

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЛЬВІВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»**

КРВАВИЧ АННА СЕРГІЇВНА

УДК 66.061.34+581.143.6

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

05.17.08 - процеси та обладнання хімічної технології

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Львів – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор хімічних наук, професор
Новіков Володимир Павлович,
Національний університет "Львівська політехніка»
Міністерства освіти і науки України
завідувач кафедри технології біологічно активних
сполук, фармації та біотехнології

Офіційні опоненти - доктор технічних наук, професор
Зав'ялов Володимир Леонідович,
Національний університет харчових технологій
Міністерства освіти і науки України
завідувач кафедри процесів і апаратів харчових
виробництв

доктор технічних наук, професор
Ведь Валерій Євгенович,
Національний технічний університет «Харківський
політехнічний інститут»
Міністерства освіти і науки України
в.о. завідувача кафедри інтегрованих технології,
процесів та апаратів

Захист відбудеться «17» травня 2016 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.052.09 у Національному університеті "Львівська політехніка" Міністерства освіти і науки України (79013, Львів-13, пл. Св. Юра 9, навчальний корпус ІХ, ауд. 214).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету "Львівська політехніка" Міністерства освіти і науки України за адресою:
79013, м.Львів, вул. Професорська,1.

Автореферат розісланий «16» квітня 2016 р.

*Учений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 35.052.09
д.т.н, професор*



Я.М.Гумницький

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним із актуальних завдань сучасної фітохімії є пошук нових екологічно чистих сировинних джерел біологічно активних речовин (БАР), а також оптимізація процесів їх отримання.

Традиційно БАР рослин отримують на основі використання природної сировини. Найчастіше використовують біомасу дикорослих лікарських рослин, частину отримують з полів спеціалізованих господарств. Широке використання рослин, для отримання БАР, призвело до стрімкого скорочення їх в природі. Деякі з них відносяться до рідкісних і зникаючих видів. Однією з таких лікарських рослин є косарика черепитчаста (*Gladiolus imbricatus*) – поступово зникають з природних угруповань на території нашої країни, у зв'язку з чим внесений до останнього видання Червоної книги України зі статусом "вразливий". Досягнення останніх років в галузі культури органів і тканин продемонстрували значні перспективи клітинних технологій, як в розмноженні цінних генотипів, так і в одержанні БАР. Основна привабливість використання культури клітин в тому, що це є альтернативним способом отримання сировини для різних галузей промисловості. Однак дані про використання біотехнологічних методів в розмноженні та одержанні БАР *G.imbricatus* в літературі не достатньо описані і суперечливі.

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

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тема дисертації відповідає науковому напрямку кафедри. Дисертаційна робота включає дослідження, виконані згідно плану науково-дослідних робіт кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» в межах науково-дослідних тем «Математичне моделювання мікробіологічних процесів» (№ держреєстрації 0107U009415), і «Дослідження хімічного складу та вивчення фармакологічних властивостей рослин Карпатського регіону» (№ держреєстрації 0107U009425), а також державної науково-технічної програми 03.06. «Нові екологічно безпечні лікувальні засоби».

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

Для досягнення цього необхідно вирішити такі основні завдання:

- проаналізувати літературні дані;
- дослідити фізико-хімічні характеристики цільових компонентів;

- дослідити механізм вилучення цільових компонентів з метою визначення лімітуючої стадії процесу;
- вивчити кінетичні закономірності процесу екстрагування;
- підібрати необхідні математичні моделі процесу екстрагування, за допомогою яких визначити кількісні параметри, необхідні для розробки технологічної схеми і які дали б можливість прогнозувати процес у реальних умовах;
- дослідити та розробити технологію культивування *G.imbricatus*;
- дослідити вплив стерилізуючих агентів, виду експлантів та фітогормонів на вихід калусної біомаси;

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

Предмет досліджень – лікарська рослинна сировина *G. imbricatus*, отримана з природних джерел проростання та калусна біомаса *G. imbricatus*, культивована в умовах *in vitro*.

Методи дослідження: дослідження процесу екстрагування виконувалось в апараті з мішалкою та в апараті Сокслета; накопичення біомаси *G. imbricatus* проводили поверхневим та глибинним (суспензійним) культивуванням асептичних експлантів *G. imbricatus*. Для визначення хімічного складу БАР в одержаних екстрактах з дикорослої сировини та калусної біомаси використовували гравіметричний, спектроскопічний аналіз, тонкошарову та високоефективну рідинну хроматографію, хромато-мас-спектроскопію. Для обробки експериментальних даних та розрахунків застосовували математичне моделювання з використанням програмних пакетів (MathCAD, Excel, Visio).

Наукова новизна роботи. Введено в культуру *in vitro* і отримано високопродуктивну калусну культуру *G. imbricatus* та встановлено оптимальні умови культивування *G. imbricatus*, що забезпечило підвищення виходу БАР та зменшення часу культивування.

Встановлено механізм екстрагування (лімітуючу стадію) та кінетичні закономірності процесу, вибрано необхідні математичні моделі процесу екстрагування, перевірено їх на адекватність, запропоновано умови найбільш ефективного вилучення цільових компонентів (температурний режим, діаметр частинок біомаси, вибрано оптимальний екстрагент та ін.), визначено константи екстрагування, знання яких необхідне для прогнозування процесу екстрагування в умовах виробництва.

Встановлено, що модифіковане живильне середовище Мурасіге і Скуга найкращим чином забезпечує процеси життєдіяльності експлантів *G. imbricatus* і накопичення у калусі БАР, а також вміст та співвідношення фітогормонів у середовищі впливає на накопичення клітинної біомаси *G. imbricatus* і кількість БАР в ній.

Вперше встановлений якісний та кількісний склад екстрактів з дикорослої рослини та калусної маси *G. imbricatus*.

Практичне значення отриманих результатів. Уперше пропонується використовувати клітинну біомасу *G. imbricatus* в якості джерела БАР.

Вперше встановлені оптимальні параметри процесу культивування у лабораторному ферментері SIMAX (Czech Republic) об'ємом 60 л (рН – 6,0, температура вирощування – 28°C, концентрація розчиненого кисню 60 –70%), що дозволяє одержати екстракт з максимальним вмістом комплексу БАР.

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

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

Фрагменти роботи впроваджено у навчальний та науковий процеси Національного університету «Львівська політехніка», Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С.З. Гжицького, Інституту органічної хімії НАН України, Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України та ТзОВ «Технолаб» (акти впровадження від 14.10.2015 р., 15.11.2015 р., 23.11.2015 р., 21.02.2016 р. та 23.02.2016 р., відповідно).

Особистий внесок здобувача полягає у детальній обробці поставлених завдань, проведенні літературного пошуку та аналітичній обробці наукової літератури, плануванні та виконанні експериментальної частини, здійснено визначення кінетичних констант для різних умов процесу екстрагування, розробці технологічної схеми процесу. Постановка завдань, планування, аналіз та обговорення результатів дослідження, формулювання основних положень та висновків роботи здійснювались разом з науковим керівником д.х.н., проф. Новіковим В.П. Вибір та опис математичної моделі екстрагування, його кінетичних параметрів проведено сумісно з д.т.н., проф. Семенишиним Є.М.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи доповідались на: Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (Харків, 2011), XVII Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2013), Національній науково-технічній інтернет-конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (Львів, 2013), XX International Scientific And Practical Conference “Actual Questions Of Development of New Drugs”, (Харків, 2013), міжнародній науково-практичній конференції молодих науковців «Проблеми та перспективи досліджень рослинного світу», (Ялта, 2014), II International Scientific Conference «Pharm. Sciences in XXI Century», (Georgia, 2014), IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття», (Київ, 2015).

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

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, 6 розділів, висновків, списку використаної літератури, який включає 137 джерел та додатків. Обсяг роботи становить 120 сторінок (без списку літератури). Робота ілюстрована 27 таблицями і 30 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність дисертаційної роботи, визначено мету та завдання досліджень, показано наукову новизну і практичне значення отриманих результатів.

У першому розділі представлено аналіз літературних даних, який показав основні проблеми одержання БАР, зменшення сировинної бази лікарських рослин та перспективні нові біотехнологічні і фітохімічні методи одержання вторинних метаболітів лікарських рослин в культурі *in vitro*. Наведено інформацію щодо основ екстрагування цільових компонентів з рослинної сировини, розглянуті механізми та закономірності екстракційного процесу, різні методи та можливі способи його інтенсифікації.

У другому розділі описано методики дослідження кінетики екстрагування БАР з частинок сировини різного діаметру; методики культивування біомаси *G. imbricatus*; методики ідентифікації БАР в екстрактах, отриманих з дикорослого виду та калусної маси *G. imbricatus*.

В третьому розділі описані результати експериментів по введенні в культуру *in vitro* *G. imbricatus*, отримання асептичних експлантів, підбір поживного середовища та параметрів калусогенезу *G. imbricatus*.

Для отримання асептичних проростків насіння *G. imbricatus* стратифікували у розчині гіберелової кислоти, протягом однієї доби, стерилізували 98%-ним етиловим спиртом та різними стерилізаторами (розчинами гіпохлориду, перексиду водню і сулеми) та промивали в трьох склянках дистильованої води. Насіння пророщено на світлі (2000 лк) з періодом 16 год/добу при температурі +22°C, вологості 80% (рис. 1).



Рис. 1. Пророщене насіння *G. imbricatus* на агаризованому поживного середовища Мурасіге і Скуга.

Для індукції калусогенезу використано експланти кореневого, листкового та черешкового походження *G. imbricatus*, які поміщали на агаризоване ЖСМС, доповнене фітогормонами: індолілоцтовою кислотою (ІОК), кінетином (Кін), 1-

нафтилоцтовою кислотою (НОК), гібереловою кислотою (ГК) та 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою (2,4-Д). Культури інкубували на світлі при +25-26,5°C. Їхнє субкультивування проводили через кожні 3 тижні. Використано три варіанти поживного середовища Мурасіге і Скуга. Результати наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив фітогормонів на ріст калусу *Gladiolus imbricatus* протягом 5 тижнів

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

На рис.2 показано ознаки росту калусу, яке спостерігали на 15-20 день культивування. Калус був світлий, м'якої консистенції і відрізнявся високою інтенсивністю росту.



Рис.2. Другий пасаж калусу *Gladiolus imbricatus*



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

У четвертому розділі представлено дослідження кінетики процесу екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду та калусу *G. imbricatus* при різних умовах. Проведені експерименти дали можливість встановити механізм процесу екстрагування. На основі експериментальних даних перевірено на адекватність математичні моделі та визначено кінетичні коефіцієнти, що дало можливість прогнозувати перебіг процесу екстрагування в реальних умовах.

Для встановлення механізму екстрагування цільових компонентів з ЛРС, а також рослини культивованої в умовах *in vitro*, було використано просту і надійну методику, яка використовується для різних умов екстрагування цільових компонентів з пористих структур та різноманітних пористих об'єктів. Ця методику

базується на аналізі кінетики екстрагування з можливим варіантом хімічної взаємодії, на основі якого одержано рівняння (1).

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

Рівняння (1) в умовах, коли критерій хімічної взаємодії $\varepsilon = \infty$ та критерій Біо $Bi = \infty$, що відповідає внутрішньо дифузійному механізму, приводиться до виду

$$\Phi = \frac{t}{T} = 1 - 3 \cdot \phi_0^2 + 2 \cdot \phi_0^3 \quad (2)$$

Для встановлення механізму екстрагування проведені експерименти по встановленню залежності $C = f(t)$ з наступним визначенням $\phi_0 = f(t)$. На рис. 4 показані залежності кінетики екстрагування цільових компонентів з дикорослого виду *G. imbricatus*.

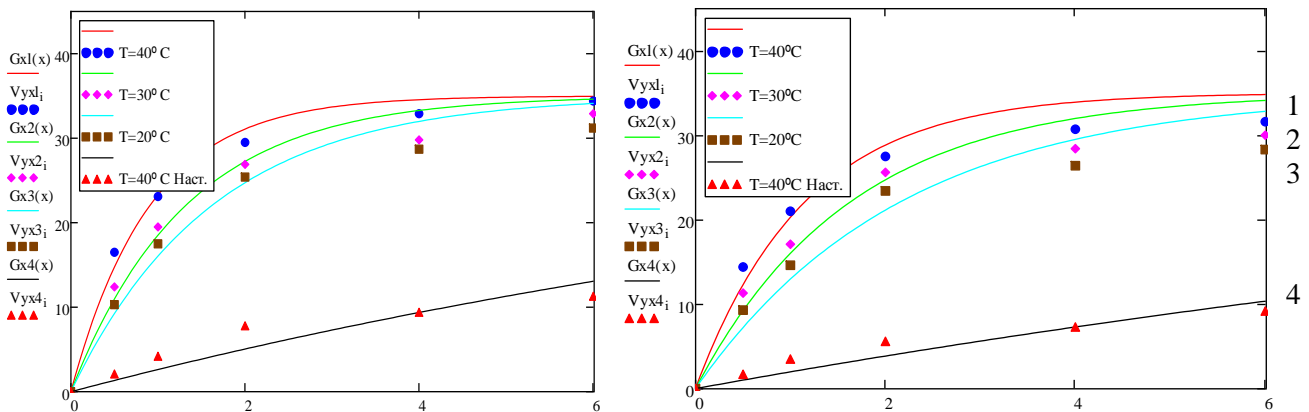


Рис. 4. Залежності $C_1 = f(t)$ для а) $d_c = 2,5$ мм та б) $d_c = 4,0$ мм (при перемішуванні 1- $T=40^\circ\text{C}$; 2- $T=30^\circ\text{C}$; 3- $T=20^\circ\text{C}$; при настоюванні 4- $T=40^\circ\text{C}$)

Згідно рівняння (2), якщо припустити внутрішньо дифузійний механізм, між величинами $\Phi = 1 - 3\phi_0^2 + 2\phi_0^3$ і часом t повинна існувати лінійна залежність $\Phi = f(t)$. Тому для встановлення лімітуючої стадії необхідна постановка експерименту з встановленням залежності $\Phi = f(t)$. На рис. 5 показано залежності $\Phi = f(t)$ для екстрагування в умовах перемішування. Значення Φ , які відповідають відповідним інтервалам часу t визначали з рівняння (2), де безрозмірний радіус зони вилуговування $\phi_0 = \frac{r_0}{R}$ визначався з рівняння матеріального балансу, приведенного до виду (3)

$$\phi_0 = \sqrt[3]{(1 - C_1 / \beta)} = f(t) \quad (3)$$

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

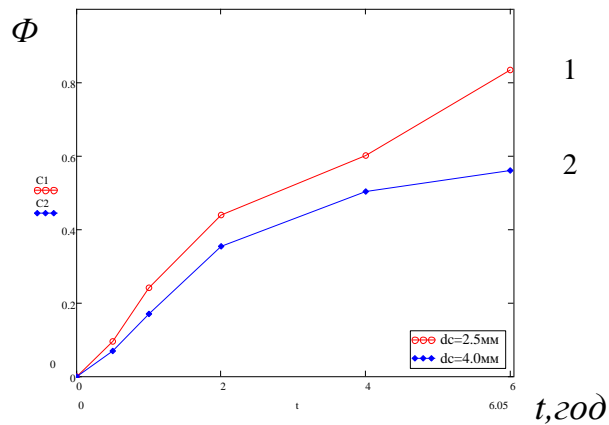


Рис. 5. $\Phi = f(t)$ в апараті з мішалкою при $T = 40^\circ \text{C}$ (1- $d_c=2,5\text{мм}$; 2- $d_c=4,0$)
Вибір екстрагенту здійснювали шляхом розрахунку виходу екстрактивних речовин та суми флавоноїдів (табл. 2).

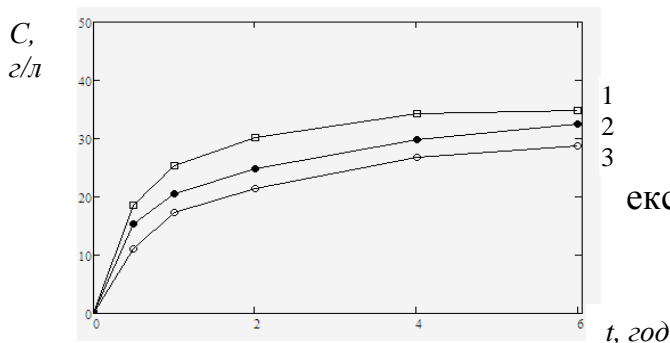
Таблиця 2

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

Екстрагент	Вміст сполук у перерахунку на повітряно-суху сировину, %	
	Екстрактивні речовини	Сума флавоноїдів (в перерахунку на кверцетин)
H_2O	$31,92 \pm 2,05$	$1,17 \pm 0,12$
40%- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	$33,43 \pm 2,12$	$3,34 \pm 0,11$
50%- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	$29,21 \pm 1,77$	$3,75 \pm 0,14$
60%- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	$29,86 \pm 1,75$	$4,31 \pm 0,18$
70%- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	$34,93 \pm 3,02$	$5,73 \pm 0,17$
80%- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	$32,96 \pm 1,30$	$4,61 \pm 0,20$
96%- $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	$19,47 \pm 1,57$	$2,86 \pm 0,19$

Таким чином, як оптимальний екстрагент, який вилучає максимальну кількість БАР був обраний спирт етиловий 70%.

Експериментальні дослідження кінетики екстрагування цільового компоненту в апараті Сокслета. Проведено експериментальні дослідження впливу розміру частинок на швидкість екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* в апараті Сокслета. На рис. 6 приведені кінетичні залежності екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* у отримані при температурі кипіння 70% розчину етанолу для трьох фракцій досліджуваного матеріалу.



1- $d=1.6\text{ мм}$; 2 - $d=2.5\text{ мм}$; 3 - $d=4\text{ мм}$

Рис. 6. Кінетичні залежності екстрагування цільового компоненту з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* при температурах кипіння в апараті Сокслета

Для визначення коефіцієнту дифузії при екстрагуванні цільових компонентів з дикорослої маси використовували рівняння Г.А. Аксельруда виду :

$$\frac{C_p - C_1}{C_o - C_n} = \sum_{n=1}^{\infty} B_n \cdot e^{-\mu^2 n^2 \tau} \quad (4)$$

де $B_n = \beta \cdot A_n$; $\tau = \frac{D \cdot t}{R^2}$, C_p , C_1 , C_n – рівноважна, біжуча і початкова концентрації в розчині, C_o – початкова концентрація в твердій фазі, R – характерний розмір (радіус кулі).

Оскільки рівняння (4) має вигляд степеневі залежності, то обмежуючись в правій частині рівняння першим членом ряду, отримаємо після логарифмування.

$$\ln\left(\frac{C_p - C_1}{C_o}\right) = \ln B - \mu^2 \cdot \frac{D}{R^2} t \quad \text{або} \quad y = a_0 + a_1 \cdot t \quad (5)$$

На рис. 7 наведені дослідні дані у вигляді функції (5), з якого видно, що при $t \geq t_{кр} = 1$ год., всі криві мають лінійний характер, тобто згідно теоретичних уявлень спостерігаємо регулярний режим.

Для визначення невідомих коефіцієнтів a_0 і a_1 , що входять в рівняння (5) використовуємо універсальну математичну систему MathCAD. Дослідні дані в області регулярного режиму апроксимуємо лінійною залежністю за допомогою функцій $\text{slope}(VX, VY)$ та $\text{intercept}(VX, VY)$. Отримані числові значення коефіцієнтів a_0 і a_1 для досліджених фракцій зведені в табл. 3.

Повертаючись до рівняння (5) одержимо $B = e^{a_0}$ $D = -a_1 \frac{R^2}{\mu^2}$ (6)

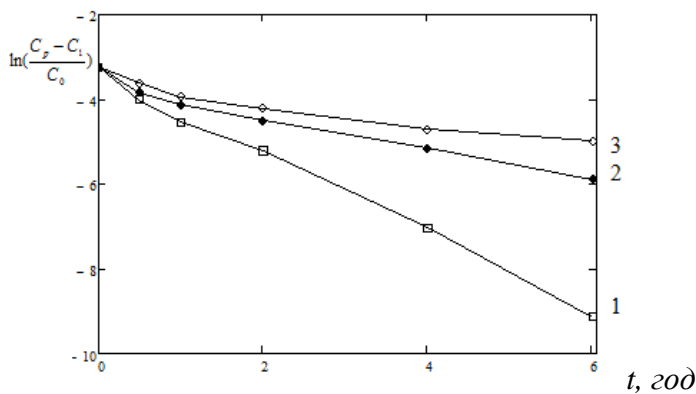


Рис. 7. Залежність $\ln\left(\frac{C_p - C_1}{C_o}\right) = f(t)$ в умовах екстрагування з частинок дикорослого виду *G. imbricatus*

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

В умовах рівноваги β розраховується за рівнянням

$$\beta = \frac{C_p}{C_o - C_p} \quad (7)$$

Для даних експериментів $\beta = 0.495$.

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

$$A = \frac{6}{\mu^2 + 9\beta(1 + \beta)} \quad (8) \quad \text{tg } \alpha = \mu^2 \cdot \frac{D}{R^2} \quad (9) \quad \text{ctg}(\mu) = \frac{1}{\mu} + \frac{\mu}{3\beta} \quad (10)$$

μ – корінь характеристичного рівняння (10).

Числове значення μ визначене з рівняння (10) за допомогою функції $\text{root}(f(x),x)$ в системі MathCAD і для $\beta=0,495$ дорівнює $\mu=0,36$. Значення коефіцієнтів B та D , розраховані за рівнянням (6) і приведені в табл. 3.

Таблиця 3

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

№	Фракція	a_0	a_1	B_p	$D \cdot 10^{10} \text{ м}^2/\text{с}$
1	$d=1,6 \text{ мм}$	-0453	-0.027	0.636	0,369
2	$d=2,5 \text{ мм}$	-0472	-0.015	0.623	0,503
3	$d=4,0 \text{ мм}$	-0,325	-0.011	0.723	0,942

Одержані таким чином коефіцієнти дифузії було використано для встановлення відповідності кінетичних залежностей шляхом співставлення розрахункових та дослідних даних. Розрахунок біжучої концентрації в розчині C_1 проводили за формулою (11):

$$C_1 = C_p - C_0 \cdot B_p \cdot e^{-\frac{\mu^2}{R^2} D \cdot t} \quad (11)$$

Таблиця 4

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

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

Аналіз результатів наведених в табл. 4 показав, що значення концентрацій, одержаних експериментальним шляхом задовільно узгоджуються з розрахунковими, це дає можливість використовувати рівняння Г.А.Аксельруда для прогнозування кінетики для інших об'єктів, пов'язаних з процесами екстрагування цільових компонентів.

У п'ятому розділі описані результати експериментальних досліджень кінетики процесу екстрагування цільових компонентів з калусної біомаси *G. imbricatus*, вирощеної в умовах *in vitro*.

В результаті культивування культури калусу у рідкому рухомому ЖСМС утворювалась гетерогенна суспензія, яка містила агрегати клітин від 1 до 4 мм. Далі культуральну рідину фільтрували, через фільтрувальний папір використовуючи вакуум-фільтр, сушили у вакуумній сушильній шафі при $40 \pm 1^\circ\text{C}$ до сталої маси.

Для екстрагування висушений калус просіювали через сита 1-6,3мм та отримували фракції 1,6; 2,5 та 4мм. Екстрагували в апараті Сокслета та проводили фотохімічний скринінг.

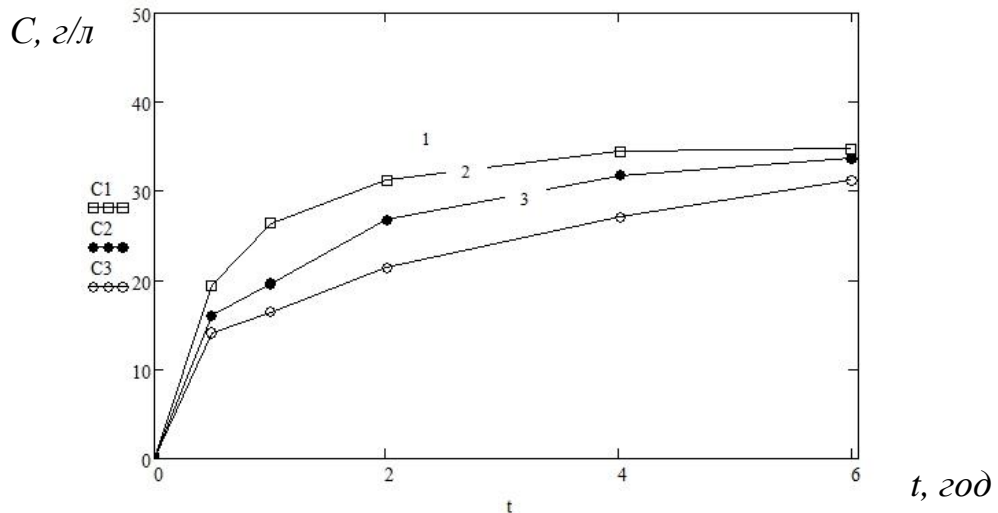


Рис. 8. Кінетичні залежності екстрагування цільового компонента з частинок калусу *G. imbricatus* при температурах кипіння в апараті Сокслета
 1 – $d=1.6$ мм; 2 – $d=2.5$ мм; 3 – $d=4$ мм

Аналіз експериментальних досліджень кінетики екстрагування із частинок калусу *G. imbricatus*, культивованого в умовах *in vitro* показав вплив розміру частинок на кінетику процесу (залежності 1,2,3) (рис. 8). Аналіз цих залежностей показав, що зменшення розміру частинок інтенсифікує процес. Збільшення розміру частинок призводить до сповільнення швидкості процесу екстрагування, що показує вплив на процес екстрагування стадії внутрішньо дифузійного вилучення цільових компонентів.

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

Були проведені експериментальні дослідження на предмет порівняння кінетичних закономірностей та виходу цільових компонентів із екстрактів дикорослого виду та калусу *G. imbricatus*, культивованого в умовах *in vitro*, при одних і тих же умовах екстрагування. З цією метою, дослідження кінетики проводили в апараті з мішалкою при різних температурах та розмірах частинок. Визначення концентрації, яка відповідала моментам часу t здійснювали за стандартною методикою. Результати досліджень наведені на рис. 9.

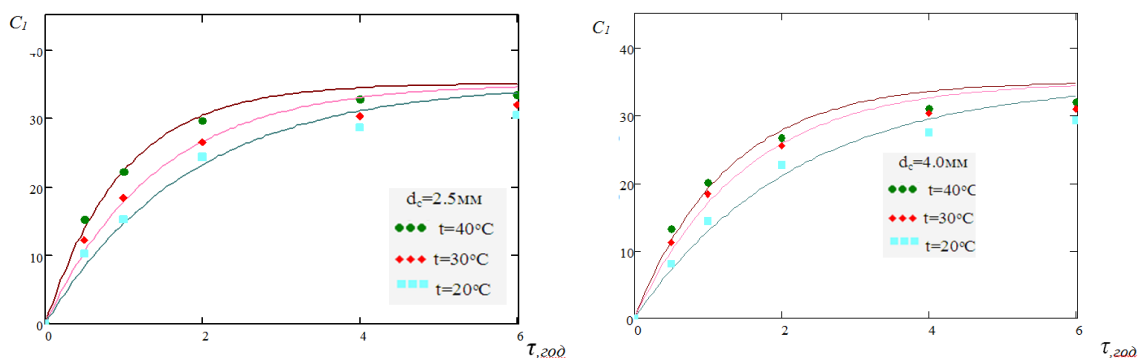


Рис. 9. Кінетичні криві $C_1 = f(\tau)$ кінетики екстрагування з калусу *G. imbricatus*

Аналіз результатів експериментальних досліджень кінетики екстрагування цільових компонентів з частинок дикорослого виду *G. imbricatus* і культивованого в умовах *in vitro* показав, що другим важливим фактором, який сприяє інтенсифікації процесу вилучення цільових компонентів являється температура і співвідношення фаз (Т/Р). Стосовно вилучення цільових компонентів, то вони у кількісному і якісному відношенні близькі між собою, що дає можливість стверджувати, що глибинне культивування *G. imbricatus* в умовах *in vitro*, є найбільш економічно вигідним процесом одержання екологічно чистої біомаси. Таким чином культивування *G. imbricatus* в умовах *in vitro* відповідає вимогам сьогодення.

Таблиця 5.

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

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

Дослідження компонентного складу *G. imbricatus* та одержаної калусної маси. Вперше було визначено кількісний вміст фенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, катехінів, аскорбінової кислоти, органічних кислот та полісахаридів в досліджуваній сировині (табл. 5).

За допомогою хромато-мас-спектрометричного аналізу нами одержано піки, які свідчать про наявність наступних груп БАР (рис. 10,11,12). Ідентифікацію сполук проводили шляхом порівняння одержаних мас-спектрів хроматографічного піку з мас-спектрами еталонних сполук з найбільшою вірогідністю ідентифікованих програмою розпізнавання на масиві спектрів бази даних. Кількісний вміст розраховували за відношенням площі піків компонентів до суми площ усіх піків на хроматограмі (метод нормалізації)¹.

¹ Автор вдячний проф. П.Вечорику з університету Ополь (Польща) за можливість і допомогу при проведенні цих досліджень.

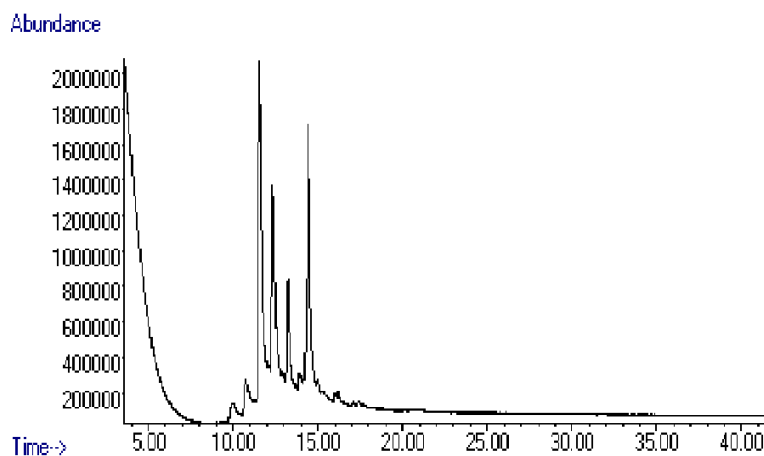


Рис.10 - Хроматограма хлороформного екстракту дикоростучого виду *G. imbricatus*.

При хроматографуванні екстракту *G. imbricatus* були виявлені пальмітинова (10,8%), лауринова (29,0%) жирні кислоти, мірістин (19,8%), (2S,3R)-2-децил-3-(5-метилгексил)оксиран (3,3%), ейкозан (3,4%), 1-[п-Бромфеніл]-4-нітро-1,3-бутадиєн (2,6%), 1,2-біс(гексилокси)-4-нітробензин (5,1%), піперазин (3,0%), нонакозан (22,5%) та невизначеної речовини (0,5%) (рис. 10).

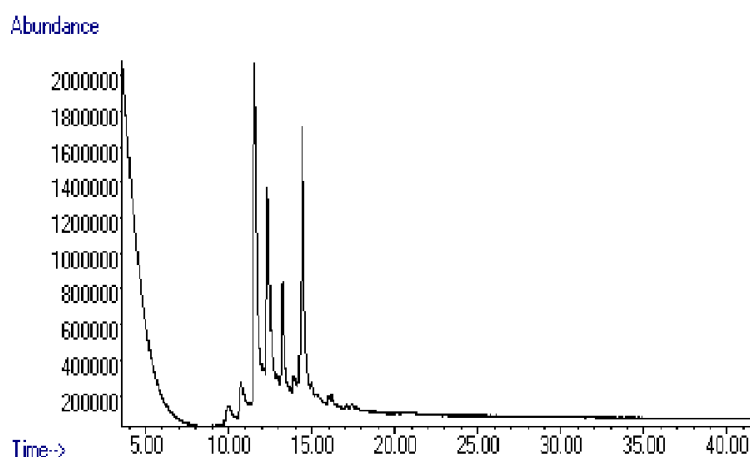


Рис.11 - Хроматограма хлороформного екстракту калусної біомаси *G. imbricatus*.

При хроматографуванні екстракту калусу *G. imbricatus* були виявлені 2-гексилдеканол-1-ол (2,7%), лауринова (4,1%), лінолелаїдинова (44,8%), олеїнова (4,1%) кислоти, трибутил ацетил цитрат (5,4%), фарнезол (4,6%), нонакозан (3,8%), 1,9-ейкозадієн (9,0%), 1,13-тетра декадієн (3,1%), 1-нонадецен (4,4%), ейкозан (5,9%), інден (4,0%) та невизначених речовин (4,1%) (рис. 11).

Оскільки аналіз груп БАР показав наявність флавоноїдів, які мають широкий спектр біологічної дії, був проведений аналіз для їх ідентифікації. В результаті тонкошарової хроматографії були виявлені : галангін, 3-гідроксибензойна кислота, кверцетин, кемферол, 3,4-гідроксибензойна кислота та рутин, що відповідали відповідним показникам стандартних зразків за значенням Rf.

Для підтвердження наявності флавоноїдів у рідкому екстракті з дикорослого виду та культивованого в умовах *G. imbricatus in vitro* на основі використання методу вискоєфективної рідинної хроматографії вперше було виявлено 19 речовин

фенольної природи, з яких ідентифіковано 6, серед яких: кавова кислота (3), морін (7), лютеолін (8), кемферол (10), галангін (14), піноцембрин (17) (рис.12).

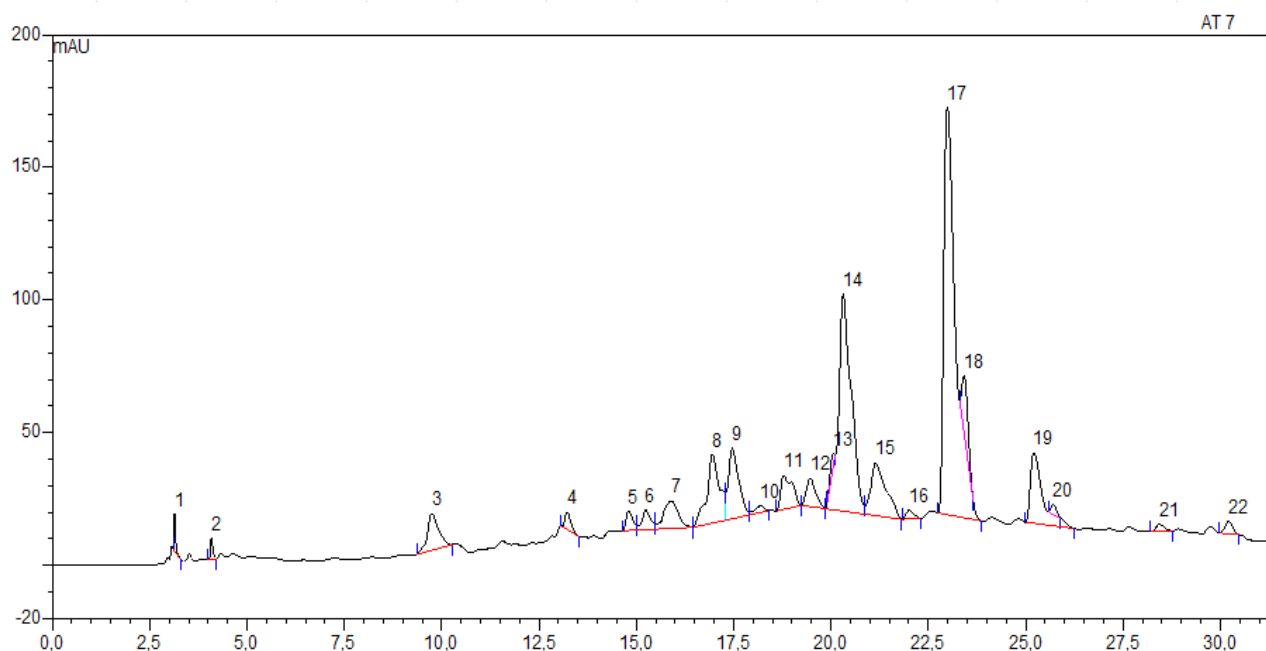


Рис. 12. Схема хроматограми фенольних сполук калусу *G. imbricatus*

Також було досліджено можливість вилучення окремих фракцій з екстракту калусної біомаси *G. imbricatus* методом надкритичної флюїдної екстракції.

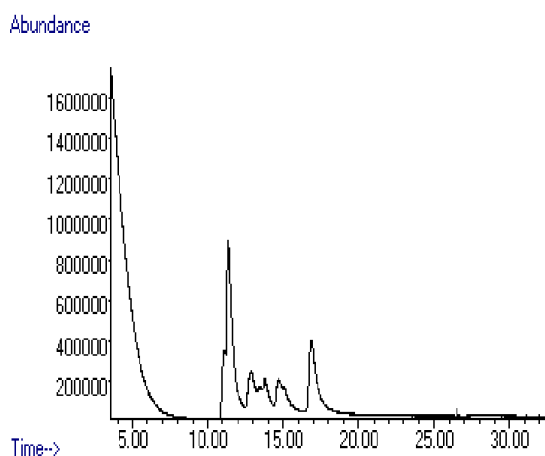


Рис. 13. Хроматограма CO₂-екстракту біомаси *G. imbricatus*

Порівнюючи дані з раніше отриманими можна зробити висновок, що надкритичною флюїдною екстракцією можна вилучити інший діапазон компонентів екстракту (органічні кислоти та їх амід), проте вилучення цільових компонентів краще проводити водно-спиртовою сумішшю.

У шостому розділі розглядається питання пов'язані з розробкою складного технологічного процесу одержання БАР з культивованої біомаси *G. imbricatus*. Даний процес є надзвичайно складним, оскільки здійснюється не з рослинної сировини безпосередньо, а з культури клітин. Наведена технологія одержання БАР з культивованої біомаси *G. imbricatus*. Проведено суспензійне культивування біомаси

G. imbricatus в лабораторних умовах у ферментері, обладнаним термометром, барботером, магнітною мішалкою при 24-28⁰С, відносної вологості повітря 80-85%, на агаризованому ЖСМС з фітогормонами НОК (0,5 мг/л), ІОК (3,0 мг/л), кінетин (0,5 мг/л) при постійному перемішуванні Суспензійну культуру ініціювали з глобулярних калусів крихкої структури, одержаних поверхневим методом. Посівний матеріал брали в кількості 10% від об'єму живильного середовища. (рис. 14-16).

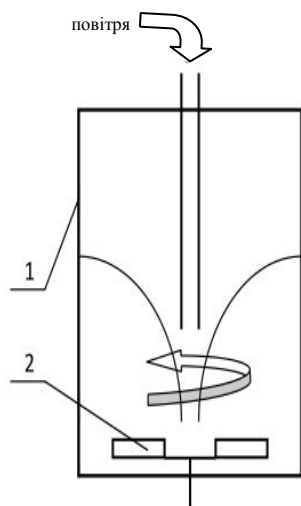


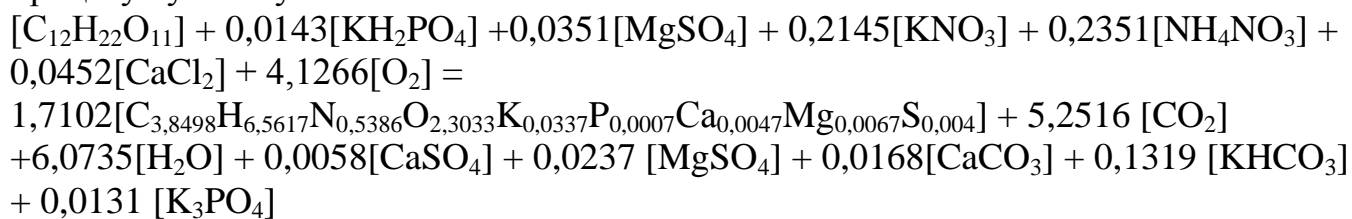
Рис. 14. Схема реактора

Рис. 15. Лабораторна установка

Рис. 16. Біореактор

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

Для масштабування процесу розраховано інтегральне стехіометричне рівняння процесу культивування:



В результаті матеріальних та технологічних розрахунків та даних, отриманих в лабораторних умовах, встановлено, що для промислового культивування доцільно використовувати глибинний, аеробний, напівбезперервний метод вирощування біомаси, оскільки він дозволяє одержати екстракт з культури клітин рослин з максимальним вмістом комплексу БАР.

На рис. 17. показані принципові технологічні схеми, які включають стадії: вирощування посівного матеріалу, приготування живильного середовища Мурасіге-Скуга, суспензійне культивування біомаси *G. imbricatus*, фільтрування культуральної рідини, сушіння одержаної біомаси, екстрагування БАР з біомаси *G. imbricatus*, розлив та фасування екстракту.

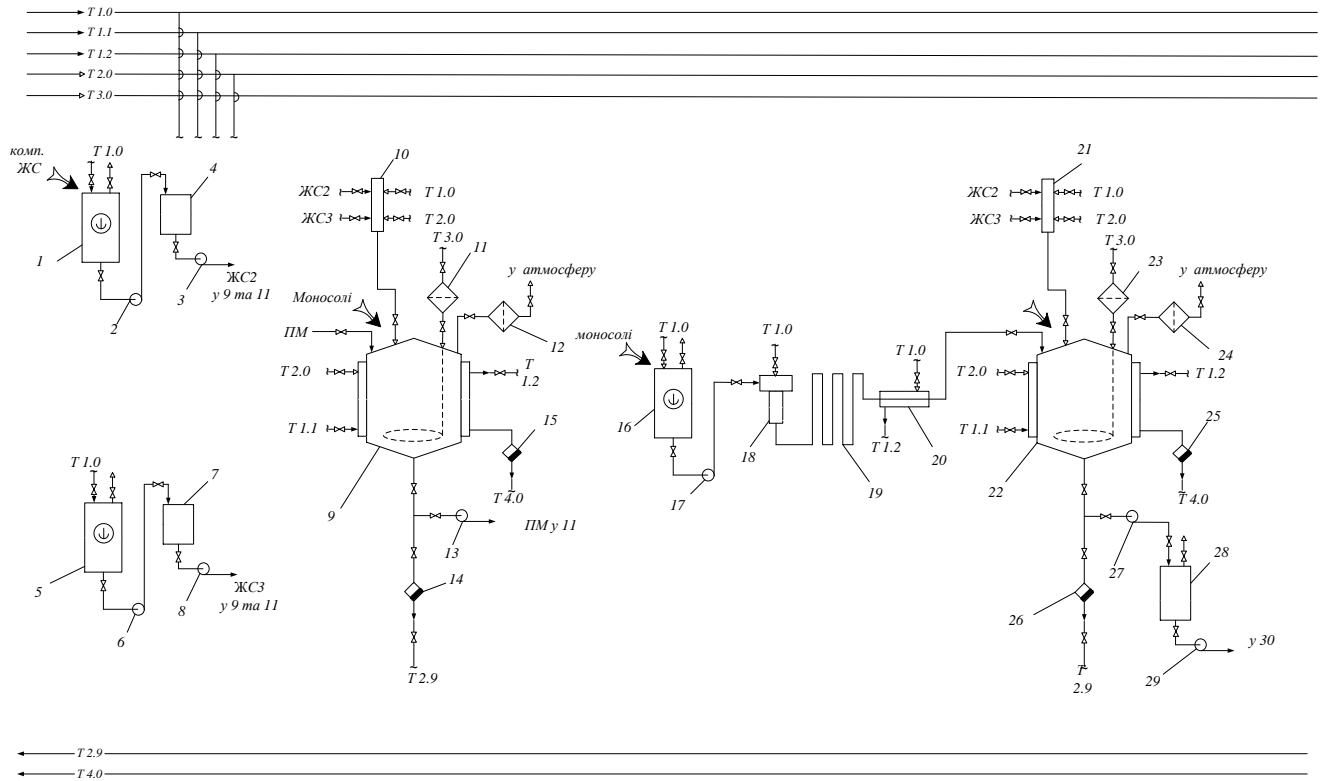
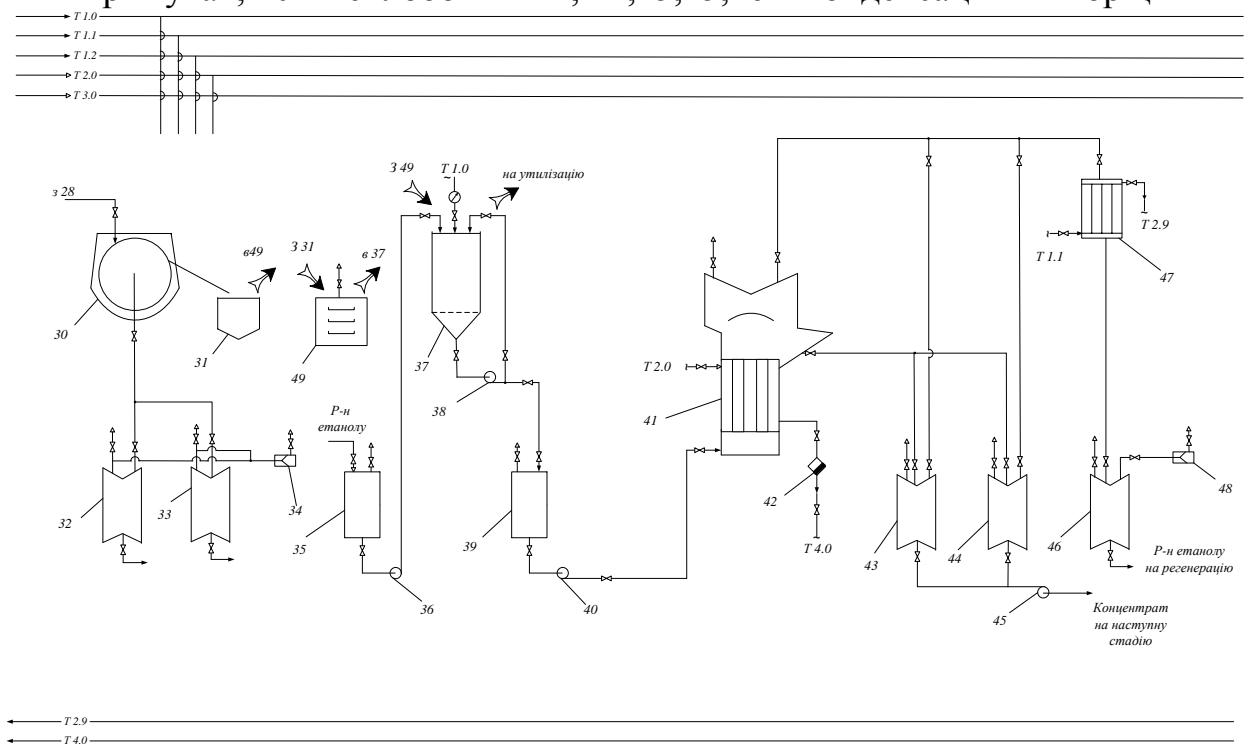


Рисунок 17. Технологічна схема екстрагування біомаси *Gladiolus imbricatus*: 1,5,16 – реактор-змішувач; 2,3,6,8,13,17,27,29 –насос; 4,7 – мембранний фільтр; 9,22 – інакулятор; 10,21 – змішувач; 11,12,23,24 – повітряний фільтр; 18 – нагрівач; 19 – витримувач; 20 – теплообмінник; 14,15,25,26 – конденсаційний горщик



Рисинок 17. (продовження) Технологічна схема культивування біомаси *Gladiolus imbricatus*: 36,38,40,45 – насос; 30 – барабанный фільтр; 31,32,33,35,39,43,44,46 – ємкість; 34,48 – вакуумний насос; 37 – перколятор; 41 – вакуумний випарник; 42 – конденсаційний горщик; 47 – холодильник; 49 – сушильна шафа.

ВИСНОВКИ

Базуючись на огляді та аналізі науково-технічної і патентної літератури, вивчення досвіду промислового виробництва, аналітичних, експериментальних та розрахункових досліджень у роботі вирішено науково-прикладне завдання, а саме запропоновано процес одержання біологічно активних речовин при культивуванні *G. imbricatus* в умовах *in vitro*.

1. Вперше введено в культуру *in vitro* рослинну субстанцію *G. imbricatus* шляхом підбору умов стерилізації, культивування та оптимізації складу ЖСМС.

2. Визначено оптимальні умови калусогенезу, а саме модифіковане агаризоване живильне середовище Мурасиге-Скуга з фітогормонами: НОК (0,5 мг/л), ІОК (3,0 мг/л), кінетин (0,5 мг/л); освітлення 2000 лк ; температура 23-25°C; час культивування – 3 тижні. При цьому показана чітка залежність індукції калусогенезу від кількості фітогормонів та типу експланту.

3. Вперше встановлений компонентний склад дикоростучого виду *G. imbricatus* та його культивованої калусної біомаси. В одержаних екстрактах ідентифіковані такі групи БАР: жирні кислоти, вуглеводні, спирти, терпени, флаваноїди, полісахариди, дубильні речовини, вітамін С та фенольні сполуки.

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

5. На основі розв'язання математичної моделі та експериментальних даних кінетики екстрагування БАР з дикорослого виду та культивованого *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro* отримано значення коефіцієнту дифузії D_m . Запропоновано схему процесу екстрагування біологічно активних речовин з культивованої калусної біомаси.

6. Встановлено оптимальні умови проведення процесу екстрагування біологічно активних речовин. Показана залежність процесу екстрагування цільових компонентів від розміру частинок та температури проведення процесу.

7. Встановлено, що для промислового культивування доцільно використовувати глибинний, аеробний, напівбезперервний процес вирощування біомаси, оскільки він дозволяє одержати екстракт з культури клітин рослин з максимальним вмістом комплексу біологічно активних речовин.

8. Оптимізований процес екстракції біологічно активних речовин з одержаної в результаті глибинного культивування біомаси *G. imbricatus*. Визначений оптимальний екстрагент – 70% етиловий спирт при співвідношенні сировина/екстрагент = 1:12. При цьому вилучається максимальна кількість екстрактивних речовин.

9. Встановлено ефективність використання інтегрального стехіометричного рівняння процесу культивування для складання матеріального балансу та розрахунку критеріїв масштабування процесу накопичення біомаси *G. imbricatus*.

10. Розроблена технологічна схема одержання біологічно активних речовин з біомаси калусної культури *G. imbricatus* – контрольована і автоматизована, що забезпечує вихід якісного продукту.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Krvavych A.S.** Phytochemical research of plant extracts and use *in vitro* culture in order to preserve rare wild species *Gladiolus imbricatus* / Krvavych A.S., Konechna R.T., Petrina R.O., Kurka M.S., Zayarnuk N.L., Gulko R.M., Stadnytska N.E., Novikov V.P. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – V.5 (1). – P. 240-246. (*Особистий внесок автора – проведення первинного фітоскринінгу екстрактів дикорослого виду та введення в культуру in vitro Gladiolus imbricatus. підготовка первинного варіанту статті*).
2. Pavlo Zadorozhnii. The molecular structure n-{2,2,2-trichloro-1-[(5-phenyl-1,3,4 thiadiazol-2-yl)amino]ethyl}acet- and thioacetamide / Pavlo Zadorozhnii, Vadym Kiselev, **Ann Krvavych**, Volodymyr Novikov // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – V.6 (2). – P. 689-695.
3. **Крвавич А.С.** Хромато-мас-спектрометричне вивчення та технологія екстрактів *Gladiolu simbricatus* / А.С. Крвавич, М.С. Курка, В.П. Новіков // Питання хімії та хімічної технології. – 2015. – Т. 4 (102) – С. 62-66. (*Особистий внесок автора – виконання експериментальних досліджень, встановлення хімічного складу екстрагованих сполук, підготовка первинного варіанту статті*).
4. **Крвавич А.С.** Розробка технологічного процесу одержання біологічно активних сполук з калусної культури лікарських рослин / А.С. Крвавич, Р.О. Петріна, В.П. Новіков // Наукові вісті Національного технічного університету України “КПІ”. – 2015. – № 12. – С. 1976–1978. (*Особистий внесок автора – культивування *G. Imbricatus in vitro* та визначення технологічних параметрів екстрагування біомаси*).
5. Петріна Р.О. Розробка біотехнологічного методу культивування косариків черепитчастих (*Gladiolus imbricatus*) в умовах *in vitro* / Петріна Р.О., **Крвавич А.С.**, Січевська Н.О., Новіков В.П. // Вісник НУ «Львівська політехніка». Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2015. – № 812. – С. 221-226. (*Особистий внесок автора – проведення експериментальних досліджень, аналіз одержаних даних, обговорення результатів кінетичних розрахунків, підготовка первинного варіанту статті*).
6. **Крвавич А.С.** Вивчення біологічно активних речовин косариків черепитчастих (*Gladiolus imbricatus*) / Крвавич А.С., Конечна Р.Т., Новіков В.П. // Вісник НУ «Львівська політехніка». Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2014. – № 787. – С.217-220. (*Особистий внесок автора – проведення експериментальних досліджень для встановлення оптимального екстрагенту для видалення флаваноїдів, підготовка первинного варіанту статті*).
7. Литвин Б.Я. Представники роду Juglans як джерело одержання біологічно активних речовин / Литвин Б.Я., Стадницька Н.Є., Конечна Р.Т., **Крвавич А.С.** // Вісник НУ «Львівська політехніка». Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2011. – №700. – С.117-121. (*Особистий внесок автора – проведення літературного пошуку, систематизація та обробка матеріалу*).
8. **Krvavych A.S.** Use of *in vitro* culture in order to preserve species *Gladiolus imbricatus*/ Krvavych A.S., Stadnytska N. E., Novikov V. P. // Національна науково-технічна інтернет-конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу

і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів». Матеріали доповідей та збірник наукових статей. – Львів: Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2013. – С. 8.

9. **Krvavych A.S.** The experience of ethnomedicine for treatment of allergic skin diseases / Krvavych A.S., Stadnytska N. E., Novikov V. P. // XVII Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених : 22-24 квіт. 2013 р. : матеріали конференції – Тернопіль : Укрмедкнига, 2013. – С. 381.

10. **Krvavych A.S.** Perspective of the use of medicinal plants in therapy of allergic skin diseases / Krvavych A.S., Stadnytska N. E., Novikov V. P. // Actual Questions Of Development of New Drugs : XX International Scientific And Practical Conf., April 25-26, 2013 : book of abstracts. – Kharkiv : Publishing Office, 2013. – P. 45.

11. Конечная Р.Т. Природные производные хинонов из растительного сырья / Конечная Р.Т., Винницкая Р.Б., **Тарарака А.С. (Крвавич А.С.)**, Билозир М.Й., Чучман Н.О., Стадницькая Н.Е., Новиков В.П. // Сборник тезисов конференции «Актуальные проблемы химии природных соединений», 18 марта-19 марта 2009г., Ташкент, Узбекистан, С.350.

12. Лущик І.П. Дослідження асортименту фітопрепаратів з використанням рослин роду *Juglans* на фармацевтичному ринку України / Лущик І.П., Стадницька Н.Є., Литвин Б.Я., **Крвавич А.С.**, Новіков В.П. // Сучасні досягнення фармацевтичної технології : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 17-18 листопада 2011р. : матеріали конференції. – Харків, 2011. – С. 114-115.

13. **Крвавич А.С.** Розробка біологічно активної добавки для лікування алергічних захворювань / Крвавич А.С., Литвин Б.Я., Стадницька Н.Є., Новіков В.П. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 вересня 2013 р. : матеріали конференції. – Тернопіль, 2013. – С. 367.

14. **Крвавич А.С.** Культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro* / Крвавич А.С., Січевська Н.О., Костик Х.В., Петріна Р.О. // Біотехнологія XXI століття: мат. IX Всеукр. наук.-практ. конф. (24 квітня 2015р.). – Київ, 2015. – С.83.

15. **A. Krvavych.** Phytochemical research of plant extracts of *Gladiolus imbricatus* / A. Krvavych, R. Konechna, A. Nadzikiewicz-Szpon, I. Jasicka-Misiak, A., Novikov V.P. // Сучасні досягнення фармацевтичної технології: Мат. IV наук.-практ. конф. з міжн. участю (16-17 жовтня 2014 р.). – Х.: Вид-во НФаУ, 2014.- С. 14.

16. O. Fedorova. Create a new cosmetic products with the use of medicinal plants' biomass / O. Fedorova, N. Zayarnuk, R. Petrina, **A. Krvavych**, R. Konechna // Pharm. Sciences in XXI Century : II Int. Scientific Conf., May 2-4, 2014 : coll. of Scientific works. – Tbilisi, Georgia. – pp. 140-141.

17. **А.С. Крвавич.** Використання культури *in vitro Gladiolus imbricatus* з метою отримання цінних біологічно активних речовин / А.С. Крвавич, Р.О. Петріна, Н.В. Толкачова, В.П. Новіков // Проблеми та перспективи досліджень рослинного світу : міжн. науково-практична конф. молодих науковців, 13-16 травня 2014р. : матеріали конференції. – Ялта, 2014. – С. 51.

АНОТАЦІЯ

Крвавич А.С. Екстрагування біологічно активних речовин з біомаси *Gladiolus imbricatus*, культивованої в умовах *in vitro*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 05.17.08 – процеси та обладнання хімічної технології – Національний університет «Львівська політехніка», МОН України, Львів, 2016.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню процесу культивування *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro*, а також механізму та кінетики процесу екстрагування БАР з дикорослої сировини та з культивованої калусної біомаси.

Показана залежність процесу екстрагування цільових компонентів від розміру частинок та температури проведення процесу. На основі розв'язання математичної моделі та експериментальних даних кінетики екстрагування БАР з дикорослого виду та культивованого *Gladiolus imbricatus* в умовах *in vitro* отримано значення коефіцієнту дифузії D_m . Запропоновано технологічну схему процесу екстрагування БАР з культивованої біомаси.

Запропоновано принципову технологічну та апаратурно-технологічну схеми виробництва екстракту біомаси. Дана технологія може бути рекомендована для виробництва БАР для косметичної, хімічної та інших галузей промисловості.

Ключові слова: *Gladiolus imbricatus*, біологічно-активні речовини, ферментер, кінетика процесу, екстрагування цільових компонентів.

АННОТАЦИЯ

Крвавич А.С. Экстрагирование биологически активных соединений с биомассы *Gladiolus imbricatus*, культивированной в условиях *in vitro*. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 05.17.08 - процессы и оборудование химической технологии – Национальный университет "Львовская политехника", МОН Украины, Львов, 2016.

Диссертационная работа посвящена исследованию процесса культивирования *Gladiolus imbricatus* в условиях *in vitro*, а также механизма и кинетики процесса экстрагирования БАВ из дикорастущего сырья и из культивируемой биомассы.

Показана зависимость процесса экстрагирования целевых компонентов от размера частиц и температуры проведения процесса.

На основе решения математической модели и экспериментальных данных кинетики экстрагирования БАВ из дикорастущего вида и культивированного *Gladiolus imbricatus* в условиях *in vitro* получено значение коэффициента диффузии D_m . Предложена технологическая схема процесса экстрагирования БАВ из культивируемой калусной биомассы.

Предложена принципиальная технологическая и апаратурно-технологическая схемы производства экстракта биомассы. Данная технология может быть рекомендованная для производства БАВ для косметической, химической и других отраслей промышленности.

Ключевые слова: *Gladiolus imbricatus*, биологически-активные вещества, ферментер, кинетика процесса, экстрагирования целевых компонентов.

ANNOTATION

Krvavych A.S. The extraction of biologically active substance from biomass of *Gladiolus imbricatus* obtained *in vitro* cultivation. – On the rights of manuscript.

Ph.D acquisition dissertation of the degree of candidate of technical sciences, specialty 05.17.08 – Processes and equipment of Chemical Technology – National University 'Lviv Polytechnic', Ministry of education and Science of Ukraine, Lviv, 2016.

This dissertation is dedicated to research of the cultivation process of *Gladiolus imbricatus in vitro* conditions and besides to the kinetics mechanism and process of the extraction of BAC from wild-breed raw species and cultivated callus biomass. As a result of reduction of natural supplies of medical plants, perspective is an alternative biotechnological method of production of biologically active compounds from the *in vitro* culture. That is why the introduction to the *in vitro* culture of *Gladiolus imbricatus* and the comparative analysis of BAC the presence of in extracts of herbs and callus mass is important scientific practical problem.

The dependence of the extraction process of target components from the particle size and the temperature of the process conduction has been shown. It has been shown that the process of BAC extraction from wild species is very slower with increasing particle and limited by inner diffusion. The process runs by the mixed mechanism (external and inner diffusion) in case of extraction from ground particle and mixed conditions.

Optimum conditions of extraction conduction process of BAS have been established. The resulting ethanolic and water extracts was filtered and concentrated and then tested for various BAC by conventional methods – polysaccharides, flavonoids and glycosides, terpenoids, vitamin C, aromatic and quinones compounds were commonly found. Different phytochemicals have been found to possess a wide range of activities, which may help in protection against chronic diseases. For example, flavonoids have been reported to have antiviral, anti-allergic, anti-platelet, anti-inflammatory and antitumor activities.

Based on the mathematical extracting and experimental data of BAC extraction kinetics from wild-breed species and cultivated *Gladiolus imbricatus in vitro* conditions the diffusion coefficient values D_m has been obtained. Mathematical models that give the opportunity to identify existence of different target components extraction mechanisms from porous structures have been presented and determine the whole process speed: a) inner diffusion mechanism; b) external diffusion mechanism; c) mixed diffusion mechanism; d) mixed diffusion chemical interaction mechanism.

The optimum cultivation parameters of *Gladiolus imbricatus in vitro* conditions in the laboratory terms (both shallow and deep method) have been established. The material balance process has been compiled and on its basis the indicators for zooming process in the bioreactor terms have been calculated.

The fundamental technology and hardware-technological scheme of biomass extract production have been suggested. This technology could have been recommended for the production of BAC for the cosmetics, chemical and other industries.

Key words: *Gladiolus imbricatus*, biologically active substance, fermenter, process kinetics, extraction of target components.