

Ю.М. ПЕНЧУК, канд. техн. наук,
О.І. СКРОЦЬКА, канд. біол. наук,
Ю.В. КОЛОМІЄЦЬ, канд. біол. наук,
О.В. ЧЕРНЕГА, студ.,
О.С. СОКОЛОВСЬКИЙ, асп.

Національний університет харчових технологій

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИННИХ КЛІТИН ГЛИБИННИМ СПОСОБОМ

В роботі зроблено аналіз існуючих систем, які використовуються при культивуванні рослинних клітин для подальшого використання в технології одержання біологічно активних речовин та при великомасштабному мікропональному розмноження рослин. Вибрано основні базові моделі для розроблення та конструювання біореактора, який в подальшому буде використано для культивування клітин рослин.

Ключові слова: біореактор, калюсна культура, аерування біологічно активні речовини.

Вегетативне розмноження клітин *in vitro*, ефективний метод швидкого поширення рослини у великих кількостях. Він має значні переваги над звичайними способами, такими як черенки і насіння [5, 9]. Вегетативне розмноження клітин може бути досягнуто шляхом прямого органогенезу через пагони або шляхом соматичного ембріогенезу та «ворсистого коріння». Можливість вегетативного розмноження шляхом соматичного ембріогенезу є альтернативою системі розповсюдження [4, 13]. Крім цього він може бути легко автоматизований і має перспективи для швидкого поширення рослин, оскільки дуже велика кількість соматичних ембріонів утворюється впродовж короткого проміжку часу в обмеженій кількості середовища. Цей метод є економічно доцільніший для багатьох рослинних видів. Потенційне застосування соматичного ембріогенезу в рослинництві залежить великою мірою від розвитку ембріонів через калюс або безпосередньо через експлантат рослини. Використання незмінно зосереджено на великомасштабному виробництві цінних продуктів або вторинних метаболітів [2, 3].

За наявності ембріонних клітин і ворсистій кореневої системи була продемонстрована система, що дає можливість виробляти соматичні ембріони і ворсистого коріння у великих масштабах. Відомо, що рослинні клітини є відносно великих розмірів і мають відносно низький гідродинамічний опір і низькі зусилля. Клітини в суспензії піддаються помірній дії гідродинамічного опору інакше вони будуть деформуватись або розриватися. Через це виникає необхідність розробляти біореактор відповідної конфігурації, який може використовуватись у великих масштабах і забезпечувати необхідні перемішування і масообмін при зведенні до мінімуму інтенсивності і гідродинамічного тиску [4, 11].

Виробництво біологічно активних речовин за допомогою рослинних клітин, як технологічний процес, має ряд труднощів у порівнянні з налагодженою мікробною ферментацією [1, 3, 8]:

1. рослинні клітини ростуть набагато повільнішими темпами з подвоєнням близько 40 год (порівняно з 0,3 год для деяких бактерій). Отже, витрати пов'язані з поколінням клітин набагато більші;

2. виробництво, як правило, нижче. Наприклад, незважаючи на кілька років оптимізаційних досліджень продуктивність шиконіну з безперервної культури *Lythsperrum erythrorhizon* становить 0,1 г, а продуктивність пеніциліну з гриба *Penicillium crysogenum* 3,2 г [7, 10];

3. рослинні клітини накопичують метаболіти в вакуолях, лише невелика їх кількість виділяється у середовище.

Клітини рослин більш чутливі, ніж клітини бактерій або дріжджів, що вимагає набагато м'якшої аерації.

Для підвищення продуктивності культивованих клітин широко і в багатьох випадках успішно застосовують:

- клітинну селекцію, що ґрунтується на спонтанних і на індукованих мутаціях в культурі клітин;
- оптимізацію умов вирощування і складу поживних і продукційних середовищ;
- інтенсифікацію процесів біосинтезу за рахунок удосконалення конструкцій біореакторів;
- культивування диференційованих культур, клітин чи індукцію диференціювання; використання еліситорів.

Проектування та експлуатація біореакторів в основному визначається біологічними потребами і технічними вимогами, які часто включають в себе цілий ряд факторів: ефективність передачі кисню, перемішування, низькість гідродинамічного опору, ефективність контролю фізико-хімічних параметрів середовища тощо. Оскільки деякі з цих факторів можуть бути суперечливі, тому важко безпосередньо використовувати звичайний мікробний реактор [12].

Основні типи біореакторів, які використовуються для культивування рослинних клітин, представлені на рис. 1.

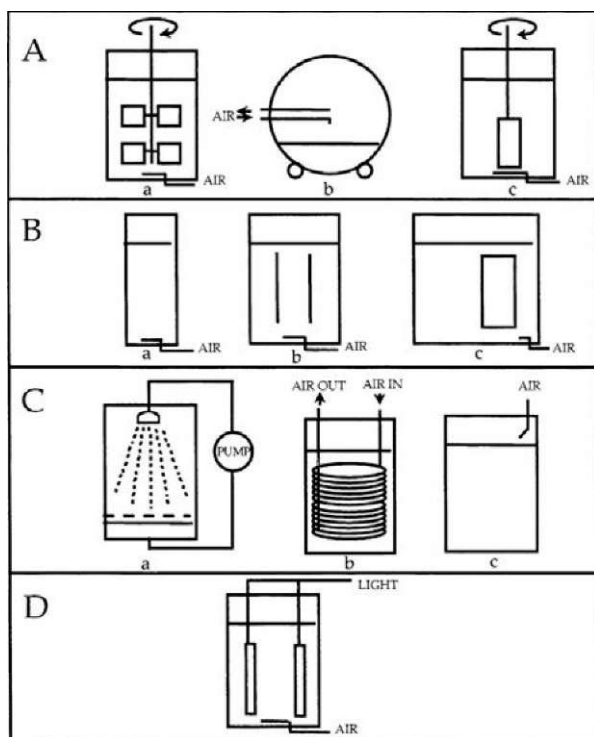


Рис. 1. Різні типи біореакторів для рослинних клітин [12]:
 (А) механічний біореактор, а; нагнітання аерації, б; обертовий барабан, с; спін-фільтр. (В) пневматичний біореактор, а; міхура колонки, б; проекторна труба, с; зовнішня петля, (С) вихровий біореактор, а; газоподібна фаза (туман), б; кисневопроникні мембрани аератора, с; поверхня аерації, (D) світловипромінювальний проект труби

Нещодавно було розроблено біореактор з гвинтово-стрічковою крильчаткою, що ефективно використовується для рослинних клітин, які мають високу щільність. Ці біореактори характеризуються рівномірним гідродинамічним тиском, перемішуванням з достатнім запасом кисню і без зайвого піноутворення, флотацією біомаси.

Кілька років тому було успішно розроблено біореактор з відцентровою крильчаткою (рис. 2) [12, 6]. Новий біореактор має ряд переваг в порівнянні з широко застосовуваними біореакторами. Він включає в себе набагато більшу підйомність води, забезпечує краще перемішування, знижує напругу зсуву і турбулентність рідини на поверхні, що може викликати серйозні втрати життєздатності клітин. Конструкція цього біореактора була визнана одною з найбільш відповідних конструкцій для масового поширення рослин за допомогою соматичного ембріогенезу [12].

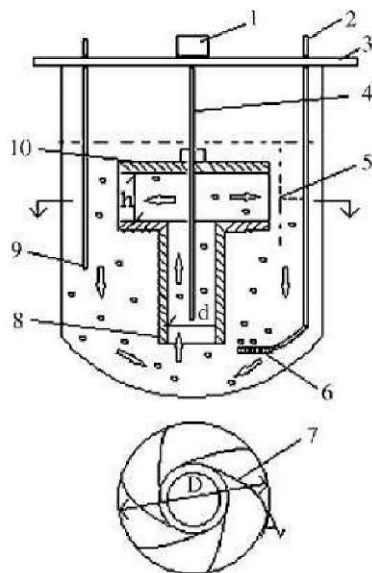


Рис. 2 Біореактор з відцентровими крильчатками [12]: 1 – магнітна мішалка; 2 – газ; 3 – головна пластина; 4 – агітаторний вал; 5 – вимірювання профілів швидкості розряду рідинного потоку були проведені у вертикальному напрямку по всій ширині леза (вертикальна пунктирна лінія) і на різних радіальних відстанях від крильчатки; 6 – нержавіючий розбризкувач; 7 – відцентрові леза; 8 – проектора трубка; 9 – зонд; 10 – відцентрово обертовий вал

Середовища для культивування рослинних клітин культур повинні складатися з великої кількості компонентів. Ці компоненти можуть бути представлені водою, різноманітними джерелами вуглецю, концентрованими розчинами мінеральних солей, вітамінами, гормонами росту та розчиненими газами.

Для вирощування суспензійної культури рослинних клітин в лабораторії було сконструйовано ферментер об'ємом 1,2 л (рис. 3).

Сконструйований апарат містить перемішувачий пристрій шнекового типу, що дозволяє м'яко перемішувати культуральну рідину. Окрім цього мішалка такого типу створює направлені потоки, підтримуючи клітини в завислому стані. Аерація здійснюється через барботер, який являє собою мембрану пористого скла. В середині апарату розташований дифузор для додаткового розподілу кисню в об'ємі.

Ферментер обладнаний датчиками вимірювання значення рН та розчиненого кисню в середовищі культивування.

Висновки. Сконструйований апарат дозволить вирощувати культури клітин рослин, які можуть бути використані як продуценти біологічно активних речовин для потреб різних галузей.



Рис. 3 Лабораторний ферментер для вирощування клітин рослин

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Бутенко Р.Г. – М.: Наука, 1986. – 272 с.
2. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. – Н.: Наука, 1990. – 333 с.
3. Калинин Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений / Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. – Киев: Наук.думка, 1992. – 228 с.
4. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіоло-біохімічні основи / Кунах В.А. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
5. Кунах В.А. Особенности получения и изменчивость суспензионных культур и клеточных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina in vitro* / Кунах В.А., Можилевская Л.П., Губарь С.И. // Биотехнология. – 2001. – № 4. - с. 9 - 21.
6. Мельничук М.Д. Основи біотехнології рослин / Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко В.О. – К., 2000. – 247 с.
7. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / Сидоров В.А. – К.: Наук. думка, 1990. – 280 с.
8. George E.F. Plant propagation by tissue culture / George E.F. // The Technology. – 2000. – P. 302 - 335.
9. Hahlbrock K. Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells / Hahlbrock K. // Plant Tissue and Cell Culture. – 1987. – 2. – P. 357 - 362.
10. Merillon J.M. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine, and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro* / Merillon J.M., Rideau M., Chenieux J. // Planta Med. – 2003. – 50, N6. – P. 497 - 501.
11. Nabors M.W. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures / Nabors M.W., Heysler J.W., Dykes T.A., Mott K.J. // Planta. – 1993. – 157. – P. 385 - 391.
12. Ohta S. *Nicotiana glauca* in vitro production of nicotine / S. Ohta, M. Yatazawa // In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, V. 7. Medicin Aromat. Plants II. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1989. – P. 367 - 380.
13. Parr A.J. The production of secondary metabolites by plant cell cultures / Parr A.J. // J. Biotechnol. – 2000. – 10, N 1. – P. 1 - 26.

В работе сделан анализ существующих систем, использующиеся при культивировании растительных клеток для дальнейшего использования в технологии получения биологически активных веществ и при крупномасштабном микроклональном размножении растений. Выбрано основные базовые модели для разработки и конструирования биореактора, который в будущем будет использован для культивирования растительных клеток.

Ключевые слова: биореактор, калюсная культура, аэрирование, биологически активные вещества.

Yu. PENCHUK, O. SKROTSKA, Y. KOLOMIETS,
O. CHERNEGA, A. SOKOLOVSKIY

Equipment for growing plant cells of deep way

In work the analysis of the existing systems, used is made at cultivation of vegetative cells for the further use in technology of reception of biologically active substances and at large-scale microclonal reproduction of plants. It is chosen the basic base models for working out and designing of the bioreactor which in the future will be used for cultivation of vegetative cells.

Constructed apparatus includes a mixing device such as a screw that allows you to gently mix the culture broth. In addition, this type of mixer generates a directed flow, maintaining cells in suspension. Aeration is carried out through a bubbler, which is a porous glass membrane. In the middle of the apparatus is a diffuser for additional distribution of oxygen in the bulk.

Key words: the bioreactor, cell culture, aeration, biologically active substances.