

наукові вісті

Національного технічного університету України
"Київський політехнічний інститут"

Науково-технічний журнал

№ 6(44)

"2005

Започаткований у вересні 1997 року

Редакційна колегія:

Головний редактор
М.З. Згуровський

Заступник головного
редактора
М.Ю. Ільченко

Відповідальний
секретар
Г.Ф. Бублик

Члени редколегії -
координатори
наукових напрямків

М.І. Бобир

В.Ю. Горчаков

О.В. Збруцький

О.А. Молчанов

І.В. Недін

Б.В. Новіков

О.М. Новіков

Є.М. Письменний

А.В. Праховник

В.Г. Сігорський

О.Г. Юрченко

Ю.Л. Якименко

Редакційна рада

Адреса редакції:
03056, Київ-56,
проспект Перемоги, 37,
Національний технічний
університет України
"Київський політехнічний
інститут",
Тел. 454-91-23

У номері:

Економіка та організація
виробництва

Електроніка, радіотехніка та
засоби телекомунікації

Енергетика та екергогенуючі
технології

Інформаційні технології,
системний аналіз та керування

Матеріалознавство
та машинобудування

Приладобудування
та інформаційно-вимірювальна
техніка

Проблеми біотехнології

Проблеми хімії та хімічної
технології

Теоретичні та прикладні
проблеми фізико-математичних
наук

К.М. Білоткач, О.П. Трохименко,
Л.М. Коршун, А.І. Салюк

НАСАДКОВА СИСТЕМА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН ТВАРИН ІЗ ПЕРЕМІШУЮЧИМ І АЕРУЮЧИМ ПРИСТРОЄМ - МОДИФІКОВАНИМ ВОДОПІДЙОМНИКОМ АРХІМЕДА

Вступ

Однією з важливих рис сучасної біотехнології культур клітин тварин є не тільки виробництво традиційних біологічно активних речовин (БАР), таких, наприклад, як лейкоцитарний інтерферон, але й щорічне виготовлення нових удосконалених медичних чи ветеринарних вакцин або виготовлення субстанцій для лабораторного використання. В таких динамічних умовах розвитку біотехнологічної галузі перед лабораторіями культур клітин (ІСК) часто стоїть питання, як швидко, економічно і в достатній кількості отримати той чи інший продукт через нарощування біомаси повільно зростаючих і чутливих до умов культивування клітин тварин. І хоч на сьогодні на світовому ринку обладнання пропонується до продажу чимало систем для культивування КК тварин, однак далеко не кожна лабораторія України спроможна дозволити, собі їх придбати. Особливо незахищені в даному випадку біотехнологічні лабораторії, однією із задач яких є виготовлення ветеринарних імунобіологічних препаратів.

Протиротавірусна інактивована вакцина РШ-4 у польових дослідженнях показала високі рівні імунізації і була рекомендована до виробництва [1]. Однак однією з умов її виробництва є одержання біомаси ротавірусів, які можуть репродукуватись тільки в чутливих поверхнево-залежних культурах клітин (ПКК). Разом з тим, істотне підвищення виходу ротавірусів можливе лише за умов створення систем культивування ПКК високої продуктивності. Зараз при використанні класичних методів культивування КК, а саме так званої матрасної технології, виробництво вакцини не рентабельне. Тому ми розпочали розробку нової біотехнології виготовлення протиротавірусної вакцини ветеринарного призначення РШ-4, зорієнтованої на лабораторно-промислове культивування чутливих для ротавірусу КК із використанням вітчизняної си-

ровинно-ресурсної бази для виготовлення системи культивування.

Так, ми запропонували новий спосіб культивування поверхнево-залежних культур клітин у насадці, виготовленій з ущільнених стрічок поліетилену [2, 3], що значно збільшило площу, придатну для прикріплення і росту клітин, а отже, дозволило підвищити остаточну кількість клітин на одиницю використаного об'єму середовища [3]. Крім того, з метою подальшого підвищення виходу клітин з одиниці поверхні культивування, а отже, й підвищення виходу ротавірусних антигенів було розроблено напівбезперервний режим культивування ПКК з порційним внесенням субстратів [4]. Однак при культивуванні ПКК ембріональної версенізованої свинячої нирки (СНЕВ) на насадці в посудині без постійного перемішування виявили, що клітини концентрувались у нижній частині насадки, де й утворювалась локальна зона росту [3, 5]. Таким чином, без доповнення посудини культивування пристроєм для постійного перемішування середовища було неможливо рівномірно засівати і надалі масштабувати систему культивування з поліетиленовою насадкою, через що неможливо було й досягти бажаного виходу ротавірусу.

Постановка задачі

Мета досліджень - з'ясування принципової можливості використання простих конструкційних елементів, зокрема так званого водопідйомника Архімеда, в середині біореактора для постійного перекачування середовища культивування через насадку, перевірка ефективності запроєктованого пристрою з використанням культуральних та аналітичних методів, а також визначення меж масштабування запропонованої насадкової системи культивування.

Матеріали і методи

При дослідженні використовувалась поверхнево-залежна срсцеплювальна культура клітин СНЕВ, отримана в Київському інституті ветеринарної медицини. ПКК СНЕВ культивували впродовж 20 пасажів на кафедрі вірусології Київської медичної академії післядипломної освіти ім. Ц.Л. Шупика. Як середовище культивування при пасажуванні культури використовувалось ростове живильне середовище на основі середовищ ДЕММ (пропис D 5468, Sigma) і 199 (пропис M 5017, Sigma), змішаних у

співвідношенні 1:1 та з додаванням п'яти відсотків сироватки крові ембріонів корів (СКЕК) (Perbio Science, Бельгія) і антибіотиків: 100од/мл пеніциліну і 100мкг/мл стрептоміцину.

Поліетиленова насадка виготовлялась із плівки поліетилену низької щільності (ГОСТ 10354-82 для застосування в харчовій промисловості та сільському господарстві) згідно з послідовністю стадій, наведених у таблиці.

Для культивування на насадці використовували зазначену вище суміш ростових живильних середовищ із додаванням 25%-ного середовища кондиціювання, яке було зібране від ПМК СНЕВ при її культивуванні протягом 24-48 год. У виготовленому середовищі концентрацію глюкози доводили до 2,8 г/л.

Суспензію клітин ПМК СНЕВ у посівній концентрації 210⁶клітин/мл готували в ростовому середовищі для культивування. Після внесення клітин у біореактор перемішування не припинялося протягом всього часу культиву-

вання ПМК СНЕВ у насадковій системі культивування протягом перших 72 год у періодичному ре-

жимі, після чого переходили до культивування в напівбезперервному режимі з порційним внесенням живильного середовища та субстратів росту за запропонованим раніше алгоритмом, в основу якого покладено припущення про експоненціальний ріст культури та постійність у часі економічного коефіцієнта $Y_{x/s}$ [4]. Як основні енергетичні субстрати росту використовували розчини глютаміну (0,1 г/л) і глюкози (29г/л), додаючи їх до середовища росту. Під час культивування клітин концентрацію глюкози в середовищі підтримували на рівні 0,5 г/л. Для вимірювання концентрації глюкози використовували глюкометр "Precision Q-I-D glucose meter" (Medisense, Abbott Laboratories Inc.). Оцінку проліферативної активності ПМК СНЕВ проводили оптичним методом за допомогою стандартного реактива "Alamar-Blue" [6]. Розрахункову частину для пошуку оптимальних геометричних параметрів модифікованого водопідійомника Архімед? проводили, використовуючи числові методи та програмне забезпечення Mathcad.

Таблиця. Стадії виготовлення та підготовки носія (насадки)

№ стадії	Найменування стадії	Операція
1	Виготовлення носіїв	Нарізання плівки поліетилену на стрічки за вертки до 2мм, завдовжки до 100мм
2	Знежирювання носіїв	Короткочасне промивання (до 5 хв) виготовлених носіїв у хромовій суміші
3	Промивання носіїв	Двадцятиразове промивання знежирених носіїв у проточній і дистильованій воді
4	Випрямлення носіїв	Короткочасна (до 2хв) термічна обробка (/ = 100°C) носіїв у дистильованій волі
5	Формування насадки	Намотування м'яких термічно оброблених за п. 4 носіїв на стержень, що обертається
6	Монтаж насадки	Закріплення підготовленої насадки в посудині для культивування через притискання перфорованим полімерним диском чи затисканням у перфорованому полімерному барабані
7	Підготовка до стерилізації	Дворазове промивання закріпленої в посудині для культивування насадки нестерильним фізіологічним розчином із подальшим заповненням 2/3 посудини нестерильним фізіологічним розчином
8	Стерилізація насадки	Парова стерилізація насадки! яка занурена у фізіологічний розчин, при 15°C впродовж 30хв
9	Промивання насадки	Видалення фізіологічного розчину і одноразове промивання насадки стерильним розчином Хенкса для культур клітин та живильним ростовим середовищем

Результата і обговорення

На сьогодні відомо, що проточні насадкові системи культивування КК часто характеризуються нерівномірністю розподілення потоків середовища, внаслідок чого спостерігаються градієнти концентрацій клітин по висоті насадки. Тим часом набули поширення конструкції з так званою затопленою насадкою, в яких носії вміщено в зафіксований біля дна апарата короб [7]. Такі "затоплені" насадки не мають згаданого недоліку щодо рівномірності розподілення потоків середовища. Тому проектування власної насадкової системи культивування було вирішено вести в напрямку конструювання системи культивування із "затопленою" насадкою.

З іншого боку, системи із "затопленими насадками", як правило, монтуються з фільтрувальним елементом, який одночасно слугує і для аерації, і для рециркуляції середовища, а також для запобігання вимивання клітин із зони культивування та попередження проникнення пухирців повітря в біореактор [7]. Аерація середовища в таких системах може проводитись як в середині фільтрувального елемента, так і назов-

ні реактора - продуванням збагаченої киснем газової суміші через шар середовища в додатковому модулі [7]. Однак, на нашу думку, наявність складного фільтрувального елемента і додаткового модуля ускладнює обслуговування системи культивування та збільшує її вартість. Тому увага була привернута до водопідйомника Архімеда [8] як простого пристрою, що може нагнати рідину з постійною об'ємною витратою нетравматичним для клітин способом. Крім того, замінивши водоутримуючий елемент - трубку чи шнек на напівтрубу, його можна модифікувати також і в поверхню для аерації середовища культивування. Таким чином, для рециркуляції і аерації середовища культивування ми запропонували, використати водопідйомник Архімеда з певними модифікаціями форми та геометричних розмірів його конструкційних елементів. Як водоутримуючий елемент пропонується використовувати напівтрубу, радіус якої становить 0,1-0,4 від радіуса зеруючого пристро-

ю. Принцип роботи запропонованої системи аерації і перемішування середовища (рис. 1) по-

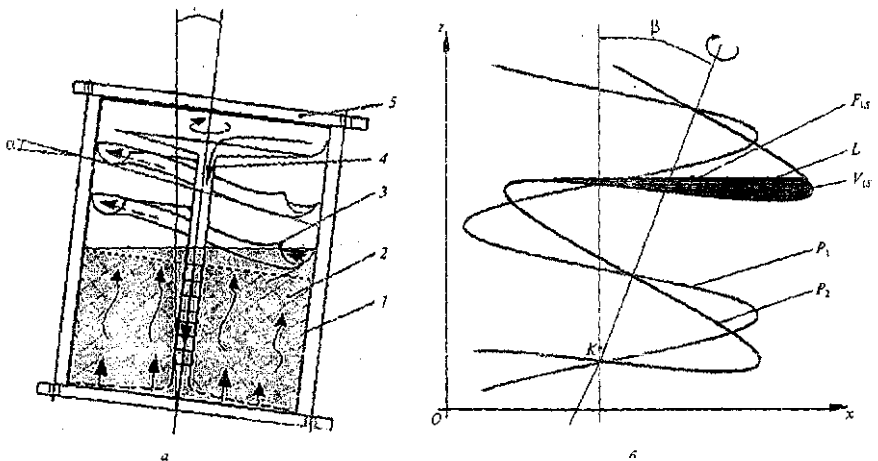


Рис. 1. Принципова схема роботи запропонованої системи культивування КК на насадках із перемішувачем і аеруючим пристроєм - модифікованим водопідйомником Архімеда: а - розташування складових частин біореактора; 1 - посудина для культивування; 2 - сітчастий короб із зафіксованою насадкою; 3 - модифікований водопідйомник Архімеда; 4 - циркуляційна труба; 5 - кришка; б - проекція гвинтової осі поверхні аерації на площину Ox . L - початкове положення осі; Y - робоче положення осі під кутом P ; L - частина осі поверхні аерації, на якій утримується середовище - у робочому положенні знаходиться нижче інших частин осі; K - точка перетину похміснової - проекції гвинтової лінії, нахиленої до осі xOz на кут P ; $V_{1,2}$ - порція середовища культивування, яка утримується одиничним витком; $F_{1,2}$ - поверхня контакту фаз середовище/повітряна фаза

лягає в тому, що за умови нахилу аеруючого пристрою - модифікованого водопідійомника Архімеда, на кут (α) більший, ніж кут дотичної до гвинтової осі поверхні аерації (α_0) та при обертанні системи аерації в протилежному напрямку її підйому, середовище спочатку зачерпується поверхнею аерації, а далі під дією сил гравітації та внаслідок прокручування поверхні аерації під середовищем постійно перетікає по рухомій поверхні і переміщується догори невеликими порціями, утворюючи потоки малої глибини, за рахунок чого й відбувається його аерація. Наприкінці шляху по поверхні аерації середовище стікає до внутрішньої циркуляційної труби, і, таким чином, відбувається постійне прокачування середовища через шар насадки.

Запропонований поверхневий спосіб аерації середовища є не травматичним методом насичення середовища культивування киснем, однак практично він не використовується для промислових цілей, оскільки для випадків поверхневої аерації без перемішування середовища коефіцієнт масопередачі кисню k_L є дуже малий - близько $3 \cdot 10^{-6} \text{ м/с}$ [9]. Але оптимізувавши значення геометричних параметрів водоутримуючих елементів водопідійомника Архімеда так, щоб було забезпечено максимальне співвідношення поверхні контакту фаз до об'єму середовища культивування а та забезпечився рух середовища по поверхні аерації потоком малої глибини, значення k_L можна істотно підвищити. Так, використовуючи числові методи і програмне забезпечення Mathcad, ми визначили співвідношення значень кутів α - кута дотичної до гвинтової осі поверхні аерації та (α_0 - кута нахилу модифікованого водопідійомника Архімеда, при яких площа контакту фаз на витках пристрою була найбільшою. Далі обрали прийнятну пару значень кутів α і α_0 , а саме 2 і 12° відповідно, згідно з моделлю "оновлення поверхні фазового контакту", якою описується процес поверхневої аерації потоків рідин, на основі рівняння Хігбі, модифікованого Данквертсом [10, 11]:

$$k_L = \sqrt{\frac{D_{O_2} U}{\pi h}}$$

де k_L - коефіцієнт масоперееносу кисню у півлрку контакту фаз, м/с; D_{O_2} - коефіцієнт дифузії юісно, м²/с, U - середня швидкість руху потоку середовища, м/с; h - глибина потоку середовища, м.

Були оцінені теоретичні значення об'ємного коефіцієнта масоперееносу кисню k_L за умови нахилу аеруючого пристрою - модифікованого водопідійомника Архімеда, на кут (α) більший, ніж кут дотичної до гвинтової осі поверхні аерації (α_0) та при обертанні системи аерації в протилежному напрямку її підйому, середовище спочатку зачерпується поверхнею аерації, а далі під дією сил гравітації та внаслідок прокручування поверхні аерації під середовищем постійно перетікає по рухомій поверхні і переміщується догори невеликими порціями, утворюючи потоки малої глибини, за рахунок чого й відбувається його аерація. Наприкінці шляху по поверхні аерації середовище стікає до внутрішньої циркуляційної труби, і, таким чином, відбувається постійне прокачування середовища через шар насадки.

вище k_L за максимальної допустимої швидкості руху середовища по поверхні аерації (швидкість руху рідини самопливом - $0,5 \text{ м/с}$, [10]), коефіцієнта дифузії кисню, що був у п'ять раз меншим за такий же для дистильованої води, та кількості витків поверхні аерації, яка дорівнювала 5 [11]). Результати розрахунків подано у вигляді тривимірної гістограми залежності складної функції k_L від змінних радіуса R системи аерації (практично радіус апарата) і співвідношення K - відношення висоти насадки H до радіуса апарата R .

На рис. 2, а, за даними літератури [12], додатково побудовано площину межі значень об'ємного коефіцієнта масопередачі k_L для систем із поверхневою аерацією і перемішуванням: $k_L = 0,004 \text{ с}^{-1}$. Як видно з поданого графіка, оцінені за моделлю "оновлення поверхні фазового контакту", значення k_L вкладаються в очікуваний діапазон рівня інтенсивності поверхневої аерації середовища при його перемішуванні і 121. Тим часом, отримані значення знаходяться вище рівня аерації для систем із статичною поверхневою середовища, $k_L = 10^{-6}$. Отже, запропонована система перемішування і аерації спроможна замінити перемішуючі пристрої з електричним або магнітним приводом. Крім того, запропонований перемішуючий пристрій може бути вмонтований всередину біореактора, що дає можливість уникнути знищення клітин при їх паданні в проєктр між рухомих пристроєм і стінками реактора. В даному випадку також уникають необхідності використання парового затвору на вході валу всередину апарата для культивування. Найціннішим у використанні модифікованого водопідійомника Архімеда є те, що дана система аерації не потребує додаткових об'ємів середовища культивування для розміщення перемішуючого пристрою.

При перевірці режиму гідродинамічного руху середовища для максимальної швидкості його руху по поверхні аерації в каналах насадки було помічено, що він відповідає ламінарній течії, оскільки значення Рейнольдса не перевищує 50 [10]. Отже, піл час руху середовища в каналах насадки в зазначеному діапазоні швидкостей гідродинамічні умови культивування знаходитимуться в оптимальному діапазоні.

Як видно з рис. 2, а, в разі використання доної модифікації водопідійомника Архімеда на величину k_L , як і очікувалось, негативно впливає збільшення R і H , проте вплив K порівняно з впливом збільшення радіуса насадки є більш знач-

ним. Отже, подальше масштабування систем культивування з використанням запропонованої модифікації водопідйомника Архімеда потребує визначення необхідного рівня переносу кисню в середовище.

Для того щоб оцінити необхідний рівень переносу кисню в середовище та обрати пари значень R і Y , було використано принципове положення про те, що культивування аеробних біологічних агентів (БА) можливе за умови, коли в будь-який момент часу рівень переносу кисню в середовище (РПК) дорівнює рівню споживання кисню (РСК) або перевищує його [11].

Значення максимального рівня споживання кисню $РСК_{max}$ можна визначити за формулою [11]

$$РСК_{max} = Q_{O_2, max} = \mu_{max} X / Y_{x/O_2} = q_{O_2} X_{max}, \quad (2)$$

де Q_{O_2} – об'ємний коефіцієнт споживання (утилізації) кисню, $кг\ O_2/(м^3 \cdot с)$ чи моль $O_2/(м^3 \cdot с)$; μ_{max} – максимальна питома швидкість росту БА, $год^{-1}$; X – кількість клітин, 10^9 клітин/ $м^3$; Y_{x/O_2} – економічний коефіцієнт перетворення спожитого кисню в клітинну біомасу, 10^9 клітин/ $кг\ O_2$ або 10^9 клітин/моль O_2 ; q_{O_2} – питомий рівень (швидкість) споживання кисню, $кг\ O_2/(10^9$ клітин $\cdot с)$ або моль $O_2/(10^9$ клітин $\cdot с)$; X_{max} – максимальна кількість клітин, яка може вирости в заданих умовах культивування, 10^9 клітин/ $м^3$.

Враховуючи, що запропонована насадкова система культивування призначена для використання в лабораторно-промислових умовах для культивування в невеликих об'ємах і з використанням повільно зростаючих БА, які іммобілізовані в короткій колонії, можна стверджувати, що дана система культивування еквівалентна системі з високою швидкістю рециркуляції, а отже, рівень переносу кисню РПК можна оцінити за формулою [11]

$$РПК = (C^* - C_t) k_L a, \quad (3)$$

де $C^* - C_t = \Delta C$ – рушійна сила процесу переносу кисню в середовище, $кг/м^3$ або моль/ $л \cdot м^3$; k_L – коефіцієнт масопереносу кисню в плівку поверхні контакту фаз, $м/с$; $k_L a$ – об'ємний коефіцієнт масопередачі кисню, $с^{-1}$.

Отже, нерівність (4) буде характеризувати продуктивність запропонованої системи культивування щодо кількості клітин, які можуть підтримуватись у фізіологічно активному стані за даних умов аерації та за умови, що концентрації

всіх інших субстраті» (крім кисню) та інгібіторів перебувають на оптимальному рівні

$$X_{max} \leq \frac{\Delta C k_L a}{q_{O_2}}. \quad (4)$$

Значення питомого рівня споживання кисню подібних до ПКК СНЕВ культур клітин тварин (ВНК, Vero) становить близько $0,002 \cdot 10^9$ $кг\ O_2/(с \cdot 10^6$ клітин) [12]. Згідно з літературними даними, рівень розчиненого кисню в середовищі для культивування КК тварин, має знаходитись у межах від 15 до 80% від концентрації насичення середовища киснем повітря ($Y \cdot 10^4$ $кг/м^3$) [9]. Отже, для розрахунку було взято значення рушійної сили протікання масообміну, яка дорівнює 45% від концентрації насичення, що лежить посередині допустимого інтервалу концентрацій розчиненого кисню. Результати розрахунку X_{max} подано у вигляді тривимірної гістограми складної функції $A''_{sk} = f(\alpha, H)$ (рис. 2, б).

З огляду на отримані результати можна сказати, що при культивуванні, в системах, оснащених даною модифікацією водопідйомника Архімеда, та з розмірами насадки: висота - від 0,02 до 0,26 м; радіус - від 0,04 до 0,12 м, що еквівалентно системам культивування з об'ємом середовища культивування від 0,1 до 12 л, кількість клітин, які будуть забезпечені киснем достатньою мірою, буде на рівні стандартних систем культивування. З іншого боку, згідно з літературними даними, при використанні мікроносіїв як поверхні росту, вихід клітин може досягти $3 \cdot 10^9$ клітин/мл [13]. Таку їх кількість можна одержати в системі культивування із запропонованим перемішувальним пристроєм з висотою насадки до 0,1 м та її радіусом до 0,22 м, що відповідає об'єму культивування до 15 л. Однак, використовуючи дану модифікацію водопідйомника Архімеда, не можна забезпечити киснем вирощені на насадці клітини при культивуванні в режимі перфузії - $2,510^9$ кл/мл [13].

Отже, виходячи з необхідності отримання певної кількості продуктів життєдіяльності КК та відомому рівню продукції БАР, можна обрати геометричні параметри системи культивування, які задовольняють виробничі потреби. Так, згідно з попередніми дослідженнями, для забезпечення високого виходу титру ротавірусу [4] оптимальна концентрація клітин на 1 см^2 поверхні росту має становити близько $4,510^5$ кл/см² (тобто при об'ємі середовища культивування 3 л (висота і радіус насадки - 0,1 м) та врахуванні,

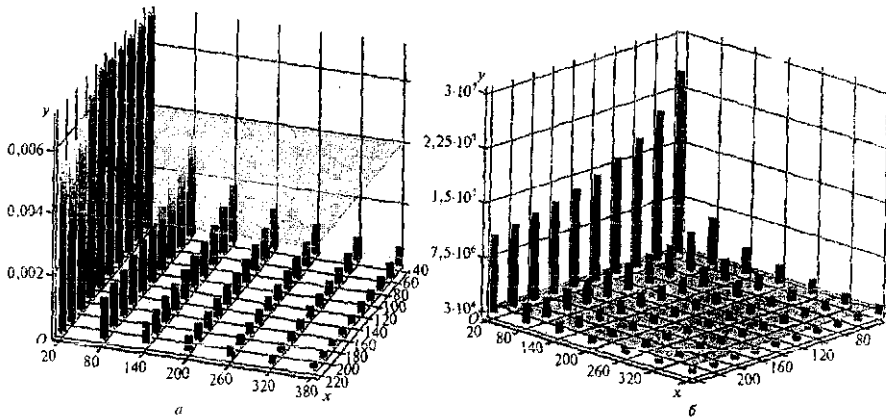


Рис. 2. Гістограми: а - оцінені за моделлю "оновлення фазового контакту" та за заданими геометричними параметрами значення об'ємного коефіцієнта масопередачі кр/ площинною позначено; б - оцінена за заданими геометричними параметрами для систем із п'єрсухезною аерацією та перемішуванням; об'ємного коефіцієнта масопередачі; площинною позначено максимально досяжна концентрація клітин, X/мл; площинною позначено приблизну кількість іспітин, що може бути отримана при періодичному культивуванні в різних системах. По осі Ox відкладено висоту насадки Y , м; по осі Oy - радіус насадки L , м

витрати цього середовища становлять на $1 \text{ см}^3 - 0,1 \text{ мл}$, поверхня для прикріплення і росту клітин на насадці становитиме 3 м^2 . Таким чином, остаточна щільність клітин буде близько $1,3 \cdot 10^6$ клітин на 1 мл . З іншого боку, оцінювана концентрація клітин становить близько $1,5 \cdot 10^6$ кл/мл. Тому при згаданих параметрах запропонованої системи культивування оцінена кількість клітин не буде перевищувати їх оптимальну для забезпечення максимального титру рота-вірусу 1 см^2 .

Таким чином, при використанні модифікованого водопідійомника Архімеда для перемішування та аерації середовища об'ємом 3 л буде забезпечено високий рівень аерації, через що плітну насакову систему культивування об'ємом 3 л було оснащено модифікованим водопідійомником Архімеда з радіусом від центральної осі до гвинтової осі поверхні аерації $0,1 \text{ м}$ та з поверхнею аерації, вісь якої підіймається під кутом 2° . Враховуючи, що запропонована насадова система культивування призначена для використання в лабораторно-промислових умовах для культивування в невеликих об'ємах, модифікований водопідійомник Архімеда було закрішено всередині посудини для культивування, яка оберталася одночасно з аератором відносно осі, нахилена до горизонту під кутом ($\beta = 12^\circ$). Така конструкція системи культивування відрізнялася сво-

єю простотою в обслуговуванні, а ризик контамінації зводився до мінімуму. На кришці апарата для тимчасового пасивного газообміну було розташовано повітряний мембранний фільтр.

Оскільки прямими методами було неможливо визначити кількість клітин, що культивуються в насадці, то для її оцінки використовували визначення проліферативної активності ПКК СНЕВ, яку проводили оптичним методом, використовуючи стандартний розчин red-ox індикатора "Alamar-Blue" [6]. Відомо, що штенсивність відновлення та зміни кольору розчину "Alamar Blue" пропорційна кількості проліферуючих клітин у культурі. При цьому оптична густина "Alamar Blue" при інкубації з фізіологічно активними клітинами збільшується. Отже, для оцінки накопиченої в насадковому біореакторі кількості клітин ПКК СНЕВ в середовище культивування було внесено стандартний розчин "Alamar Blue" в його остаточній концентрації $0,001$ після чого культивування продовжувалось ще три години. Для порівняння отриманої в біореакторі кількості клітин аналогічно було внесено стандартний розчин "Alamar Blue" в середовище культивування над сформованим моношаром ПКК СНЕВ, що культивувались в $1,5$ -літровому матрасі. Ці клітини також інкубували протягом трьох годин. Далі відбирали проби середовища з біореактора і матраса, порівню-

ючи оптичну густину проб середовищ вимірюванням її на спектрофотометрі Multiscan M-700 при довжинах хвиль 610 і 550 нм. Після видалення середовища культивування над клітинами ПМК СНЕВ, які зростали в матрасі, моношар клітин було версенізовано, а кількість клітин підрахована в гемацитометрі за стандартною методикою. За результатами підрахунку, в матрасі кількість клітин на 1 мл поживного середовища становила близько $1,6 \cdot 10^8$ при оптичній густині з "Alamar Blue" 0,0688 OD. Оптична ж густина зразків середовища з біореактора становила 0,1313 OD, що майже у два рази більше, ніж OD середовища, отриманого з матрасної культури, що свідчить про інтенсивність проліферації ПМК СНЕВ у запропонованій системі культивування.

Для дослідження рівномірності розселення клітин по насадці їх було оброблено спиртовим розчином кристалічного фіолетового. Після забарвлення клітин насадку розрізали вздовж її вертикальної осі. На розрізі ріст клітин було помічено на всіх ділянках насадки - як у придонній, так і у верхній її частинах. Отже, застосування пристрою для рециркуляції середовища - модифікованого водопідіймника Архімеда - дозволяє уникнути градієнтного розселення клітин по висоті насадки, і, таким чином, підвищити вихід клітин. Крім того, у глибині насадки не було виявлено зон загибелі клітин, що свідчило про забезпечення клітин киснем навіть у глибині насадки що неможливо було б зробити, використовуючи лише поверхневий спосіб аерації. Та все ж визначення реального об'ємного коефіцієнта масопереносу k_L для виявлення рівня забезпечення клітин киснем потребує додаткових експериментальних досліджень. У свою чергу, можна зауважити, що чер-

гове збільшення рівня аерації середовища киснем для даної системи культивування можливе завдяки розробці аналогічного аеруючого пристрою з кількома поверхнями аерації або застосуванням текстурованих матеріалів для виготовлення поверхні аерації, що може дозволити збільшити рівень турбулентності потоку середовища. Доцільність подібних подальших досліджень у напрямку пошуку шляхів збільшення k_L залежить від питомого рівня споживання кисню тими біологічними агентами, які плануються до культивування в даній насадковій системі.

Висновки

1. Під час досліджень було з'ясовано, що як простий конструкційний елемент для рециркуляції і аерації середовища всередині апарата при культивуванні ПМК на поліетиленовій насадці можна успішно використовувати модифікований водопідіймник Архімеда.

2. Перевірка ефективності застосування запропонованого перемішуючого і аеруючого пристрою показала його позитивний вплив на рівномірність розселення клітин по висоті насадки та на загальний вихід клітин порівняно із стандартною "матрасною" технологією.

3. Проведені теоретичні розрахунки засвідчили, що масштабування даної насадкової системи культивування можливе до 12 л. Подальше ж масштабування потребує проведення додаткових експериментальних досліджень щодо реальних значень k_L та в напрямку застосування текстурованих матеріалів для виготовлення поверхні аерації, а також конструкторської роботи з проектування модифікованого водопідіймника Архімеда з кількома поверхнями аерації.

ванного в систему культивування, дозволяєт
улучшити характеристики расселения клеток по
высоте насадки и, как следствие, получить больш-
шие урожаи клеток по сравнению с выходом кле-
ток по классической "матрасной" технологии.

1. *Гурін В.М., Дзюблик /Л., Трохименко ОМ. та ін. Нова інактивована вакцина для профілактики рота вірусно-гастроентериту свиней // Ветеринарна медицина України). - і 997.- №9. - С. 8-9.*
2. *Декларційний патент на винахід. 69IU7 А. Спосіб культивування поверхнево-залежних культур клітин тварин та людини вік 16.08.2004 J) Бюл. № 8.*
3. *і/шжл'Кі*/., Сьютюк А-., Трохиме;іКо О.П. изі:: Шгучні матері&ти як носії для культивування поверхнево-залежних культур клітин // Наукові праці Національного ун-ту харчових технологій. - 2004. - № 35. - С. S0-S2.*
4. *Білоткач К.М., Трохименко О.П., Дзюблик ІВ. та ін. КудЛУНііуЗ'ЧНЯ рО"и? Бі русі 5 У.?. ПОЛ'МС^ИП'ХНОСІЯЖ одержанні культуральної інзктивешної лротирусаірус-кої вакцини // Вісн. Кмівськ. най. ун-ту ім. Тараса Шевченка. - 2005. - №44. - С. 6-10.*
5. *Вілоткач К. М., Салюк А. /., Трохименко О. Я. та ін. Культивування лouverнево-залежних культур клітин тварин на нетрадиційних матеріалах. Дослідження впливу окиснювальної модифікації поліетиленової плівки на вихід біомаси клітин // Вісн. Тернопільського держ. технічного ун-ту. - 2004. - 9, № 2- - С. 160—167.*
6. *Fields R.Dy Lancaster MY. Dual attribute continuous monitoring of ceU proUeration/cytotoxicHy // Amer. Biotechnology Laboratory. - 1993. - N 12(4). - P. 4S-S0.*
7. *Chester S. ffo, Daniel IC. Wang, Animal ceH Bioreactors. - Bbttenvortii-Hememann, 1991. - 494 p.*
8. *Рьлт?.* № Приспособлення для ікутьема вольт. - СПб.: Типо-Литографія К.І. Лентковського, 1899. - 207 с.*
9. *Сти ер Р.Е., Адаме Г.Д., Гриффите Дж. В. и др. Биотехнология клеток животных / Пер. с англ. - М.: Мир, 1989. - Т. I. - 520 с.*
10. *Дытнерский Ю.И. Процессы и аппараты химической технологии. Ч. 7.- М.: Химия, 200? - Ж г*
11. *Бейли Дж., Олтис Д. Основы биохимической инженерии, Ч. I. / Пер. с англ. - М.: Мир, 1989. - 692 с.*
12. *Doyle A., Griffiths J.B. Celt and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. - John Wiley & sons, 1998. - 331 p.*
13. *Сергеев 8-А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. - К.: Урожай, 1990. - і.Sj с.*

Рекомендована Радою факультету біо-
технології і біотехніки НТУУ "КШ"

Надійшла до редакції
5 жовтня 2005 року