

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК *DIOSCOREA DELTOIDEA WALL* И *POLYSCIAS FILICIFOLIA BAILEY* В ПОЛУПРОТОЧНОМ РЕЖИМЕ В БИОРЕАКТРАХ РАЗЛИЧНОГО ОБЪЕМА

М.В. ТИТОВА; Н.А. ШУМИЛО; И.Е. КУЛИЧЕНКО;
А.В. ОРЕШНИКОВ, *кандидат биологических наук*

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А.
Тимирязева РАН, Москва, Россия

А.М. НОСОВ, *доктор биологических наук*
Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия

Введение

В настоящее время культура клеток высших растений является альтернативным способом получения сырья для косметической, фармацевтической и пищевой промышленности [2, 6]. По сравнению с использованием интактных растений, применение технологий растительных клеток *in vitro* имеет ряд преимуществ, в частности:

- возможность получения необходимых количеств качественного продукта с воспроизводимыми характеристиками в стерильных контролируемых условиях;
- независимость от климатических и политических факторов;
- возможность использования биотрансформации для получения новых метаболитов;
- удобство производства и очистки продукта [6].

Однако следует отметить и ряд проблем, связанных с промышленным использованием культур клеток высших растений:

- трудности получения и сохранения высокопродуктивного штамма-продуцента;
- возможное снижение уровня содержания вторичных метаболитов в шаммепродуценте при длительном культивировании, опасность его генетической нестабильности;
- низкая скорость роста растительных клеток (относительно микробных культур);
- высокие требования к используемому оборудованию и, как следствие, высокая стоимость получаемой биомассы;
- технические трудности осуществления крупномасштабного выращивания клеток растений в промышленных биореакторах [3, 4].

Таким образом, для создания эффективной технологии получения биомассы культур клеток необходим целый комплекс научных и технологических исследований. Не считая получения штамма-продуцента с высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками, что является основой создаваемой технологии, требуется оптимизировать выращивание культур клеток в биореакторах. Для этого необходимы эксперименты по выбору оптимального типа биореактора и определения наиболее выгодных режимов выращивания культур. Кроме того, требуются специальные исследования по масштабированию процесса выращивания до биореакторов полупромышленного и промышленного объемов [3, 7].

Известно, что для промышленного производства биомассы можно использовать три варианта культивирования: периодический, проточный и полупроточный.

С точки зрения создания стабильного масштабного производства, проточный и периодический методы выращивания имеют ряд недостатков. В частности, при периодическом режиме требуется значительное время для подготовки и стерилизации биореактора, каждый новый цикл культивирования требует нового посевного материала, что может приводить к нестабильности биосинтеза и роста культуры. Проточное культивирование более стабильно, однако требует введения в схему биореактора дополнительных устройств (перистальтических насосов, разделительных мембран и пр.).

что для биореакторов промышленного объема представляет определенные конструктивные проблемы и значительно повышает стоимость процесса получения биомассы. Для проточного режима показано также изменение морфофизиологических характеристик и состава клеточных популяций (за счет отбора интенсивно делящихся клеток с пониженным синтезом). Наиболее перспективным представляется полупроточный или "отливно-доливной" метод культивирования, который занимает промежуточное положение между проточным и периодическим режимами выращивания. При использовании данного метода сусpenзия клеток разбавляется свежей питательной средой в фазу максимального накопления сухой массы в единице объема сусpenзии, что позволяет поддерживать клеточную популяцию в активно растущем состоянии и значительно уменьшает время культивирования [5].

Целью данной работы явилось оптимизирование режимов культивирования растительных клеток в биореакторах разной конструкции и объема для рентабельного производства биомассы. Для реализации поставленной задачи была исследована возможность длительного аппаратурного выращивания сусpenзионных культур клеток с использованием полупроточного метода.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были использованы сусpenзионные культуры клеток диоскореи дельтовидной и полисциаса папортниколистного. Культуры депонированы в ВККК ВР ИФ РАН под соответствующими номерами: *Dioscorea deltoidea* Wall, мутантный штамм-сверхпродуцент фуростаноловых гликозидов ИФР ДМ-0.5 (№ 6); *Polyscias filicifolia* Bailey, коллекционный штамм ВFT-001-95 (№ 58).

Культуры выращивали на модифицированных средах Мурасиге и Скуга с добавлением сахарозы и регуляторов роста. Для всех штаммов начальная плотность культур находилась в пределах 2,0-2,5 г/л по сухому весу при жизнеспособности культур 87-93%.

Культивирование проводили в колбах и в биореакторах.

Для выращивания сусpenзионных культур клеток в колбах на круговой качалке использовали колбы объемом 0,5-2,0 л. Культивирование проводили в темноте при температуре 26-27°C, влажности 70-75% и частоте оборотов качалки 80-100 об/мин.

Для аппаратурного выращивания использовали биореакторы 3-х типов:

1) барботажный соплоконусный ферментер (разработка Отдела биологии клетки и биотехнологии РАН), общий объем 20 л, рабочий объем 15 л.

2) аппарат с барботажем и механическим перемешиванием (фирма «Electrolux», Швеция); общий объем 75 л, рабочий объем 50 л, тип перемешивающего устройства «морской винт», скорость вращения мешалки при культивировании 30-65 об/мин.

3) барботажный аппарат (1Т, ОКБА, Йошкар-Ола), общий объем 630 л; рабочий объем 550 л.

В зависимости от типа биореактора и фазы ростового цикла расход воздуха на барботаж составлял 0,1-1,0 л/л/мин. Концентрацию растворенного кислорода pO_2 поддерживали на уровне 10-40% от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования. Для уменьшения отрицательного воздействия перемешивающих устройств в биореакторах с механическим перемешиванием на начальных фазах роста устанавливали минимальную скорость перемешивания по отсутствию седиментации клеток. В период экспоненциального роста скорость вращения мешалки увеличивали до максимально возможной, не приводящей к разрушению клеток (степень повреждения определяли микроскопически). Температуру сусpenзии поддерживали на уровне $26\pm0,5^{\circ}\text{C}$.

Для характеристики роста и физиологического состояния культур использовали сухую и сырую массы, а также жизнеспособность и концентрацию клеток. По

первичным результатам, характеризующим рост культуры, рассчитывали следующие параметры:

индекс роста: $I = X_{\max}/X_0$;

удельную скорость роста в экспоненте: $\mu = (\Delta \ln X/X_0)/\Delta t$, [сут⁻¹]

время удвоения: $T = \ln 2 / \mu$, [сут], где

X_{\max} – максимальное значение параметра (сухая масса M_{dw} , сырья масса M_{fw}) в цикле роста;

X_0 – начальное значение параметра в цикле роста;

Δt – значение времени длительности экспоненциальной фазы роста, [сут].

При выращивании суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* конце каждого цикла субкультивирования отбирали образцы биомассы и проводили количественное определение фуростаноловых гликозидов. Анализ гликозидов осуществлялся спектрофотометрическим методом с использованием реагтива Эрлиха [1].

Результаты и обсуждение

Для проведения экспериментов по оптимизации и масштабированию выращивания была использована стратегия, типичная для микробных культур: предварительные эксперименты в лабораторных биореакторах (объем 2-15 л) по оптимизации роста культуры, затем выращивание в пилотных установках (объемом до 50 л) и проверка выбранных режимов, и наконец – масштабирование выращивания до полупромышленных и коммерческих биореакторов (объемом более 500 л) [5]. Для реализации этой схемы был использован ряд биореакторов с рабочим объемом от 15 до 550 л и различной системой перемешивания, причем аппараты меньшего объема использовались как инокуляторы для аппаратов большего объема.

При использовании этой схемы в течение 5 лет проводились многократные эксперименты по длительному полупроточному выращиванию суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea*. Для всех типов биореакторов процесс «отлива-долива» проводили при достижении плотности суспензии, соответствующей началу фазы замедления роста. Разбавление средой в каждом цикле проводили до концентрации биомассы, исключающей появление лаг-фазы (2,0-2,5 г/л среды по сухому весу). При снижении плотности инокулюма ниже 2,0 г/л отмечали падение жизнеспособности клеток, уменьшение удельной скорости роста и конечной концентрации сухой биомассы, а в некоторых случаях – полную остановку роста и гибель популяции.

Полученные типичные кривые роста, а также соответствующие им основные ростовые характеристики представлены на рис. 1, 2, 3, 4 и в табл. Как следует из полученных результатов, для барботажных биореакторов удельная скорость роста культур варьировала в пределах 0,12-0,28 сут⁻¹ для *P. filicifolia* и 0,12-0,18 сут⁻¹ для *D. deltoidea*; максимальное накопление биомассы происходило на 9-14 сутки и достигало 15,0-17,0 г/л по сухому весу для культуры клеток полисциаса и 11,0-14,0 г/л для диоскореи. Жизнеспособность клеток сохранялась на уровне 90-85% для *P. filicifolia* и 90-80% для *D. deltoidea*. Для пилотного биореактора с механическим перемешиванием наблюдали общее снижение всех ростовых характеристик: удельная скорость роста составляла 0,13-0,11 сут⁻¹ для культуры клеток полисциаса и 0,12-0,10 сут⁻¹ для диоскореи. Максимальное накопление биомассы не превышало 12,0 г/л по сухому весу для *P. filicifolia* и 8,0 г/л для *D. deltoidea*; жизнеспособность варьировала в пределах 80-77 и 73-66% соответственно. Такой характер изменения ростовых параметров обусловлен, по-видимому, повреждающим действием механического перемешивания на клетки суспензии.

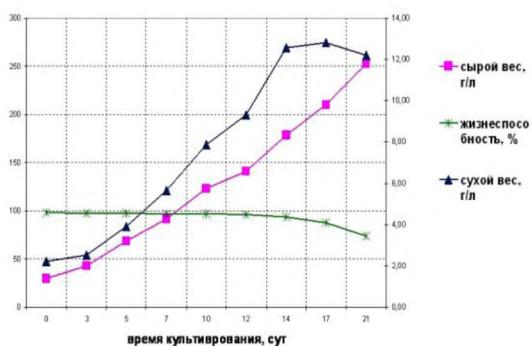
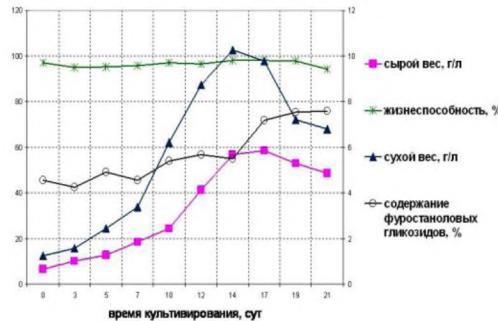
P. filicifolia, штамм BFT-001-95 (№ 58).*D. deltoidea*, штамм IFR DM-0,5 (№ 6)

Рис. 1. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при периодическом выращивании в колбах

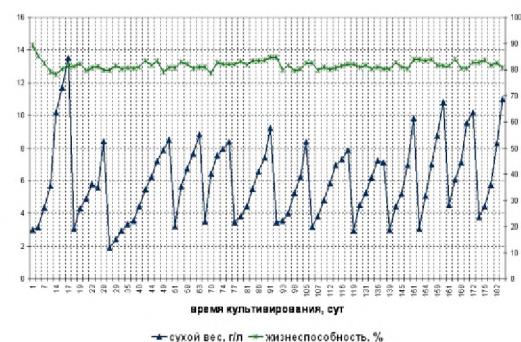
P. filicifolia, штамм BFT-001-95 (№ 58).*D. deltoidea*, штамм IFR DM-0,5 (№ 6)

Рис. 2. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в 20L барботажном биореакторе

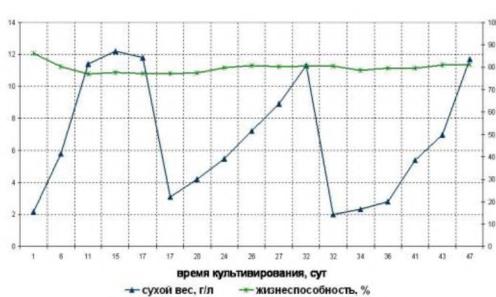
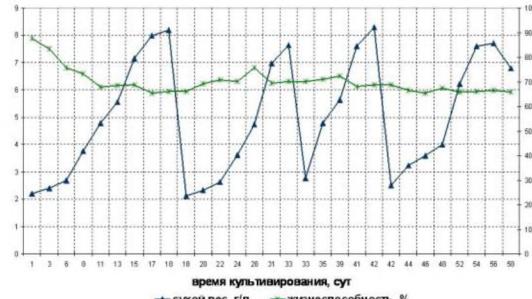
P. filicifolia, штамм BFT-001-95 (№ 58).*D. deltoidea*, штамм IFR DM-0,5 (№ 6)

Рис. 3. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в 75L биореакторе с механическим перемешиванием

Содержание фуростаноловых гликозидов при полупроточном культивировании сохранялось на уровне 4,5-9,5%, что не ниже, чем при стандартном периодическом выращивании культуры в колбах на качалке.

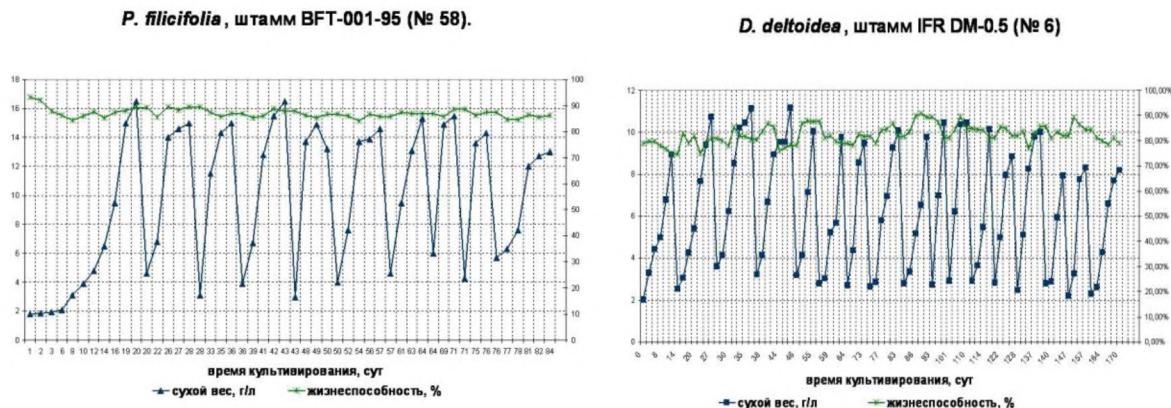


Рис. 4. Динамика роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в 630L барботажном биореакторе

Таблица

Основные характеристики роста суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea* при полупроточном выращивании в различных системах культивирования

Параметр	Объект	20L биореактор	75L биореактор «Electrolux»	630L биореактор	Колбы
M_{max} dry weight, г/л	<i>P. filicifolia</i>	15,02	11,82	16,54	12,8
	<i>D. deltoidea</i>	13,53	8,30	11,16	10,27
Удельная скорость роста, μ_M , сут ⁻¹	<i>P. filicifolia</i>	0,28-0,17	0,13-0,11	0,19-0,12	0,22-0,15
	<i>D. deltoidea</i>	0,14-0,12	0,12-0,10	0,18-0,15	0,20-0,15
Продуктивность, $P_{dry weight}$, г/л*сут	<i>P. filicifolia</i>	0,98-0,71	0,63-0,55	0,81-0,59	0,96-0,75
	<i>D. deltoidea</i>	0,75-0,48	0,58-0,36	0,75-0,63	0,63-0,46
Индекс роста, I_M	<i>P. filicifolia</i>	7,55-5,89	5,85-3,75	7,65-3,84	7,20-5,53
	<i>D. deltoidea</i>	5,82-3,32	4,21-3,63	5,41-3,47	6,84-5,15
Жизнеспособность, %	<i>P. filicifolia</i>	89,0-86,0	80,0-77,0	89,0-85,0	98,0-96,
	<i>D. deltoidea</i>	83,0-79,0	73,0-66,0	89,0-77,0	98,0-95,0
Содержание фуростанол. гликозидов, %	<i>D. deltoidea</i>	4,6-6,8	3,0-4,5	6,2-9,5	4,5-7,6

Сходные данные были получены и для других циклов полупроточного культивирования клеток *P. filicifolia* и *D. deltoidea*.

Выводы

Таким образом, было продемонстрировано, что при переходе к длительному полупроточному культивированию в биореакторах разных типов суспензионные культуры клеток *D. deltoidea* и *P. filicifolia* сохраняют удовлетворительные ростовые и биосинтетические характеристики и предложенная схема масштабирования вполне может быть использована для производственного выращивания. Кроме того, для штамма ИФР ДМ-0,5 культуры клеток диоскореи дельтовидной остается стабильной также способность к синтезу фуростаноловых гликозидов, что весьма существенно

при разработке промышленного производства биомассы.

В целом при использовании полупроточного режима выращивания общая продуктивность процесса повышается в среднем на 15-20% за счет отсутствия лаг-фазы и времени, необходимого на подготовку периодического культивирования.

Список литературы

1. Определение олигофуростанозидов в культуре клеток *Dioscorea deltoidea* Wall спектрофотометрическим методом / Васильева И.С., Воробьев А.С., Горская Н.В., Липский А.Х., Гуриелидзе К.Г., Пасешниченко В.А. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1987. – № 5. – С. 692.
2. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective / Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. // Plant Science. – 2001. – 161. – P. 839-851.
3. Collin H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures // Plant Growth Regulation. – 2001. – № 34. – P. 119-134.
4. DiCosmo F., Misawa M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production // Biotechnology Advances. – 1995. – № 3. – P. 425-453.
5. Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations // Journal of Biotechnology. – 1997. – 59. – P. 39-52
6. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. – 2002. – V. 20. – P. 101-153.
7. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites // Phytochemistry Reviews. – 2002. – № 1. – P. 13-25.

РАЗМНОЖЕНИЕ БОРЕЦА СЕВЕРНОГО В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА ОСНОВЕ ФЕНОМЕНА ЭМБРИОИДОГЕНИИ

Н.Н. КРУГЛОВА, *доктор биологических наук*; А.Е. КРУГЛОВА

Учреждение РАН Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Уфа, Россия

Введение

Длительный процесс адаптивной эволюции привел к возникновению у цветковых растений разнообразных репродуктивных структур, обеспечивающих семенное (гетерофазная репродукция) и вегетативное (гомофазная репродукция) размножение [1]. Особый интерес вызывают случаи формирования эмбриоида (синонимы: соматический зародыш, зародышеподобная структура, адвентивный зародыш) – зачатка растения, образующегося из соматических (неполовых) клеток. Системный эмбриологический подход позволил установить новую категорию вегетативного (бесполого) размножения цветковых растений – эмбриоидогению; показано, что растения, образующиеся из эмбриоидов, представляют собой клоны – особи, генетически идентичные между собой и исходным растением [2].

В течение ряда лет явление эмбриоидогении в каллусной культуре *in vitro* изучается нами на примере бореца северного *Aconitum lycoctonum* L. (синоним: аконит высокий *Aconitum septentrionale* Koelle), многолетнего растения из семейства Лютиковые (рис. 1).

Помимо теоретического значения, связанного с выявлением разнообразия способов размножения и систем репродукции цветковых растений, полученные данные имеют и прикладное значение для разработки способа стабильного получения растений-клонов этого ценного лекарственного растения.