

УДК 519.863

Ю.М. Пенчук, канд. техн. наук
І.В. Лич, канд. біол. наук
А.С. Мороз, студ.
О.С. Соколовський, асп.
Національний університет
харчових технологій
Ю.В. Коломієць, канд. біол. наук
Національний університет
біоресурсів і природокористу-
вання 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 мікроклональному 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 «ворсистої 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 ембріогенних клітин і ворсистої 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 розриватись. 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;

© Пенчук Ю.М., Лич О.І., Коломієць І.В., Мороз А.С., Соколовський О.С., 2012

2. виробництво, як правило, нижче. Наприклад, незважаючи на кілька років оптимізаційних досліджень продуктивність шиконіну з безперервної культури *Lythspertum 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.

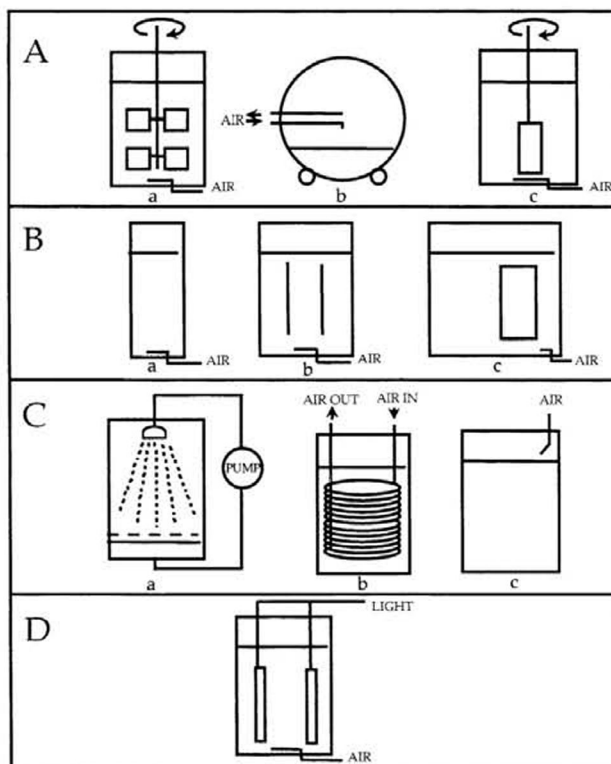
Проектування та експлуатація біореакторів в основному визначається біологічними потребами і технічними вимогами, які часто включають в себе цілий ряд факторів: ефективність передачі кисню, перемішування, низькість гідродинамічного опору, ефективність контролю фізико-хімічних параметрів середовища тощо. 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.

Нещодавно було розроблено біореактор з гвинто-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.

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; мішура 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.



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].

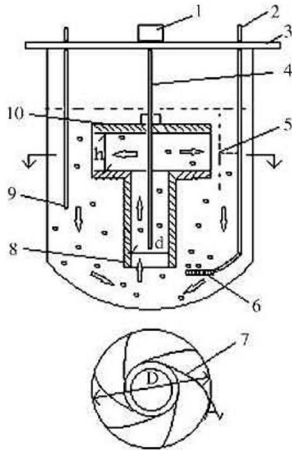


Рис. 2 Біореактор з відцентровими крильчатками [12]

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.



Рис. 3 Лабораторний ферментер для вирощування клітин рослини

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 перемішуючий 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.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1986. — 272 с.
2. Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Н.: Наука, 1990. — 333 с.

3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрোকлонального размножения растений. — Киев: Наук.думка, 1992. — 228 с.
4. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіоло-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
5. Кунах В.А., Можилевская Л.П., Губарь С.И. Особенности получения и изменчивость суспензионных культур и клеточных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina in vitro* // Биотехнология. — 2001. — №4. — с. 9-21.
6. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко В.О. Основы биотехнології рослин. — К., 2000. — 247 с.
7. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — К.: Наук.думка, 1990. — 280 с.
8. George E.F. Plant propagation by tissue culture // The Technology. — 2000. — P. 302-335.
9. Hahlbrock K. Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells // Plant Tissue and Cell Culture. — 1987. — 2. — P. 357-362.
10. Merillon J.M., Rideau M., Chenieux J. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine, and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells in vitro // Planta Med. — 2003. — 50, N6. — P. 497-501.
11. Nabors M.W., Heyser J.W., Dykes T.A., Mott K.J. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures // Planta. — 1993. — 157. — P. 385-391.
12. Ohta S., Yatazawa M. *Nicotiana plumbaginifolia*: In vitro production of nicotine // 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 // J. Biotechnol. — 2000. — 10, N 1. — P. 1-26.

*Ю.Н. Пенчук, И.В. Лич, Ю.В. Коломиец,
А.С. Мороз, А.С. Соколовський*

Оборудование для выращивания растительных клеток глубинным способом
В работе сделан анализ существующих систем, которые используются при культивировании растительных клеток для дальнейшего использования в технологии получения биологически активных веществ и при крупномасштабном микрোকлональном размножении растений. Выбраны основные базовые модели для разработки и конструирования биореактора, который в будущем будет использован для культивирования растительных клеток.

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

*Yu. Penchuk, I. Lich, Y. Kolomiets,
A. Moroz, A. Sokolovskiy*

Equipment for growing plant cells during submerged cultivation

The analysis of the existing systems, used for cultivation of vegetative cells for the further use in technology of biologically active substances obtaining and at large-scale microclonal reproduction of plants is presented. The primary base models for working out and designing the bioreactor for the future use for cultivation of vegetative cells were chosen.

Constructed apparatus is equipped with a mixing device as Archimedes screw that allows to mix the culture broth gently. In addition, this type of stirrer generates a directed flow, maintaining cells in suspension. Aeration is carried out through a bubbler, which is a porous glass membrane. A diffuser for additional distribution of oxygen in to the cultural broth is located in the middle of the apparatus.

Keywords: bioreactor, cell culture, aeration, biologically active substances.

e-mail: jimp@ukr.net

Надійшла до редколегії 15.01.2012 р.