюється друге бензенове кільце. Відзначається, що спочатку утворюється халкон (3) з незамкнутим другим кільцем, а вже потім халкон перетворюється на ізомерну форму – флаванон (4) за участю відповідної ізомераз. Так вуглеводневий скелет флавоноїдів має подвійне біогенетичне походження, на відміну від інших фенольних сполук: перше кільце утворюється за шикіматним шляхом, тобто є продуктом вторинних перетворень L-фенілаланіну, а друге кільце формується внаслідок конденсації трьох ацетатних залишків, які є простими продуктами вуглеводневого обміну.

Далі у синтезі кверцетину та глікозидної форми кверцетину — рутину — відбуваються окисно-відновні реакції, у процесі яких із флаванону (наргініну) формується представник іншого класу фенольних сполук — флавонол (дегідрокверцетин) (6), з подальшим його перетворенням на кверцетин (7). Дегідрокверцетин є основою, що при приєднанні різноманітних цукрових залишків стає попередником пігментів антоціанів (8) або інших флавоноїдів.

Також відомо, що при формуванні кільця А розширення ланцюга відбувається через приєднання трьох молекул малоніл-КоА до синтезованого шикіматним шляхом цинамоїл-КоА. У результаті формується полікетид, що може циклізуватися двома різними способами залежно від ферменту. Наприклад, за допомогою реакцій Кляйзена або Альдольною формується ароматичне кільце. За допомогою фермента халконсинтази об'єднуються три залишки малоніл-КоА із залишком цинамоїл-КоА, утворюючи халкони, наприклад, нарингенін-халкон. Так, синтез халконів є першим і загальним етапом у біосинтезі флавоноїдів, а халконсинтаза — це ключовий фермент

послідовних реакцій формування всього комплексу даної групи сполук. Завдяки халконізомеразі каталізується стереоспецифічна ізомеризація халкону до відповідних флаванонів. У цих процесах кисле середовище сприяє перерозподілу рівноваги в бік формування флаванонів, а лужне середовище — халконів. Із флаванонів далі утворюються флавони, флаваноноли, флавоноли тощо [21–30].

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						30
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

З ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок матеріального балансу

У роботі у виробництві таксифоліну пропонується використовувати біореактор на 2 м^3 , з урахуванням коефіцієнту заповнення 0,6 робочий об'єм біореактора буде дорівнювати $1,2 \text{ м}^3$. Отже за одну серію буде вироблятися $1,2 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з якої будуть виділяти цільовий продукт - таксифолін. Приводимо розрахунки потреб в компонентах для здійснення однієї серії виробництва таксифоліну. У процесі розрахунків приймаємо, що втрати культуральної рідини на кожній стадії дорівнюють 10 %, кількість первинної суспензії, що пройшла початкові стадії інокуляції, яку вносять до біореактора – 10 % [16].

Зважаючи на втрати, об'єм культуральної рідини у основному біореакторі $V_{\text{к.р.1}} = 1,32 \text{ м}^3$, із якого на живильне середовище та посів приходить:

$$V_{\text{ж.с.1}} = 1,32 / 1,1 = 1,2 \text{ м}^3,$$

$$V_{\text{п.м.1}} = 1,32 - 1,2 = 0,12 \text{ м}^3.$$

Зважаючи на втрати, об'єм культуральної рідини у попередньому ферментері $V_{\text{к.р.2}} = 0,132 \text{ м}^3$, із якого на живильне середовище та посів приходить:

$$V_{\text{ж.с.2}} = 0,132 / 1,1 = 0,12 \text{ м}^3,$$

$$V_{\text{п.м.2}} = 0,132 - 0,12 = 0,012 \text{ м}^3.$$

Для отримання $0,012 \text{ м}^3$ культуральної рідини використаємо біореактор, в якому з урахуванням втрат буде $V_{\text{к.р.3}} = 0,0132 \text{ м}^3$ культуральної рідини, із якої:

$$V_{\text{ж.с.3}} = 0,0132 / 1,1 = 0,012 \text{ м}^3,$$

$$V_{\text{п.м.3}} = 0,0132 - 0,012 = 0,0012 \text{ м}^3.$$

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						31
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Отже, з врахуванням масштабування процесу на першу стадію в колби, беручи до уваги втрати потрібно внести $0,00132 \text{ м}^3$ (1,32 л) культуральної рідини, із якої:

$$V_{\text{ж.с.4}} = 0,00132 / 1,1 = 0,0012 \text{ м}^3,$$

$$V_{\text{п.м.4}} = 0,00132 - 0,0012 = 0,00012 \text{ м}^3.$$

Таким чином, для проведення однієї серії потрібно живильного середовища: $V_{\text{ж.с.}} = 1,3332 \text{ м}^3$, кількість компонентів в якому наведена в табл. 3.1 [17, 18].

Таблиця 3.1 – Потреби у компонентах живильного середовища на одну серію таксифоліну

Компонент	Кількість, г	
	на 1 л середовища	на 1 серію (1333,2л)
1	2	3
KNO_3	38	50661,6
$\text{NH}_4 \text{ NO}_3$	33	43995,6
KH_2PO_4	3,4	4532,88
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ або	7,4	9865,68
MgSO_4 безводний	3,6	4799,52
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ або	13,8	18398,16
CaCl_2 безводний	8,8	11732,16
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,57	7425,924
$\text{Na}_2 \text{ EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,45	9932,34
H_3BO_3	6,20	8265,84
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30	29730,36
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60	11465,52
KJ	0,83	1106,556
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	333,3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	33,33

Продовження табл. 3.1

1	2	3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	33,33
Мезоінозит	100	133320
Нікотинова кислота	0,5	666,6
Піридоксин HCl	0,5	666,6
Тіамін HCl	0,5	666,6
Гліцин	2,0	2666,4
Сахароза	30	39996
Агар	7	9332,4
Вода дистильована	700,25	933573,3

3.2 Розрахунок і вибір обладнання

Основним обладнанням на стадії виробничого культивування є біореактори. Основні типи біореакторів (ферментерів):

1. Механічні, в яких перемішування здійснюється завдяки роботі механічної мішалки. Недоліки таких апаратів: нерівномірне перемішування.

2. Ерліфтні, в яких використовують барботаже перемішування продувкою газової фази через рідину. Недоліки таких апаратів: може бути недостатньо перемішано та утворена піна.

3. Газо-вихрові ферментери, в яких перемішування проходить за допомогою осьового протитоку, що створюється газовим вихором. Недоліки таких апаратів: мають складну конструкцію.

Вибір певного типу біореактора залежить від технологічних потреб і технологічних аспектів виробництва, таких як тип культури і її чутливість, обсяги виробництва, враховуючи, що дуже великі обсяги вимагають інтенсивного перемішування, стабільної системи автоматизації.

Біореактори (ферментери) є головною складовою біотехнологічного виробництва культур тканин рослин. Ці апарати забезпечують необхідні умови для росту і метаболізму клітин та підвищують ефективність, продуктивність одержання біологічно активних сполук.

Мішалки є критичним компонентом ферментерів, оскільки забезпечують однорідне перемішування культурального середовища, рівномірний розподіл поживних речовин і підтримання температурного режиму.

Типи мішалок:

Лопатеві мішалки: Конструктивно складаються з кількох лопатей, розташованих перпендикулярно до осі валу. Використовуються для перемішування малов'язких рідин.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						34
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Барботери необхідні в апаратах для подачі газу (кисню або іншого) у біореактори для аерації культурального середовища.

Конструктивно розрізняють типи барботерів: пористі барботери, пузирні інжектори, поверхневі аератори.

Теплообмінні пристрої у біореакторах забезпечують підтримання необхідних температурних режимів відведенням або підведенням тепла [17, 18].

Розрахуємо об'єми біореакторів, потрібних для реалізації процесу.

У роботі пропонується встановити біореактор на $V1 = 2 \text{ м}^3$, з урахуванням коефіцієнту заповнення біореактору 0,6 робочий об'єм біореактора буде дорівнювати $1,4 \text{ м}^3$ (рис. 3.1).

Параметри цього біореактора:

діаметр апарата – $D = 1400 \text{ мм}$,

площа поверхні теплообміну – $F = 4,25 \text{ м}^2$,

діаметр валу мішалки обирається із розмірів $d = 65, 80, 95 \text{ мм}$,

висота рівня рідини - при $\varphi = 0,75 \text{ Н} = 1,080 \text{ м}$, при $\varphi = 0,5 \text{ Н} = 0,72 \text{ м}$.

На попередній стадії може утворюватися $0,132 \text{ м}^3$ культуральної рідини, враховуючи коефіцієнт заповнення номінальний об'єм біореактора дорівнює $0,44 \text{ м}^3$, обираємо стандартний $V2 = 1 \text{ м}^3$.

Параметри цього біореактора такі:

діаметр апарата – $D = 1200 \text{ мм}$,

площа поверхні теплообміну – $F = 3,4 \text{ м}^2$,

діаметр валу мішалки обирається із розмірів $d = 50, 65 \text{ мм}$,

висота рівня рідини - при $\varphi = 0,75 \text{ Н} = 0,76 \text{ м}$, при $\varphi = 0,5 \text{ Н} = 0,54 \text{ м}$.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						35
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

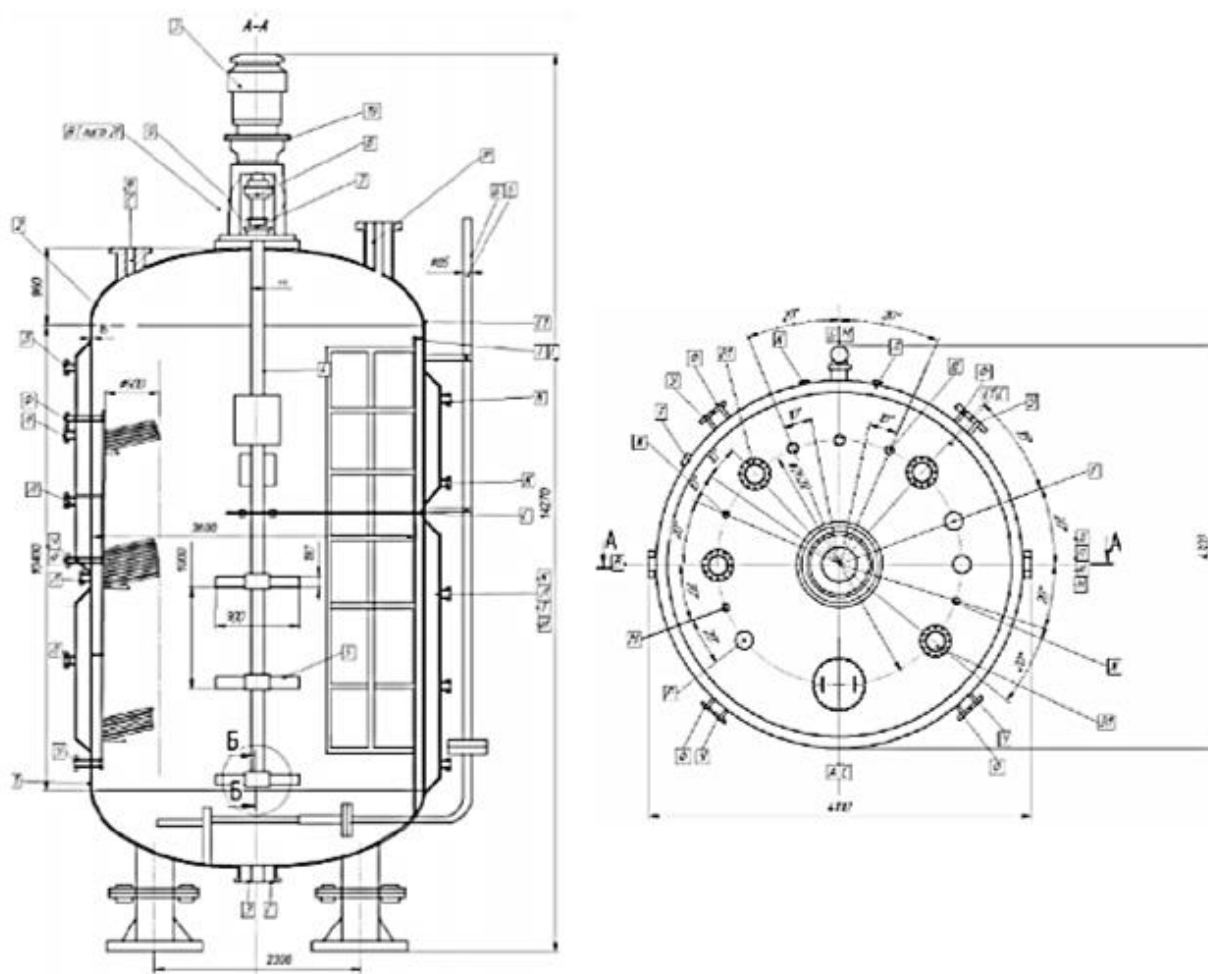


Рис. 3.1 – Загальний вигляд біореактора:

1 – корпус, 2 – кришка, 3 – привід, 4 – вал, 5 – перемішуючий пристрій, 6 – барботер, 7 – ущільнення, 8 – корпус муфти, 9 – стійка, 10 – фланець, 11 – опора, А – люк-лаз, Б – вхід повітря в барботер, В – вихід повітря, В1 – смотрове вікно біореактора, Г – вхід поживного середовища, Г1 – вхід хімічного піногасника, Д – вихід посівного матеріалу з апарата, Е, Е1 – датчики рівня піни в апараті, Ж – промивка, пропарка, И – датчик розчиненого кисню, К – вхід охолоджувальної води в оболонку, Л – вихід води з оболонки, М – мембранний розділювач заміру рівня в апараті, Н – вимірювач кисню, П – відбір проб з біореактора, Р – резервний патрубок, С – сигналізатор температури всередині апарата, Т – термометр спротиву, У – вхід охолоджувальної води в змійовик біореактора, Ф – люк, З – злив

3.3 Опис технологічного процесу виробництва таксифоліну із суспензійної культури модрини

До початку технологічного процесу відбувається підготовка виробництва.

1.1. Підготовка приміщення. Персоналом проводиться перевірка виробничих зон і обладнання відповідно до вимог нормативних документів. Мийно-дезінфікуючі розчини готуються в стерилізаційному блоці. Підготовку приміщень проводять наприкінці зміни у такій послідовності:

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

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

3. Технологічне обладнання готується до роботи за стандартною робочою методикою підприємства.

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

5. Забороняється додавати свіжі розчини до вже використовуваних розчинів при дезінфекційній обробці.

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

7. Приміщення маркуванням позначають як готове до проведення виробничих процесів у ньому.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

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

1.3. Стерилізація обладнання. Для проведення стерилізації обладнання подають гостру пару за температури 130 °С і тиску 0,2 МПа. Тривалість обробки паром 30 хв. Утворений конденсат подається на знешкодження.

2. Очищення води. Вода якісно може відрізнитись за вмістом органічних та мінеральних речовин, своєю жорсткістю, вмістом солей, наявністю і розмаїттям мікрофлори, в залежності від розміщення виробництва. Запропоновано використання питної води, яка має пройти стадії очищення і позбавлення мінеральних солей. Для процесу очищення води обрано установку зворотного осмосу Arista ROF-60000 з продуктивністю 60 м³/год, потужністю до 50 кВт.

3. Очищення повітря

3.1. Забір повітря. Повітря забирають з атмосфери повітрозабірником, який розташований за межами повітродувної станції, точка забору знаходиться на 5 м вище рівня землі за температури від 15–35 °С.

3.2. Стиснення та охолодження повітря. Для стиснення використовується компресор. Тиск нагнітання становить 0,165 МПа. Тиск контролюється регулярно за манометром. Стиснене повітря подається до охолоджувальної установки. Перед фільтрами встановлено ресивер, який

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

необхідний для вирівнювання тиску системи і для рівномірної подачі повітря на фільтри.

3.3. Грубе очищення повітря. Повітря пропускається через волокнисту касету з фільтром типу G4, у якій затримується зола, дрібний пил, аерозолі тощо. Матеріалом для фільтрування служить тканина з діаметром пор 10 мкм. Грубе очищення має ефективність 98 %.

3.4. Тонке очищення повітря. Повне очищення повітря проходить за використання фільтра з ефективністю 99,97 %. Даний фільтр очищає від частинок, що мають діаметр до 0,3 мкм, тобто від смоляного туману, найдрібніших пилових частинок, мікроорганізмів тощо.

Стадія 1. Приготування розчину етанолу 70 %.

Розчин етанолу 70%-ий використовується для екстракції таксифоліну із суспензійної культури модрини. Етанол надходить через мірник у реактор, обладнаний пропелерною мішалкою, очищена вода надходить через інший мірник. Приготування розчину відбувається протягом 15 хв з частотою обертання 550 об/хв мішалки. Розчин етанолу 70%-ий відправляється на Стадію Екстрагування таксифоліну.

Стадія 2. Приготування розчину луку.

Необхідно підтримувати показник рН на стадії культивування у біореакторі, тому у реакторі готується 1 % розчин КОН. Луг відважується, очищена вода надходить через мірник.

Стадія 3. Приготування поживного середовища.

Для вирощування суспензійної культури модрини у біореакторі вносять поживні компоненти у такій кількості та концентрації, щоб це забезпечувало необхідне накопичення біомаси і збільшення вмісту вторинних метаболітів у рослинних клітинах.

Компоненти середовища подаються у реактор, де відбувається перемішування за допомогою пропелерної мішалки. Потужність мішалки – 1200 Вт, частота обертів – 600 об/хв. Через шнекові дозатори подаються

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

компоненти середовища. Склад живильного середовища такий: KNO_3 — 1,85 г/дм³; NH_4NO_3 — 1,6 г/дм³; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,38 г/дм³; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,43 г/дм³; KH_2PO_4 — 0,19 г/дм³; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,0277 г/дм³; $\text{Na EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,0375 г/дм³; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,0225 г/дм³; мезоінозит — 0,11 г/дм³; тіамін — 0,0003 г/дм³; піридоксин — 0,0003 г/дм³; нікотинова кислота — 0,0003 г/дм³; сахароза — 31 г/дм³, ауксин (ІОК) — 0,022 г/дм³, 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота — 2,0 мг/л, 6-бензиламіноаденін — 1,0 мг/л, кінетин — 0,1 мг/л.

Стерилізація живильного середовища.

Стандартне середовище необхідно простерилізувати для запобігання контамінації сторонньою мікрофлорою. Для цього у стерилізатор, до якого надходить живильне середовище після реактора, подається гаряча пара під тиском 0,2 МПа протягом 25 хв за температури 130 °С.

Стадія 4. Інокуляція суспензії.

До інокулятора з колби переноситься первинна суспензійна культура *Larix olgensis* і одразу подається поживне середовище зі стадії 3. Приготування живильного середовища. Для інокуляції суспензійної культури рекомендовано реактор з лопатевою мішалкою та барботером. Культура вирощується протягом 5 днів за температури 26–28 °С, 160 об/хв, рН 5,5–6,0. Для інокуляції подається повітря, що пройшло тонке очищення. Посівний матеріал подається на стадію 5. Культивування у біореакторі на виробниче культивування.

Стадія 5. Культивування у біореакторі.

Простерилізоване живильне середовище після стерилізації на стадії 3 подається до виробничого біореактора, куди також надходить інокулят зі стадії 4 для проведення культивування суспензійної культури. Перемішування є механічним з використанням лопатевої мішалки, частота її обертання 160 об/хв. Технологія вимагає аерації, тож подається повітря з

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

барботера. Один цикл культивування триває близько 336 год. Рівень рН має контролюватися спеціальним датчиком і підтримуватися на рівні 5,5–6,0, у разі збільшення рН додається 1% розчин КОН зі стадії 2 Приготування розчину луку. Значення тиску має бути 0,1 МПа. Підготовлене повітря для барботування подається через інжектор з нижнього боку біореактора. Швидкість подачі барботажного повітря становить 65 кг/год. Рівень розчиненого у середовищі кисню (pO_2) встановлюється на рівні 35 % насичення. Температура має підтримуватися на рівні 26–28 °С протягом усього часу культивування надходженням до оболонки біореактора теплоагенту — гарячої води. Температура контролюється термopарою.

Стадія 6. Відділення біомаси від культуральної рідини

6.1. Гомогенізація

Через насос суспензійна маса подається до збірника, а потім направляється до гомогенізатора. Гомогенізація проводиться за допомогою гомогенізатора високого тиску. Температура суспензії під час процесу підтримується на рівні 25 °С, а тиск — на рівні 15 МПа. Гомогенізація посилює руйнування клітинних стінок, внаслідок підвищується вихід таксифоліну. Одержаний осад надходить на фільтрування на фільтр-прес на Стадію 6.2.

6.2. Фільтрування на фільтр-пресі

Рослинна біомаса направляється насосом на фільтр-прес, проходить вздовж пластин до моменту повного заповнення суспензією всіх камер. Під тиском тверді частинки осаджуються на поверхні фільтрувальної тканини, густина осаду зростає. Відпрацьоване поживне середовище відправляється на стадію переробки. Технічний контроль обладнання та забрудненості фільтра є обов'язковим.

Стадія 7. Ліюфільне висушування

7.1 Заморожування.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Перший етап ліофільного висушування в ліофільній сушарці проходить за температури -40°C та атмосферному тиску, тривалість процесу 3 години. При цьому глибинна вода в біомасі заморожується.

7.2 Первинне висушування.

Даний етап ліофільного висушування відбувається за температури -5°C і тиску 0,01 МПа, триває 9 годин. Оскільки тиск наднизький, кристалізована вода у клітинах суспензійної культури з твердого стану перетворюється на водяну пару і відводиться з сушарки. Вже як конденсат надходить далі на стадію переробки.

7.3 Вторинне висушування.

Послідовний етап ліофільного висушування проходить за температури вже 30°C , залишковий тиск 135 Па, тривалість 7,5 год. При цьому залишкова волога остаточно випаровується і так само відводиться.

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

Стадія 8. Екстракція вторинних метаболітів з біомаси

8.1 Екстракція вторинних метаболітів.

Вторинні метаболіти з біомаси після ліофілізації одержують у екстракторі екстракцією етанолом 70 % за температури $22-24^{\circ}\text{C}$, тривалість екстракції становить 6 год. Співвідношення екстрагенту і біомаси становить приблизно 10:1.

8.2 Сепарація екстракту.

Після екстракції одержаний екстракт подається у сепаратор, де, під дією води для охолодження в оболонці апарата, охолоджується до температури 5°C . Етанол, що відділяється, можна використовувати повторно. Суміш вторинних метаболітів надходить насосом до апарата на стадію 9 для виділення таксифоліну.

Стадія 9. Виділення таксифоліну.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						42
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Екстракт з попередньої стадії концентрують під зниженим тиском, потім розчиняють в гарячій воді при 80°C та швидко кристалізують при 4 °C. Після цього його перекристалізують та сушать, отримуючи світло-жовтий порошок екстракту, багатого на таксифолін.

Таксифолін надходить на фасування Стадія 10 та пакування Стадія 11.

Переробка відходів.

Фільтрати з різних стадій можуть повторно використовуватися для виробництва іншої серії таксифоліну. Якщо відпрацьовані елементи з фільтрів не придатні для регенерації, тоді вони транспортуються до полігонів і утилізуються.

Знешкодження відходів.

Воду після миття обладнання і конденсат, який утворився при ліофільному сушінні біомаси чи стерилізації, скидають в міську каналізаційну мережу. Виснажену біомасу рослинної культури після стадії 10.2 та відпрацьоване живильне середовище зі стадії 8.2 можуть піддавати термічному знезараженню і використовувати як добрива, а також для компостування чи одержання біогазу.

Регенерація теплоносіїв.

Відпрацьовані теплоагент та холодоагент зі стадій 6, 7, 8.2, 10.2, залишки вологи при відстоюванні на стадії 11, а також відпрацьовані конденсати направляються на регенерацію, яка заснована на рекуперації тепла в теплообміннику і відновленні потрібних температур для виробничого процесу.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.4 Схеми виробництва

Виробництво таксифоліну при культивуванні рослинної суспензійної культури модрини містить стандартні стадії роботи для методу періодичного глибинного культивування за принципом масштабування, схема якого наведена на рис. 3.2.

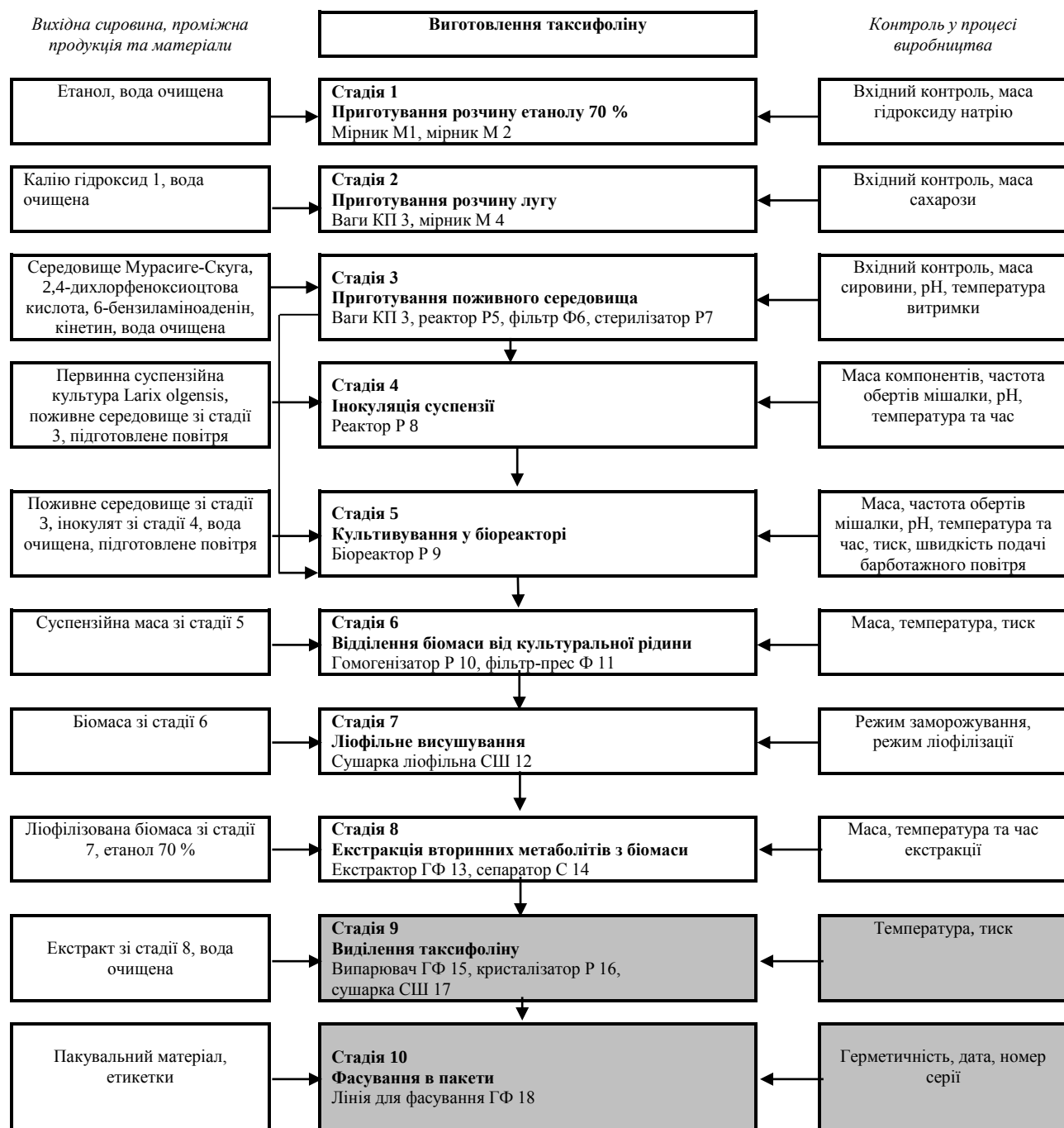




Рис. 3.2 – Технологічна схема одержання таксифоліну

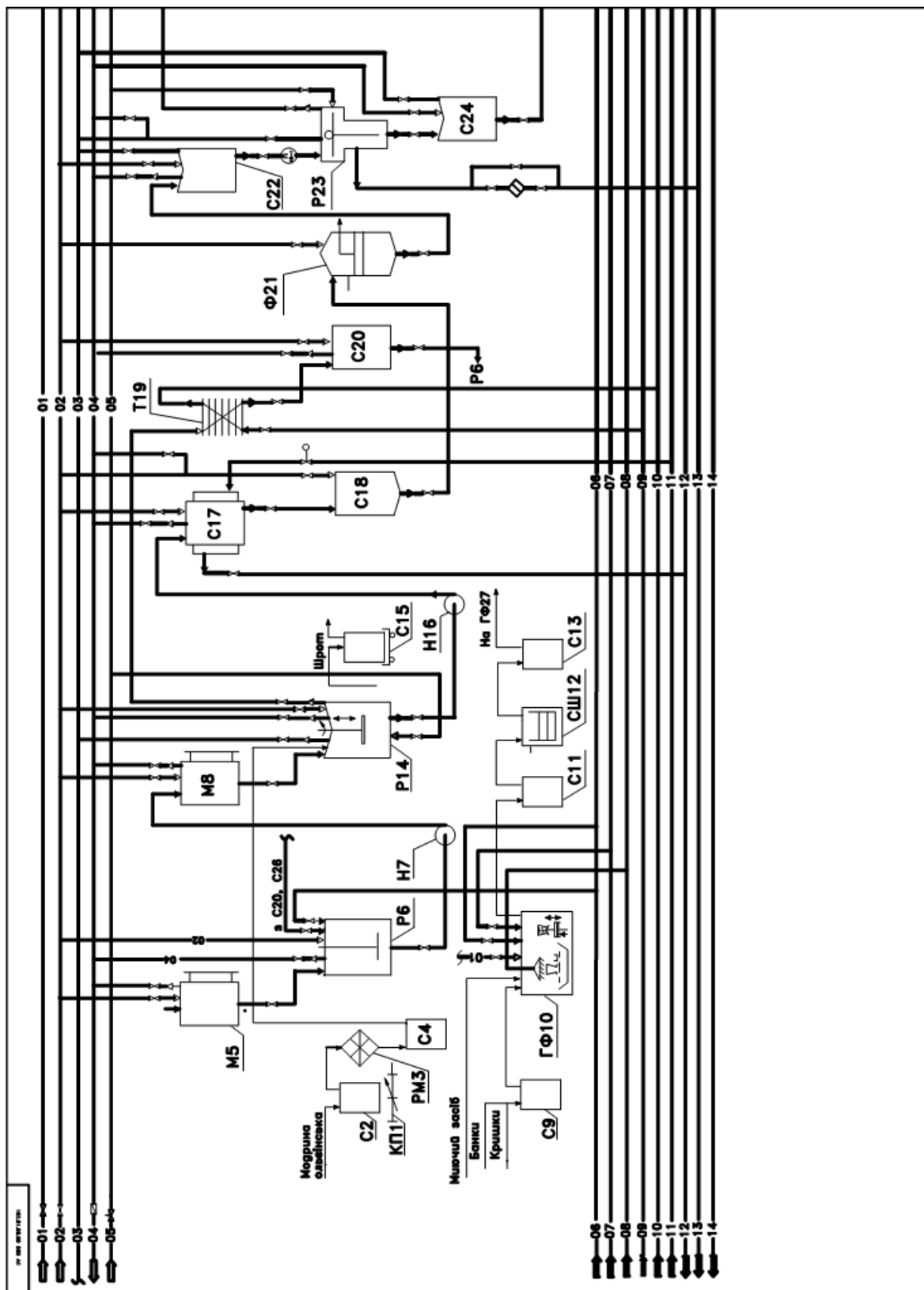


Рис. 3.4 – Апаратурна схема одержання таксифоліну

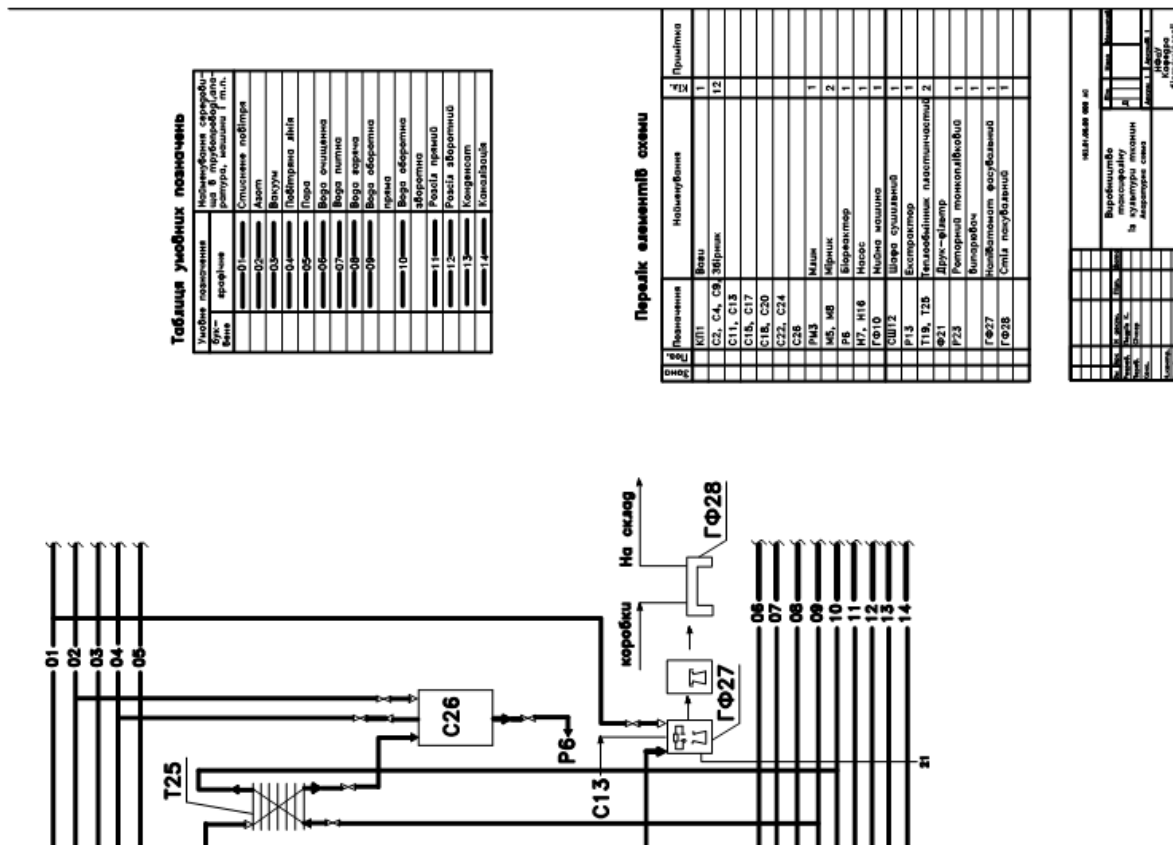


Рис. 3.4 – Апаратурна схема одержання таксифоліну (продовження)

3.5 Контроль виробництва

Контроль процесу включає технологічний, хімічний та мікробіологічний аспекти.

Технологічний контроль полягає в дотриманні тиску, температури тощо, зазначених у нормативній документації та наведений в регламенті.

Хімічний контроль на підприємстві проводиться для перевірки складу готових поживних середовищ та сировини на вміст необхідних речовин. Він також включає аналіз накопичення метаболіту під час процесу.

Мікробіологічний контроль необхідний для перевірки наявності будь-якої мікрофлори на всіх етапах, від поживного середовища до завершення процесу.

Завершення суспензійного культивування визначається за такими критеріями: накопиченням таксифоліну, завершенням регламентного часу.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.6 Екологічні аспекти виробництва

Під час технологічного процесу із суспензійними культурами лікарських рослин, в тому числі модрина, спостерігається велике споживання кількості води й повітря, що можуть забруднюватися органічними і мінеральними речовинами, а також мікрофлорою.

Вивчення та контроль мікрофлори повітря є необхідним для дотримання санітарно-гігієнічних вимог виробництва, оскільки це може негативно впливати на здоров'я персоналу.

Рекомендується на підприємстві використовувати ряд фільтрів для постадійного очищення повітря, що видаляється з вентиляційної системи, запровадження обов'язкової системи контролю за вмістом відпрацьованого повітря, встановлення сучасного спеціального обладнання для зниження викидів шкідливих речовин в атмосферу. Джерела викидів повітря мають бути ізольованими та мають бути облаштовані на підприємстві спеціальні зони для очищення на виході відпрацьованого повітря.

На підприємстві з виробництва таксифоліну мають відбуватись регулярні перевірки систем фільтрування, вентиляції та очищення повітря.

Із стічних вод після технологічного процесу видаляється близько 70% нерозчинних механічних домішок. Споруди для механічного очищення води - це решітки (або УФС – установка фільтрувальна самоочисна) і сита; пісколовки; мембранні елементи, первинні відстійники.

Тобто, для великих частинок часто використовуються решітки і сита. У пісколовках під дією сили тяжіння відбувається осадження дрібніших частинок. У жироловках видаляються гідрофобні речовини флотацією. Для очищення стоків від найдрібніших частинок необхідне фільтрування шляхом пропускання через шар зернистого матеріалу. На великих промислових виробництвах використовують мембранні фільтри [8, 19].

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						49
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВОК

На сьогодні таксифолін набуває все більшого попиту через ряд переваг. Таксифолін – потужний антиоксидант, унікальний природний акцептор вільних радикалів кисню, капіляропротектор, кардіопротектор, мембраностабілізатор. Речовина підвищує фізичну та розумову витривалість, стимулює працездатність, зміцнює імунітет, допомагає при перевтомі очей.

У роботі розглянуто спосіб отримання експлантату з модрини ольгінської, наведено промислову технологію і складено технологічну схему виробництва таксифоліну.

Пагони модрини можна використовувати як експлантатне джерело індукції калусу. У роботі показано систему культивування калусу модрини, створеної за допомогою технології культивування рослинних тканин.

Середовище Мурасіге-Скуга з гормонами 2,4-Д та 6-БА і кінетином (КТ) демонструє високий потенціал індукції калусу, а швидкість індукції досягає 83,4%.

Залежно від умов культивування, текстура та колір поверхні отриманого калусу відрізняються, текстура змінюється від крихкої до твердої. Колір поверхні калусу поступово переходить від світло-жовтого до коричневого і, пізніше, до світло-коричневого. Фотоперіод впливає на утворення калусу таким чином, що умови 12-годинного освітлення є найбільш придатними для індукції калусу верхівок пагонів модрини, а швидкість індукції на 17,4 % вища, ніж за іншого освітлення.

Різні комбінації та концентрації гормонів впливають на вміст таксифоліну в калусі, і ці дані також підтверджують потенціал калусу верхівок пагонів модрини як перспективного альтернативного джерела таксифоліну.

Створення стабільної та ефективної системи культивування калусу модрини, розробка промислової технології закладає основу для

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						50
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

промислового виробництва таксифоліну, що може бути найкращою стратегією для отримання таксифоліну в майбутньому.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антиоксидант taxifolin для харчової промисловості. URL: <https://taxifolin.pro/> (дата звернення: 10.04.2025).
2. Бобокало С. В., Алмакаєва Л. Г. Дигідрокверцетин – препарати нового покоління. *Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, 13-16 верес. 2016 р. Харків, 2016. Т. 1. С. 324.
3. Бобокало С. В., Алмакаєва Л. Г. Дигідрокверцетин для парентерального застосування. *Управління якістю в фармації* : матеріали ХІ наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 19 трав. 2017 р. Харків, 2017. С. 29.
4. Бобокало С. В., Алмакаєва Л. Г. Розробка складу парентерального розчину високочистого дигідрокверцетину. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали I Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 5 квітня 2018 р. Харків : НФаУ, 2018. С. 22–23.
5. Бобокало С. В. Розробка складу і стандартизація технології рідких оральних та ін'єкційних розчинів на основі дигідрокверцетину : дис. ... д-ра філософії : 226 / НФаУ. Харків : НФаУ, 2021. 216 с.
6. Дигідрокверцетин G 1500 мг краплі для перорального застосування, 15 мл: ціни та характеристики. URL: <https://liki24.com/uk/p/dgk-g-digidrokvercetin-v-forme-kapel-kap-1500-mg-fl-15-ml/> (дата звернення: 04.03.2025).
7. Дигідрокверцетин таблетки для розсмоктування по 50 мг, 20 шт. URL: <https://podorozhnyk.ua/digidrokvercetin-tabl-d-rozsmokt-50-mg-20/> (дата звернення: 05.03.2025).

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

8. Екологічна біотехнологія : навч. посіб. : у 2 кн. / О. В. Швед та ін. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2018. Т. 1. 424 с.

9. Здорик О. А., Наконечна І. Ю., Георгіянц В. А. Пошук альтернативних природних джерел дигідрокверцетину. *Хімія природних сполук* : матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 30–31 жовт. 2012 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2012. С. 20–21.

10. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навч. посіб. Харків : Факт, 2020. 296 с.

11. Конспект лекцій з дисципліни «Біотехнологія рослинних і тваринних клітин» : для здобувачів другого магістерського рівня зі спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. І. М. Корнієнко. Кам'янське : ДДТУ, 2017. 133 с.

12. Каратєєва О. І., Юлевич О. І. Загальна біотехнологія : курс лекцій для здобувачів (короткого циклу) рівня вищ. освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти. Миколаїв : МНАУ, 2022. 107 с.

13. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : конспект лекцій. Київ : НУХТ, 2019. 252 с.

14. Кравич А. С. Екстрагування біологічно активних речовин з біомаси *Gladiolus imbricatus*, культивованої в умовах *in vitro* : дис. ... канд. техн. наук : 05.17.08 / Нац. університет «Львівська політехніка». Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2016. 159 с.

15. Загальна (промислова) біотехнологія : навч. посіб. / М. Д. Мельничук та ін. Київ : ФОП Корзун Д. Ю., 2014. 252 с.

16. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи бакалавра для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

біоінженерія» ОП «Біотехнологія» / О. С. Калюжная та ін. Харків : НФаУ, 2024. 128 с.

17. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 296 с.

18. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ–2000, 2018. 410 с.

19. Ступак А. С. Технологія отримання вторинних метаболітів з суспензійної культури лікарських рослин : дипломний проект на здобуття бакалавра за освітньо-професійною програмою «Біотехнології» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». Київ : НТУУ «Київський політехнічний інститут ім. І. Сікорського», 2023. 84 с.

20. Тільки в Карпатах! URL: <https://carpaty.net/?p=5269> (дата звернення: 10.04.2025).

21. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навч. посіб. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.

22. Establishment of callus induction system, histological evaluation and taxifolin production of Larch / X. Liu et al. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2021. Vol. 147. P. 467–475.

23. Food ingredients and food made with plant cell and tissue cultures: State-of-the art and future trends / G. Gubser et al. *Eng. Life Sci.* 2021. Vol. 21. P. 87–98.

24. Hassanpour H. Optimized medium composition in *Physalis alkekengi* callus culture altered nitric oxide level for inducing antioxidant enzyme activities and secondary metabolites. *Scientific Reports.* 2024. Vol. 14(1). P. 16425. DOI: 10.1038/s41598-024-67191-7.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						54
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

25. Lizeth A.-A., María de Lourdes M.-C. Production of callus and roots from lateral meristems of *Loeselia Mexicana*. *Bot. sci.* 2018. Vol. 96(3). P. 405–414.

26. Optimization of callus induction with enhancing production of phenolic compounds production and antioxidants activity in callus cultures of *Nepeta binaloudensis* Jamzad (Lamiaceae) / M. Sagharya et al. *Iran J. Biotech.* 2020. Vol. 18(4). DOI: 10.30498/IJB.2020.2621.

27. Production of flavonoids in callus cultures of *Sophora flavescens* Aiton / Ji-Sun Park et al. *Plants.* 2020. Vol. 9. P. 688. DOI: 10.3390/plants9060688.

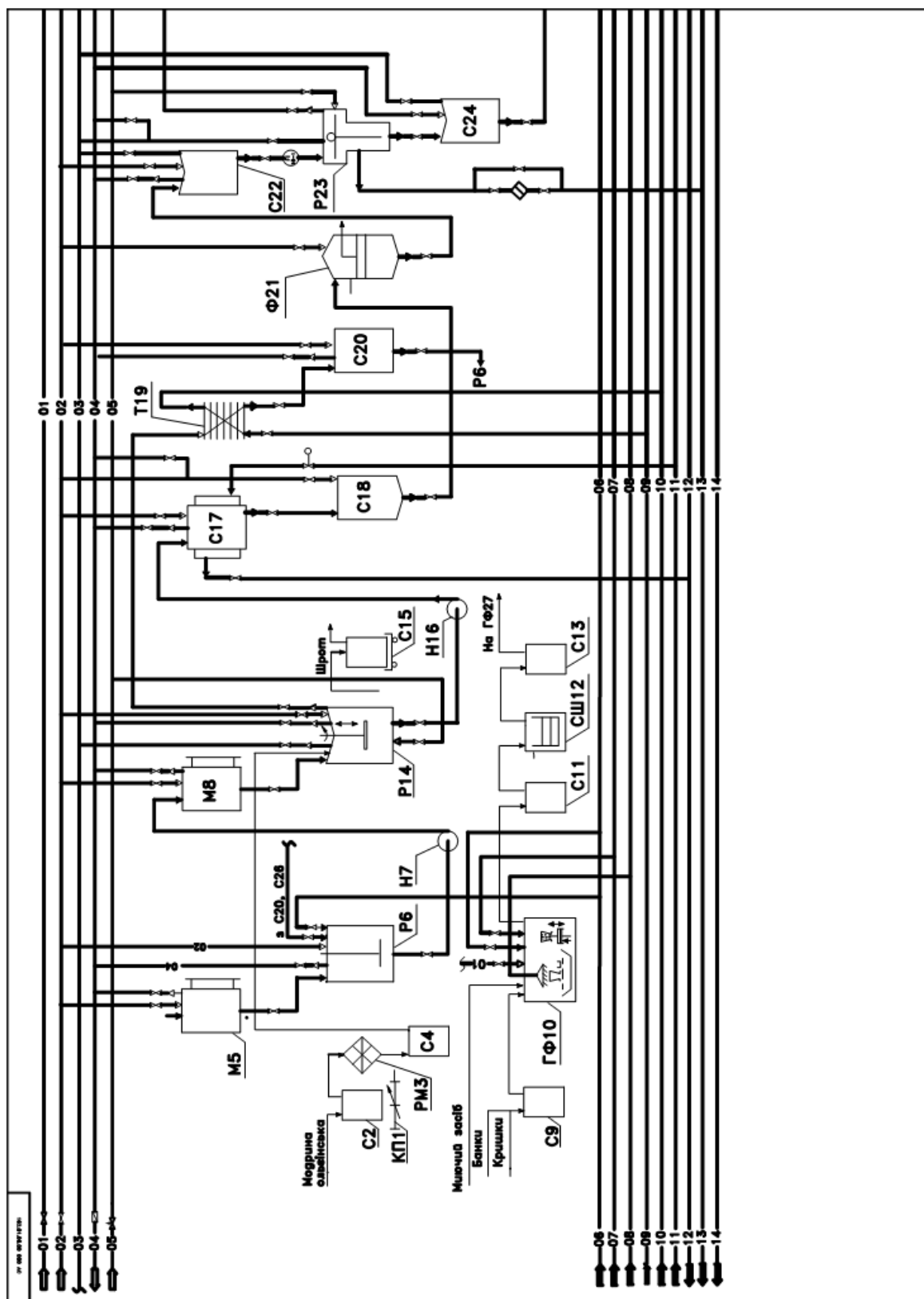
28. Suspension culture of stem cells established of *Calendula officinalis* L. / Š. Kaňuková et al. *Scientific Reports.* 2024. Vol. 14(1). P. 441. DOI: 10.1038/s41598-023-50945-0.

29. (+)-taxifolin (CHEBI:17948). URL: <https://www.ebi.ac.uk> (Date of access: 10.04.2025).

30. Taxifolin, Extracted from Waste *Larix olgensis* Roots, Attenuates CCl₄-Induced Liver Fibrosis by Regulating the PI3K/AKT/mTOR and TGF-β1/ Smads Signaling Pathways / X. Liu et al. *Drug Design, Development and Therapy.* 2021. Vol. 15. P. 871–887.

					162.01.06.00 000 ПЗ	Арк.
						55
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДОДАТКИ



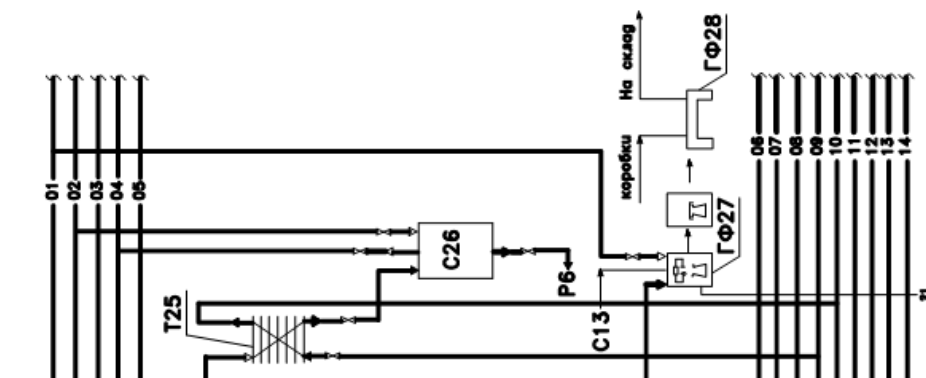


Таблица умовних позначень

Учебное задание	Используемые материалы
1. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
2. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
3. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
4. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
5. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
6. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
7. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
8. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
9. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
10. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
11. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
12. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
13. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны
14. Изготовление модели в технике «объемная аппликация»	Бумага, картон, ножницы, клей, краски, кисти, шаблоны

Перелік елементів схеми

Эксп. №	Наименование	Новичуевские	И.А.	Примечание
	С1	Вань		
	С2, С3, С4	Мирная	12	
	С11, С13			
	С15, С17			
	С18, С20			
	С22, С24			
	С25			
	С43	Малая	1	
	С45, С48	Мирная	2	
	С48	Воркутинск		
	Н7, Н16	Никос	1	
	Н610	Малая вешня		
	СД12	Шерстостроитель	1	
	С13	Эксперимент		
	Т19, Т25	Термопластичный	2	
	Ф21	Фаз-фазер		
	Т23	Регулярный поликарбонат	1	
		Выпаровка		
	Ф27	Роскопчатый флуорид	1	
	Ф28	СН4 полуларид	1	

[illegible]

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІНСТИТУТ ПІДВИЩЕННЯ КВАЛІФІКАЦІЇ СПЕЦІАЛІСТІВ ФАРМАЦІЇ
Кафедра фармацевтичної технології, стандартизації та сертифікації ліків



Сертифікат № 74

засвідчує, що

Подріз Кристина

22 травня 2025 року взяв(ла) участь у II Науково-практичній internet-конференції

**Фармацевтичні технології, стандартизація
та забезпечення якості лікарських засобів**

В. о. ректора НФаУ, д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

м.Харків



ІПКЄФ
НФДУ



Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет
Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації

Матеріали

*II Науково-практичної Internet-конференції
з міжнародною участю*

ФАРМАЦЕВТИЧНІ ТЕХНОЛОГІЇ, СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТА ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Харків, 22 травня 2025

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ВДОСКОНАЛЕННЯ ВИРОБНИЦТВА
ТАКСИФОЛІНУ ІЗ КУЛЬТУРИ ТКАНИН МОДРИНИ ОЛЬГІНСЬКОЇ***Подріз К. А., Січкара А. А., Криклива І. О.*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

podrezkristina04@gmail.com

Вступ. Однією із задач біотехнології є одержання діючих речовин лікарських засобів із культури тканин рослин. Застосування з цієї метою культур рослинних клітин та тканин має переваги у порівнянні з використанням плантаційної та дикорослої сировини: можливість цілорічного вирощування біомаси, незалежність від географічних та кліматичних факторів, стандартність та більш висока якість сировини [1].

Таксифолін (дигідрокверцетин, дигідрофлавонол) є важливим природним активним інгредієнтом, який, можуть виділяти з кореня модрини ольгінської. З огляду на його структуру, яка містить більше фенольних гідроксильних груп, таксифолін має різноманітну біологічну активність, включаючи антиоксидантну, протизапальну, антипроліферативну та антианафілактичну дію. Тому таксифолін має високий потенціал у використанні, наприклад, у складі дієтичних добавок для здорового харчування та лікарських засобів.

Таксифолін (5,7,3',4'-флаван-он-ол) належить до підкласу флаванолів флавоноїдів, які, у свою чергу, є класом поліфенолів.

Оскільки все більше країн дозволяють таксифоліну входити до переліку дозволених речовин в харчовій і фармацевтичній промисловості, попит на таксифолін також зростає, в той час як його виробництво далеке від задоволення потреб ринку. Тому дослідження щодо вдосконалення виробництва таксифоліну мають важливе практичне значення. Модрина є важливою деревною породою для навколишнього природного середовища. Тому дуже важливо вивчати нові альтернативи цим ресурсам і методи виробництва [1–4].

Мета дослідження – аналіз можливості створення однорідної та стабільної системи культивування калусу модрини за допомогою технології культивування тканин рослин, з'ясування впливу різних комбінацій гормонів на вміст таксифоліну в калусі, розробка технологічної схеми одержання таксифоліну за наявною в науковій літературі інформацією.

Методи дослідження. Аналіз і систематизація даних з одержання діючих речовин лікарських засобів і дієтичних добавок з культури тканин рослин.

Результати дослідження. В Україні випускаються різні дієтичні добавки з таксифоліном і порошок для харчової промисловості (компанія ТОВ «БіоФлавід») [5].

Вченими досліджувався матеріал модрини ольгінської (*Larix olgensis*). У дослідженні пагони модрини використані як експлантатне джерело індукції калусу, а система культивування калусу модрини була створена за допомогою технології культивування рослинних тканин. Ці дані показали, що середовище Мурасиге-Скуга з гормонами 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою, 6-бензиламіноаденином та агоністом-модулятором кінетином демонструє високий потенціал індукції калусу модрини, а швидкість індукції досягала 83,4%. Крім

того, було також виявлено, що фотоперіод також мав великий вплив на утворення калусу [2].

Розроблена технологічна схема включає стадії:

1. Приготування розчину етанолу 70 %.
2. Приготування розчину луґу.
3. Приготування поживного середовища.
4. Інокуляція суспензії.
5. Культивування у біореакторі.
6. Відділення біомаси від культуральної рідини
7. Ліофільне висушування
8. Екстракція вторинних метаболітів з біомаси
9. Виділення таксифоліну.

Екстракт з попередньої стадії концентрують під зниженим тиском, потім розчиняють в гарячій воді при 80°C та швидко проводять кристалізацію при 4 °C. Після цього його перекристалізують та сушать, отримуючи світло-жовтий порошок екстракту, багатого на таксифолін.

Таксифолін надходить на фасування та пакування.

Висновки. Проведений аналіз асортименту продукції на ринку України, що включає таксифолін (дигідрокверцетин): дієтичні добавки і порошок для харчової промисловості. На сьогодні таксифолін набуває все більшого попиту через низку переваг. Дигідрокверцетин (ДГК, Таксифолін, Dihydroquercetin) – потужний антиоксидант, унікальний природний акцептор вільних радикалів кисню, капіляротектор, кардіотектор, мембраностабілізатор, підвищує фізичну та розумову витривалість, стимулює працездатність, зміцнює імунітет, допомагає при перевтомі очей.

Розглянуто спосіб одержання експлантату з модрина ольгінської, наведено промислову технологію і складено технологічну схему виробництва таксифоліну.

Список використаних джерел.

1. Food ingredients and foodmade with plant cell and tissue cultures: State-of-the art and future trends / Geraldine Gubser et al. Eng Life Sci. 2021. Vol. 21. P. 87–98.
2. Establishment of callus induction system, histological evaluation and taxifolin production of Larch / X. Liu et al. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2021. Vol. 147. P. 467–475.
3. Здорик О. А., Наконечна І. Ю., Георгіянц В. А. Пошук альтернативних природних джерел дигідрокверцетину. Хімія природних сполук : матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 30–31 жовт. 2012 р. : Укрмедкнига, 2012. С. 20–21.
4. (+)-taxifolin (CHEBI:17948). URL: <https://www.ebi.ac.uk> (дата звернення: 10.04.2025).
5. Антиоксидант TAXIFOLIN для харчової промисловості URL: <https://taxifolin.pro/> (дата звернення: 10.04.2025).

250	II Науково-практична Internet-конференція з міжнародною участю	
	Маслов О. Ю., Колісник С. В., Голік М. Ю., Осолодченко Т. П.	183
	ПЕРСПЕКТИВИ ВПРОВАДЖЕННЯ eSTD В УКРАЇНІ ЯК ІНСТРУМЕНТУ ДІДЖИТАЛІЗАЦІЇ РЕГУЛЯТОРНИХ ПРОЦЕДУР У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ГАЛУЗІ	
	Михайловська Л., Сахнацька Н.	184
	ПЛАТФОРМА MOODLE – ПЕРСПЕКТИВНА СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ДИСТАНЦІЙНОГО НАВЧАННЯ В УКРАЇНІ	
	Міщенко В. І.	186
	ЗМЕНШЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ВІДХОДІВ: СТРАТЕГІЇ ПОВТОРНОГО ВИКОРИСТАННЯ ТА ПЕРЕРОБКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ	
	Мороз С. Г., Подгайний Г. Я.	188
	КОНЦЕПЦІЯ ЕКОЛОГІЧНОГО МЕНЕДЖМЕНТУ НА ПІДПРИЄМСТВАХ	
	Ніколаєва А.	190
	ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ ЕКСТЕМПОРАЛЬНОГО ЛОСЬЙОНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АКНЕ	
	Олійник С. В., Вишневецька Л. І., Ковальова Т. М., Семченко К. В.	191
	ЗАСТОСУВАННЯ СУЧАСНИХ КОНЦЕПЦІЙ ТА ЗАСОБІВ РЕАЛІЗАЦІЇ В ОСВІТНЬОМУ ПРОЦЕСІ	
	Омельченко П. С.	193
	РОЗРОБКА СКЛАДУ, ТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА ОЦІНКА РЕКТАЛЬНОГО ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНОГО ЗАСОБУ З АМІОДАРОНУ ГІДРОХЛОРИДОМ	
	Перебудов В. О., Гладішев В. В., Бессараб Г. І.	195
	ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ВДОСКОНАЛЕННЯ ВИРОБНИЦТВА ТАКСИФОЛІНУ ІЗ КУЛЬТУРИ ТКАНИН МОДРИНИ ОЛЬГІНСЬКОЇ	
	Подріз К. А., Січкара А. А., Криклива І. О.	197
	ШЛЯХИ ТА МЕХАНІЗМИ СТАБІЛІЗАЦІЇ ДОКСИЦИКЛІНУ ПРИ РОЗРОБЦІ ПАРЕНТЕРАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ	
	Попова М. Е., Салій О. О., Страшний В. В.	199
	ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗЧИННОСТІ ТА СТАБІЛЬНОСТІ РОЗЧИНІВ ДОКСИЦИКЛІНУ ДЛЯ ЗОВНІШНЬОГО ЗАСТОСУВАННЯ	
	Попова М. Е., Салій О. О., Страшний В. В.	201
	ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ ТАДЖИКИСТАНА В ТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА	
	Рахимова М. Х., Мусозода С. М.	203
	АКТУАЛЬНІСТЬ ВПРОВАДЖЕННЯ ЕКОЛОГІЧНОГО МЕНЕДЖМЕНТА В ДІЯЛЬНІСТЬ СУБ'ЄКТІВ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО РИНКУ	