

Особенности выращивания суспензионных культур клеток высших растений:

- высокая чувствительность крупных, вакуолизированных растительных клеток к физико-механическим воздействиям;
- высокие требования к обеспечению асептических условий вследствие большой продолжительности ростового цикла и относительно низкой скорости роста (в сравнении с микробными и животными клетками);
- необходимость обеспечения равномерного перемешивания вследствие высокой скорости седиментации клеточных агрегатов и возрастания вязкости суспензий при высоких концентрациях клеточной биомассы;
- интенсивное пенообразование и адгезия клеточной биомассы к стенкам культивационных сосудов;
- сложность механизмов регуляции роста клеток и биосинтеза целевых продуктов.

⇒ **Высокие требования к выбору систем культивирования и систем контроля процесса выращивания**

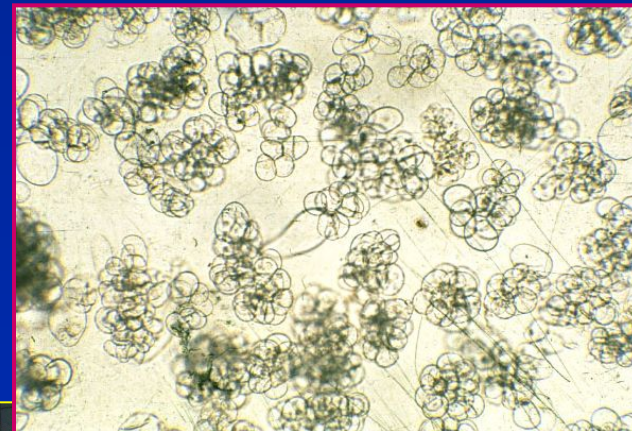
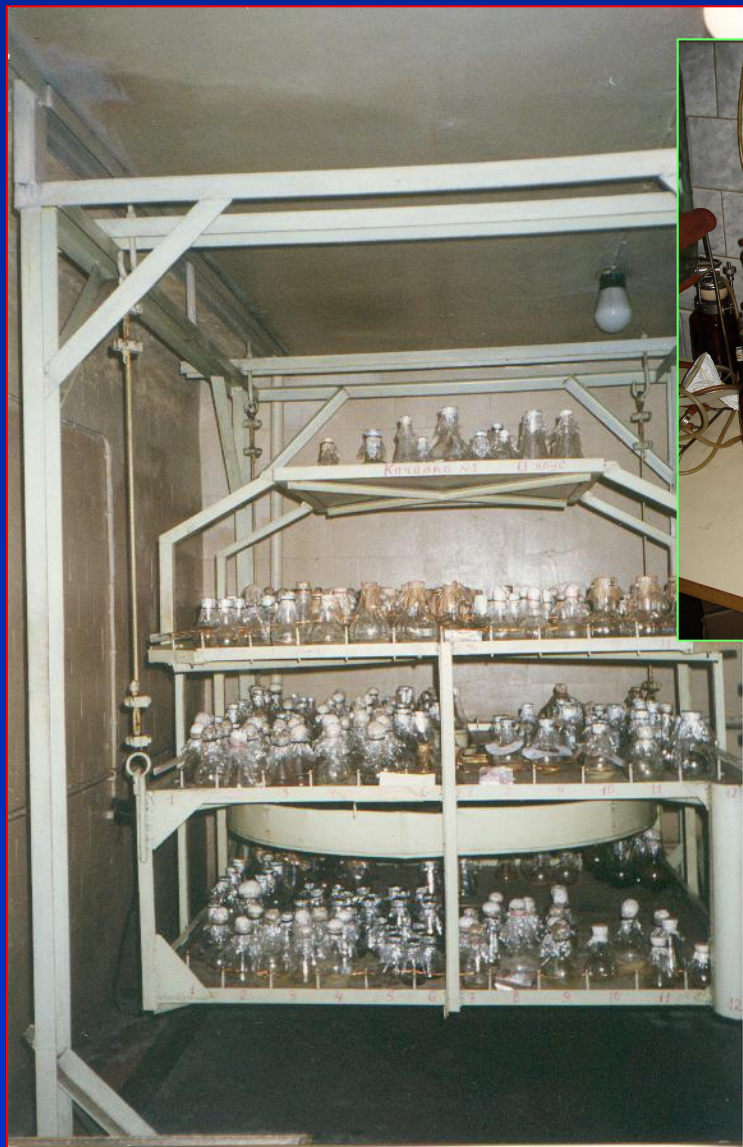
Системы выращивания культур клеток высших растений

1. Колбы на качалке
2. Роллеры
3. Аппаратное культивирование (биореакторы).

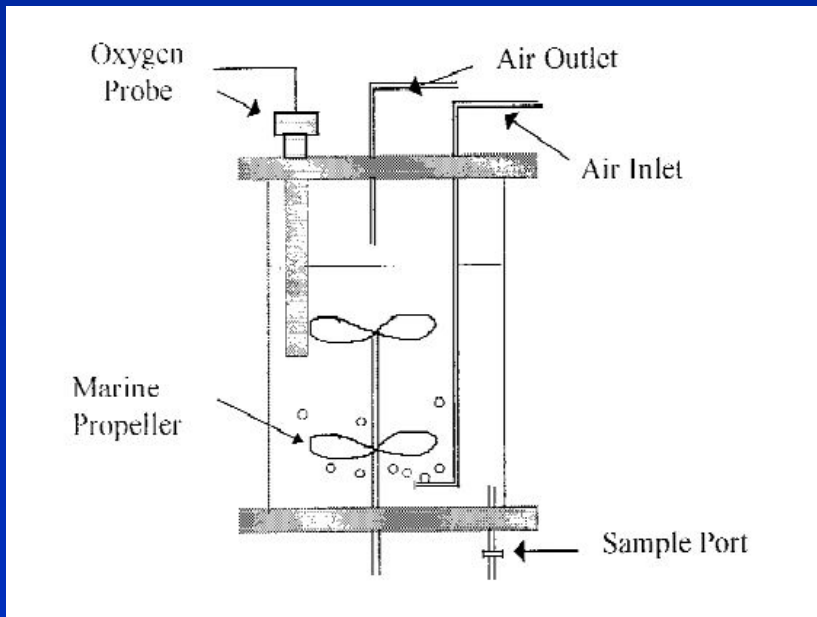
Преимущества биореакторов:

- возможность **контролировать** процесс (pH, pO₂, pCO₂, t^o, ионы, плотность)
- возможность **управлять** процессом

Выращивание суспензионных культур клеток в колбах на качалке и биореакторах



Особенности аппаратного глубинного выращивания растительных клеток:



Культивирование в биореакторе:

- дозированное поступление в аппарат определенных потоков (инокулята, воздуха или газовых смесей, питательных компонентов, пеногасителей, и т. д.);
- отвод из него тепла, отработанного воздуха, культуральной жидкости, клеточной биомассы;
- измерение и стабилизация основных параметров процесса на оптимальном для развития продуцента и образования целевого продукта уровне.

Главные задачи при выборе биореакторов:

- стерильность процесса культивирования,
- обеспечение необходимой для клеток скорости растворения кислорода,
- подвод к клеткам других компонентов питания и отвод продуктов метаболизма,
- равномерное распределение биомассы в рабочем объеме,
- сведение к минимуму повреждающих воздействий на клетки,
- регулируемость газового режима и температуры,
- асептический отбор средней пробы биомассы.

Основные типы биореакторов:

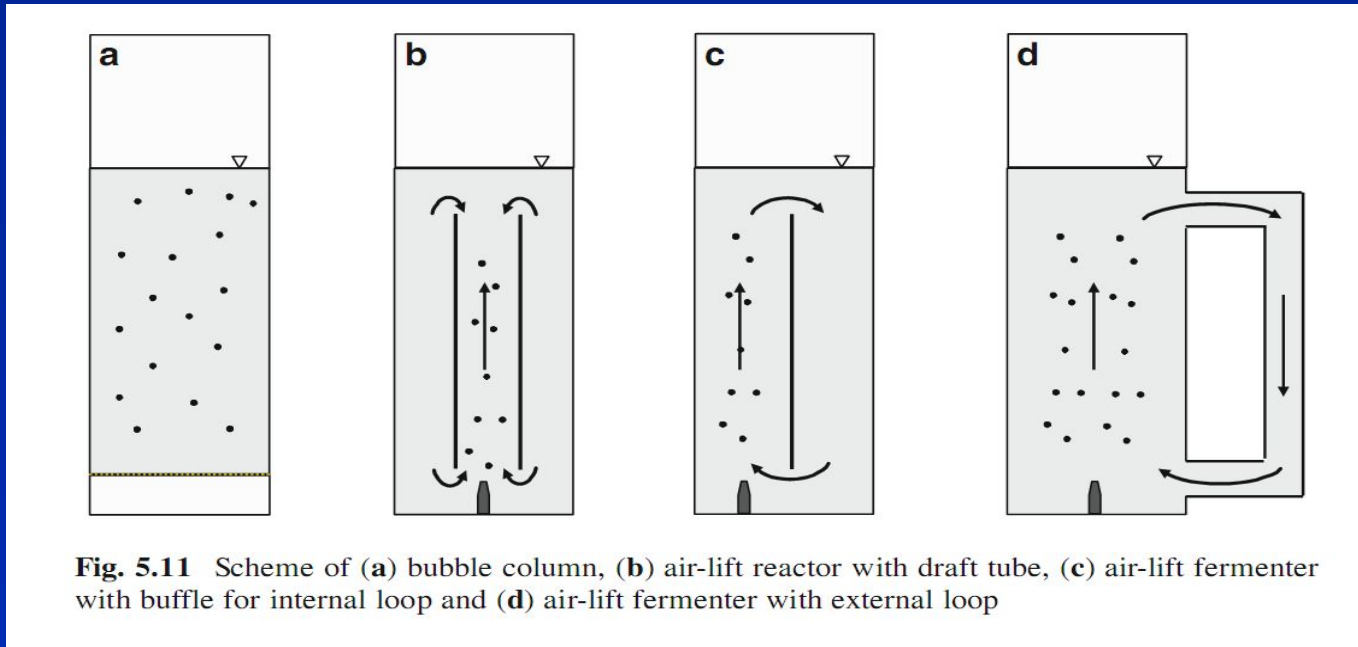


Без механических перемешивающих устройств:
барботажные, эрлифтные
с выраженным циркуляционным контуром



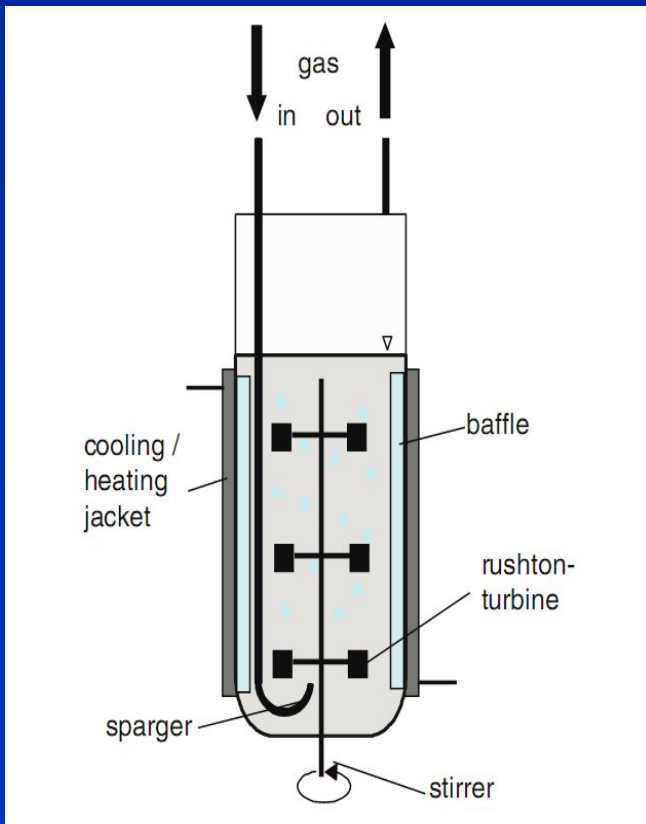
С механическим перемешиванием

Биореакторы без механического перемешивания



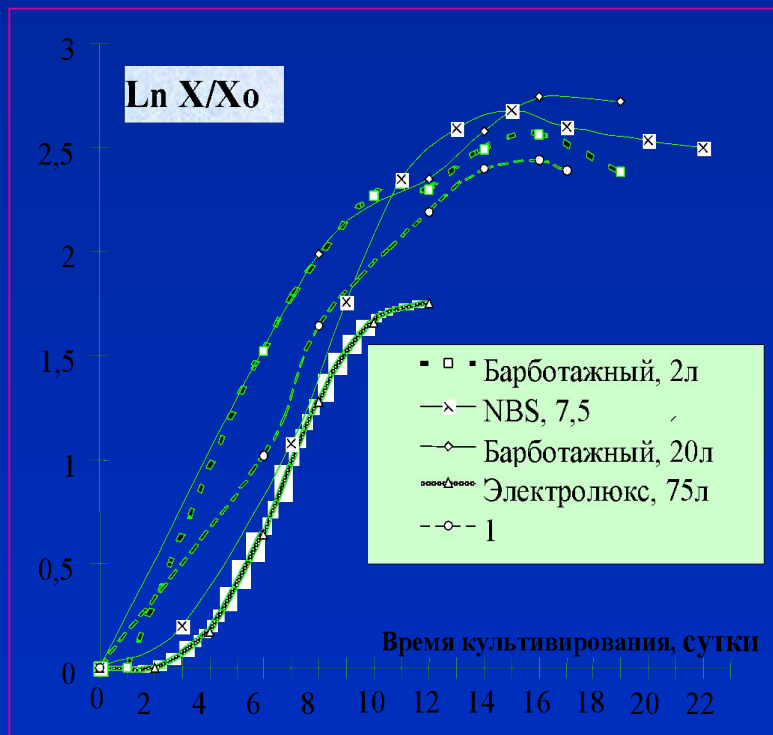
- **Общий признак – аэрация и перемешивание клеточной суспензии осуществляется сжатым воздухом, подаваемым в биореактор под определенным давлением.**
- **Характеризуются достаточно простой конструкцией (отсутствуют трущиеся, движущиеся узлы) и высокой эксплуатационной надежностью.**
- **Обладают относительно невысокими массообменными характеристиками (коэффициент массопередачи по кислороду редко превышает 4 кг/ м³ч), и, следовательно, не могут быть рекомендованы для выращивания культур клеток с высокой вязкостью или повышенными конечными концентрациями клеточной биомассы**

Биореакторы с механическим перемешиванием



- Обычно-цилиндрическая емкость, снабженная механическими перемешивающими устройствами, а также барботером, который устанавливается, как правило, под нижним ярусом мешалки.
- В таких ферментерах **можно в очень широких пределах изменять интенсивность массообмена**
- Основная проблема – **высокая чувствительность клеток к механическому перемешиванию**

Кривые роста культуры клеток *Polyscias filicifolia* в биореакторах разных типов и объема

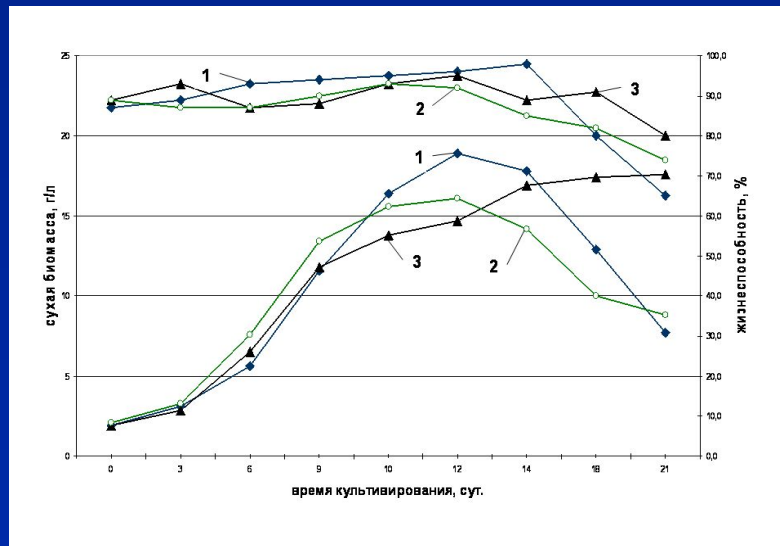


Сравнительная характеристика роста суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* Wall (штамм ИФР ДМ-0,5) в разных системах выращивания

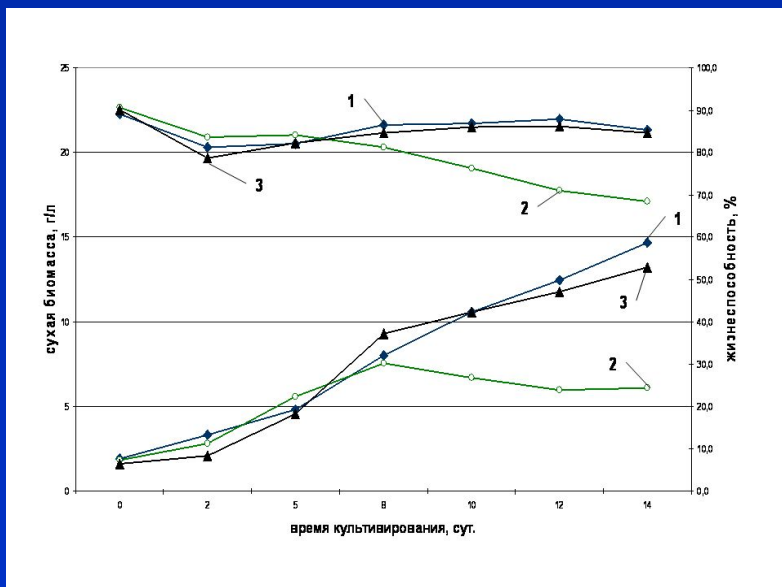
Вариант	M_{max} (г/л)	V , (%)	P , (г/л*сут)	F , (% к M)
Колбы	8,0 - 12,5	80 - 95	0,60 - 0,83	3,0 - 5,0
Барботажный (20 л)	8,0 - 13,5	75 - 90	0,50 - 0,71	3,5 - 4,5
Electrolux (75 л)	6,6 - 8,5	60 - 80	0,45 - 0,60	3,0 - 3,5

Выбор оптимальной конструкции биореактора зависит от индивидуальных особенностей конкретного штамма-производителя

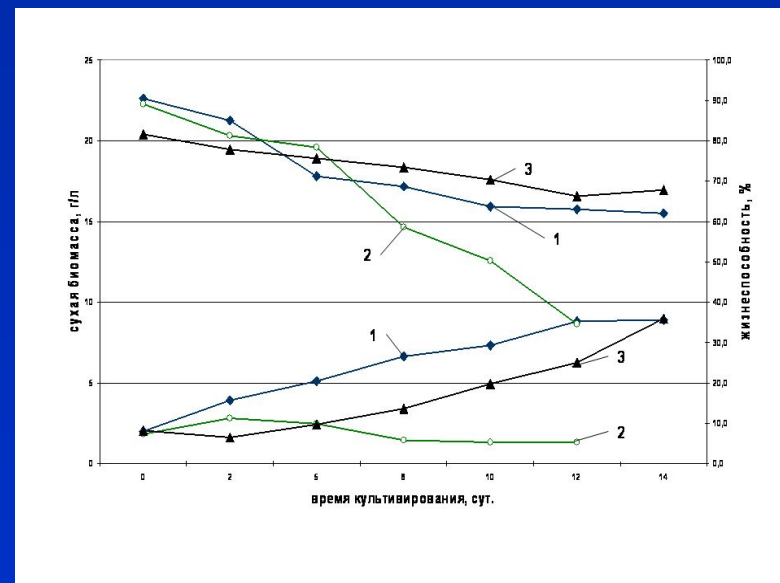
Изменение накопления
биомассы и
жизнеспособности при
культивировании в
различных системах
3 штаммов суспензионной
культуры клеток *St. Glabra*:



Колбы на качалке



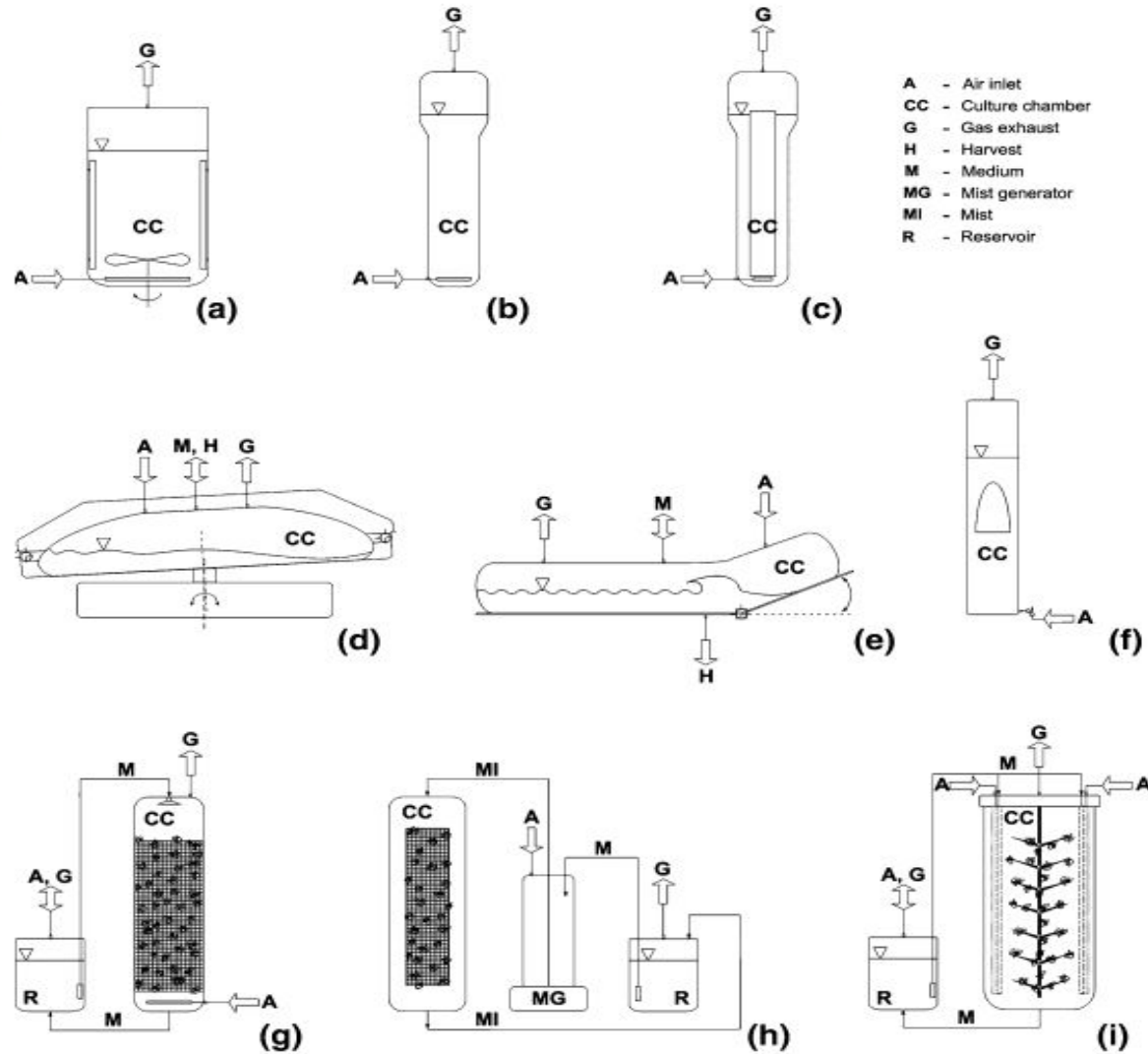
Барботажный биореактор (20 л)



С механическим перемешиванием (75 л)

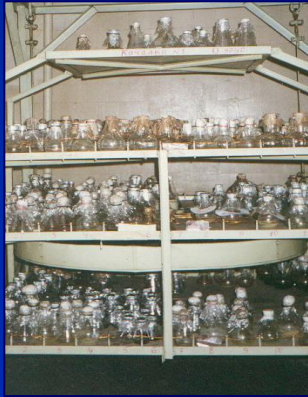
Прочие типы биореакторов:

Fig. 1 Schematic diagrams of suitable bioreactor types: (a) Stirred bioreactor, (b) Bubble column reactor, (c) Airlift reactor, (d) BioWave reactor, (e) Wave & Undertow Bioreactor, (f) Slug Bubble Bioreactor, (g) Spray bioreactor, (h) Mist bioreactor, (i) Low Cost Mist Bioreactor (LCMB)



Использование биореакторов для крупномасштабного выращивания суспензионных культур растительных клеток

Колбы (2 L)



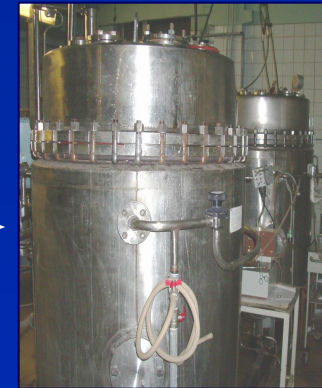
Лабораторный
барботажный
биореактор(20 L)



Биореактор с
механическим
перемешиванием (75 L)



Промышленный
барботажный
биореактор (630 L)



Для проведения экспериментов по масштабированию выращивания-используют стратегию, типичную для микробных культур:

- предварительные эксперименты в лабораторных биореакторах (объем 2 – 15 литров) по оптимизации роста культуры;
- выращивание в пилотных установках (объемом до 100 литров) и проверка выбранных режимов;
- масштабирование выращивания до полупромышленных и коммерческих биореакторов (объемом 500 литров и более)

Пример получения лекарственных препаратов и пищевых добавок на основе культур клеток высших растений.

Совместно с НПФ «Биофармтокс» (С-Петербург) на основе биомассы культуры клеток полисциаса *Polyscias filicifolia* созданы нутрицевтики «Витагмал», «Трифитол», серия мазей «Витагмалин».



Биореакторы промышленного объема и получаемая биомасса культуры клеток женьшеня



Масштабирование процесса аппаратного культивирования растительных клеток

для каждого конкретного используемого штамма определяют:

- оптимальные условия **непрерывной аэрации**;
- оптимальные условия **непрерывного перемешивания**;
- **оптимальный режим культивирования**

непрерывное перемешивание

При глубинном аппаратном культивировании – необходимо обеспечивать высокую интенсивность массообмена клеток со средой

основные функции :

- осуществление массопереноса между различными фазами клеточной суспензии (газовой, жидкой и твердой);
- поддержание гомогенных химических и физических условий в системе для равномерного распределения питательных компонентов и газов, транспорта тепла, диспергирования клеточной биомассы.

Для обеспечения непрерывного перемешивания используют:

в малых объемах (колбы) - взбалтывание клеточных суспензий на качалках

при аппаратном выращивании:

- механическое перемешивание
- перемешивание за счет подачи диспергируемого воздуха
- комбинированные системы

Факторы, влияющие на эффективность непрерывного перемешивания:

- **размеры и сложность конфигурации используемой системы культивирования** (возникновение температурных градиентов, флуктуаций концентраций субстратов, образование «застойных зон», и т.д)
- **реологические характеристики** используемых клеточных суспензий
- **высокая чувствительность** растительных клеток к гидродинамическому и механическому воздействию

Влияние гидродинамического стресса:

- **Снижение жизнеспособности**
- **Снижение содержания внутриклеточных метаболитов**
- **Изменения метаболизма** (изменение скорости поглощения O_2 , дыхательной активности, содержания АТФ, состава клеточных стенок)
- **Морфологические изменения** (изменения размеров клеточных агрегатов)

Минимизация стрессового эффекта:

- **индивидуальный подбор мешалок и газораспределительных устройств**
- **индивидуальный подбор условий перемешивания** (подбор скорости вращения мешалок и скорости подачи воздуха)
- **подбор либо создание штаммов, устойчивых к стрессовым воздействиям** (с сохранением высокой продуктивности)
- **индивидуальная оптимизация конструкций биореакторов**

Типы мешалок:

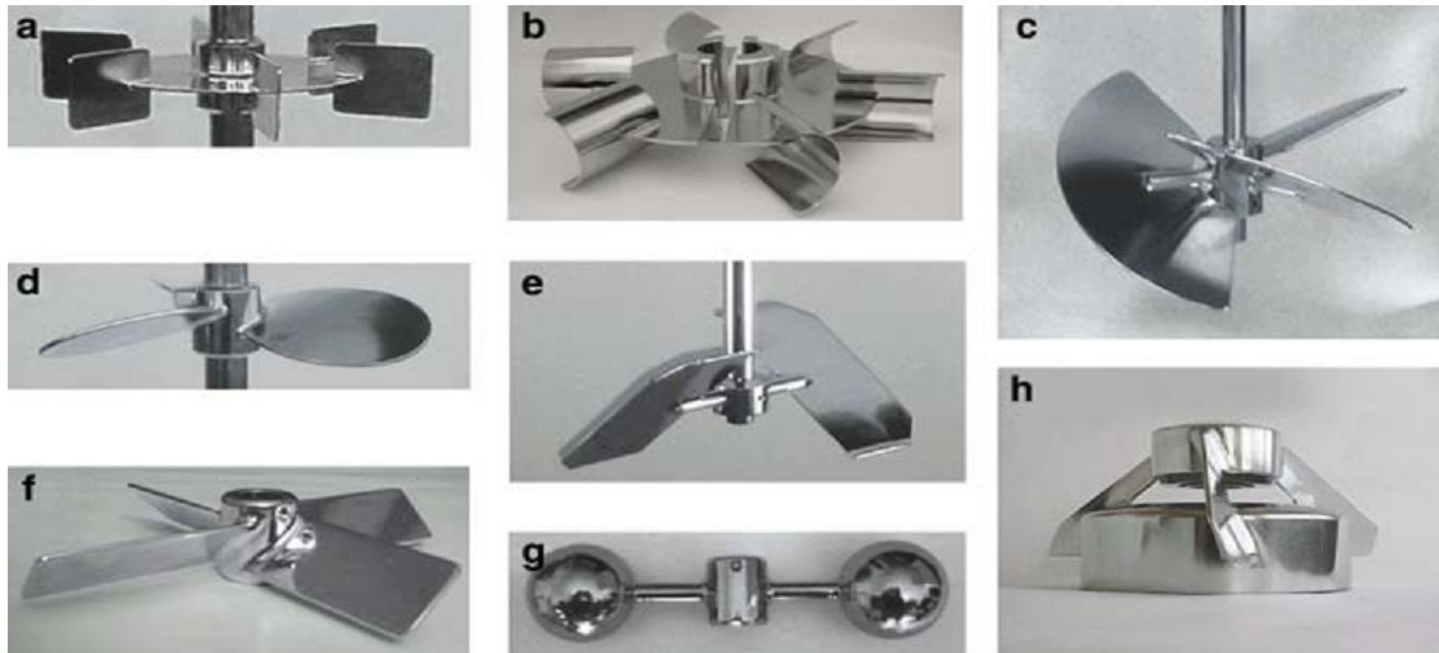


Fig. 5.6 Impeller types applied in stirred bioreactors for cell culture (courtesy of Zeta AG, Switzerland). (a) Rushton turbine, (b) hollow blade, (c) three blade pitched, (d) marine impeller, (e) two blade pitched, (f) skew blade, (g) sphere, (h) bio-m impeller

Непрерывная аэрация:

непрерывная аэрация суспензионных культур растительных клеток необходима:

- для обеспечения аэробных условий выращивания
- для отвода избытка тепла, образующегося в результате жизнедеятельности клеточной популяции

общая скорость поглощения O₂ для растительных клеток варьирует в пределах 10^{-4} г O₂/г сухой биомассы*мин и зависит от:

- индивидуальных особенностей клеточных линий
- условий культивирования
- фаз ростового цикла и т.д.

Непрерывная аэрация:

Для предотвращения лимитации роста клеточных суспензий кислородом, концентрацию растворенного кислорода (**dO₂**) в культуральной жидкости обычно поддерживают на уровне **не ниже 10-15 % от насыщения**.

Измерение общей скорости поглощения кислорода - распространенный метод контроля метаболической активности растительных клеток *in vitro*, адекватно **отражает реакцию культур клеток на изменение условий выращивания** (изменение температуры, pH, осмотический стресс, ингибирование, дефицит питания, взаимодействие с патогенами и т.д.)

В настоящее время для аэрации суспензионных культур растительных клеток при выращивании в биореакторах используют:

- точечные газораспределяющие устройства
- кольцевые газораспределяющие устройства
- решетчатые и т.п.

Для каждого конкретного процесса подбор конструкции барботера индивидуален.

Требования:

- обеспечение наиболее оптимального тока воздуха
- исключение возникновения слишком интенсивных турбулентных потоков
- обеспечение массообмена по всему рабочему объему аппарата

При разработке эффективного аппаратного культивирования - необходим подбор режима выращивания, оптимального для максимальной ростовой и биосинтетической активности суспензионной культуры клеток с учетом ее особенностей.

**Режимы
культивирования**

**Периодическое
культивирование**

**Комбинированные
системы**

**Проточное
культивирование**

- «отъемно-доливные» системы
- 2-хстадийные системы
- системы с подпиткой субстратом

- открытый проток (хемостат, турбидостат)
- закрытый проток (по биомассе)

Периодический метод выращивания

Polyscias filicifolia B. cell suspension culture,
strain BFT-001-95 (№ 58).

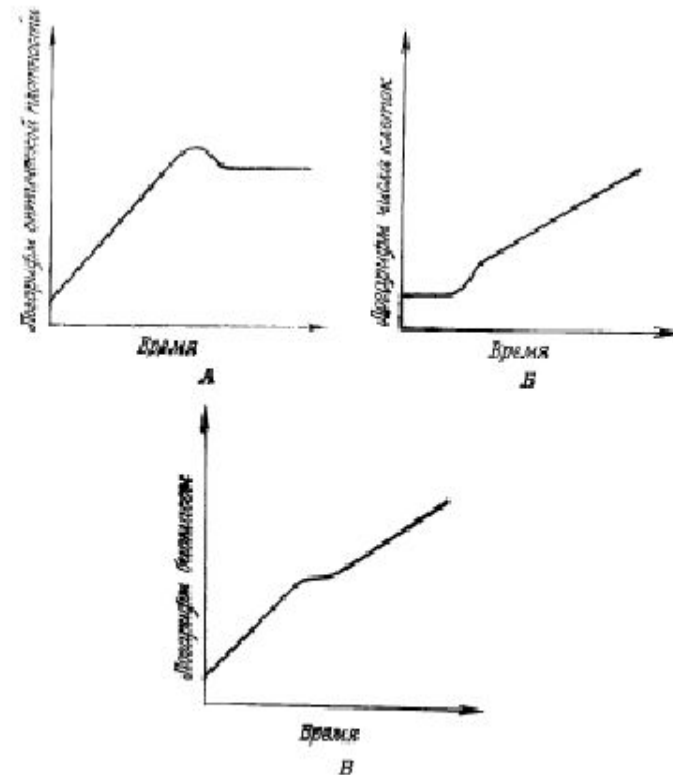
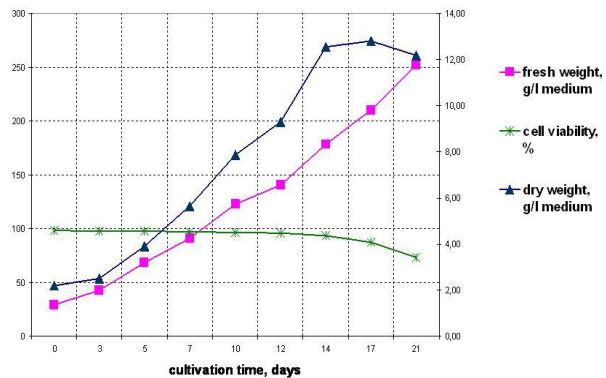


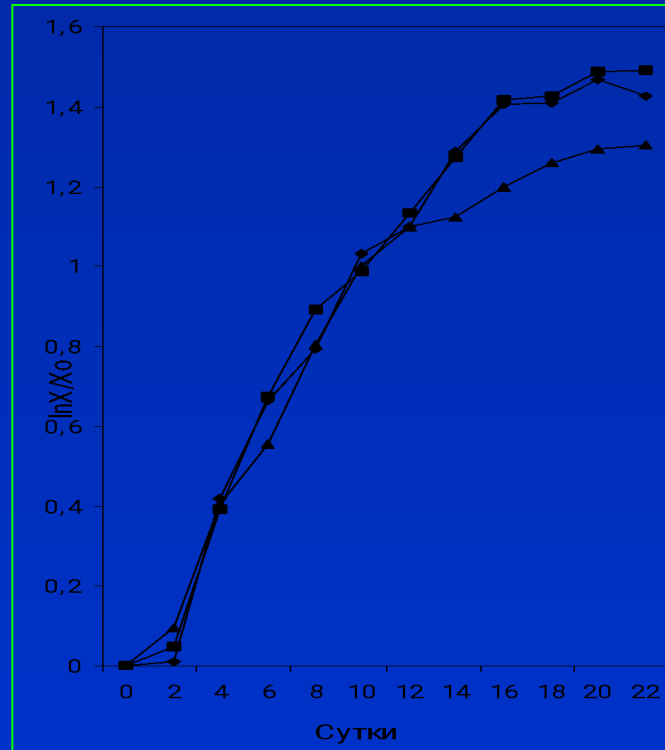
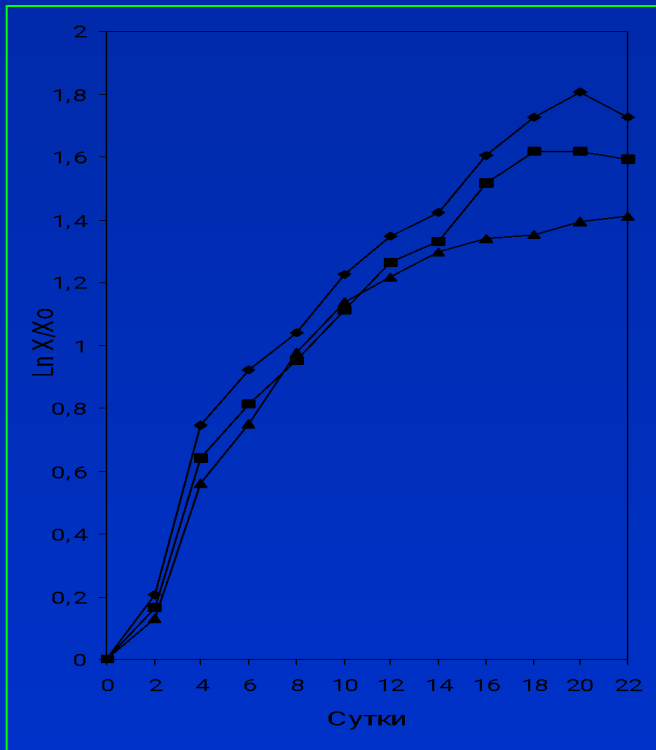
Рис. 7. Некоторые наблюдаемые вариации в кривой роста периодической культуры.

А. Уменьшение оптической плотности перед наступлением стационарной фазы. Б. Синхронизация деления клеток после лаг-фазы. В. Двоукение.

Периодический метод выращивания



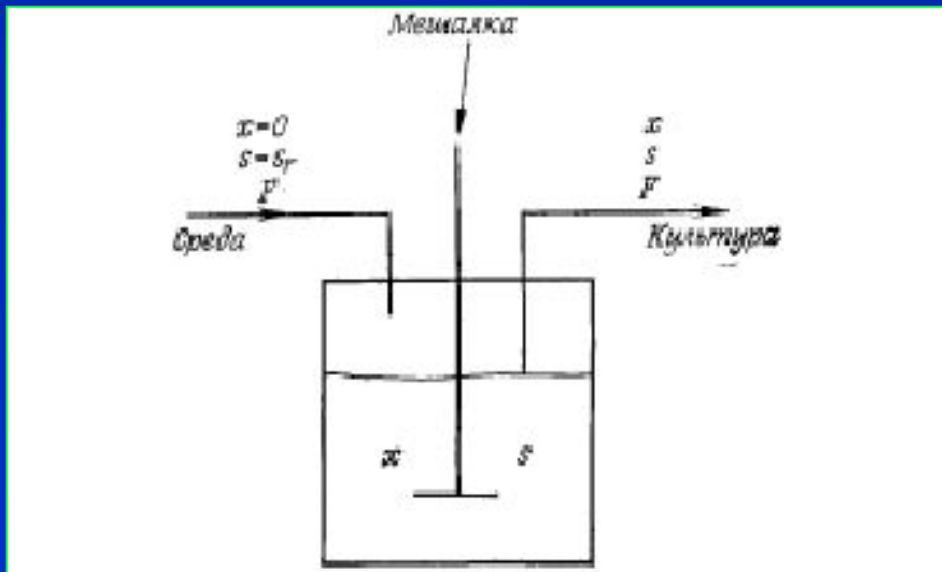
Периодический метод выращивания



Кривые роста суспензионной культуры клеток *P.japonicus* var. *repens* при выращивании в 20 л биореакторе на средах с разным составом ауксинов

Проточные (непрерывные) методы выращивания.

Гомогенно-проточные способы (системы полного смешения).



Проточные (непрерывные) методы выращивания.

Гомогенно-проточные способы (системы полного смешения).

Проточные (непрерывные) методы выращивания. Гомогенно-проточные способы (системы полного смешения).

ХЕМОСТАТ.

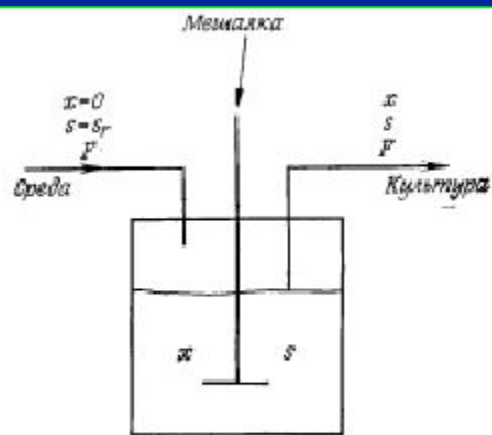


Рис. 10. Хемостат (схематически).

Концентрации биомассы и лимитирующего субстрата в различных точках представлены как x и s соответственно. F — скорость потока, V — объем культуры.

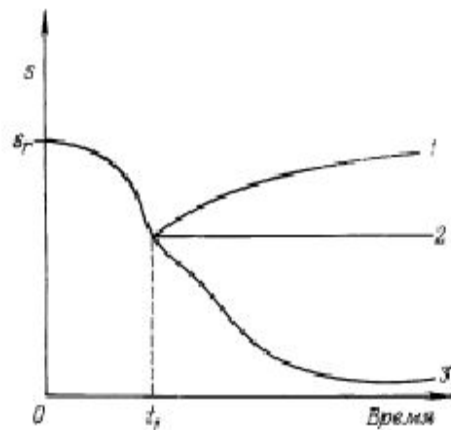
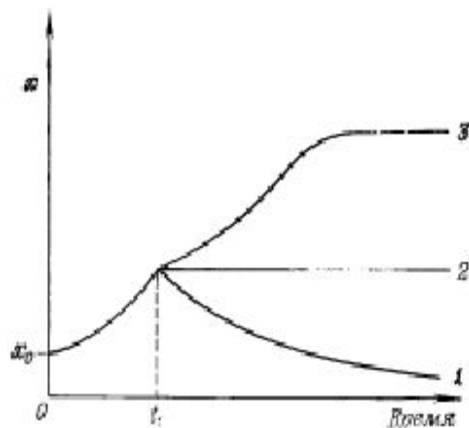
- Рост клеток с глубоким лимитированием (модель сформировавшейся популяции).
- Основан на измерении и регуляции входящих потоков.
- Для исследований популяций растительных клеток впервые был опробован Вильсоном с соавт.(1971)

Концентрацию кислорода или одного из компонентов питательной среды на входе в ферментер фиксируют так, чтобы другие компоненты субстрата находились в избытке

Скорость размножения клеток в культуре ограничена лимитирующей концентрацией задающегося элемента субстрата

Проточные (непрерывные) методы выращивания. Гомогенно-проточные способы (системы полного смешения).

ХЕМОСТАТ.



3 возможных результата в хеMOSTАТНОЙ культуре:

(Скорость прироста биомассы (X) ограничена концентрацией (S) лимитирующего субстрата)

0 – добавления среды не происходит: рост как в периодической культуре;

При поступлении среды (момент времени t_r):

1 – скорость разбавления (**D**) больше удельной скорости роста μ_{max} : концентрация биомассы падает, концентрация лимитирующего субстрата стремится к S_r ;

2 – $D_{нач.} = \mu_{max}$:

стационарное состояние при максимальной удельной скорости роста культуры; концентрация биомассы и лимитирующего субстрата = **const (Stady state)**;

3 – $D_{нач.} < \mu_{max}$:

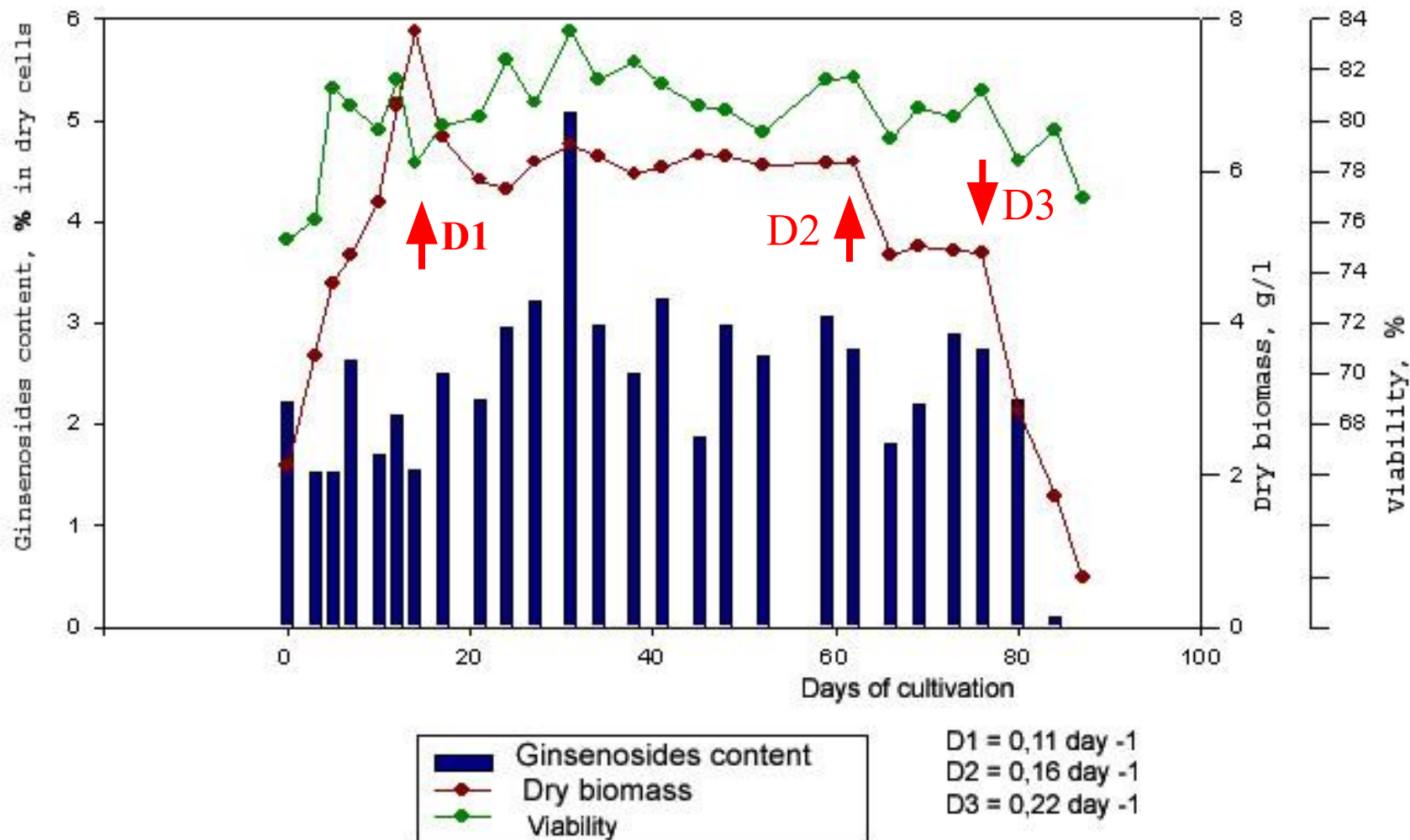
непрерывный прирост биомассы, пока уменьшение лимитирующего субстрата не снизит μ ; тогда $\mu = D$, $\mu < \mu_{max}$ и будет определяться D; наступит саморегулирующееся стационарное состояние.

Проточные (непрерывные) методы выращивания. Гомогенно-проточные способы (системы полного смешения).

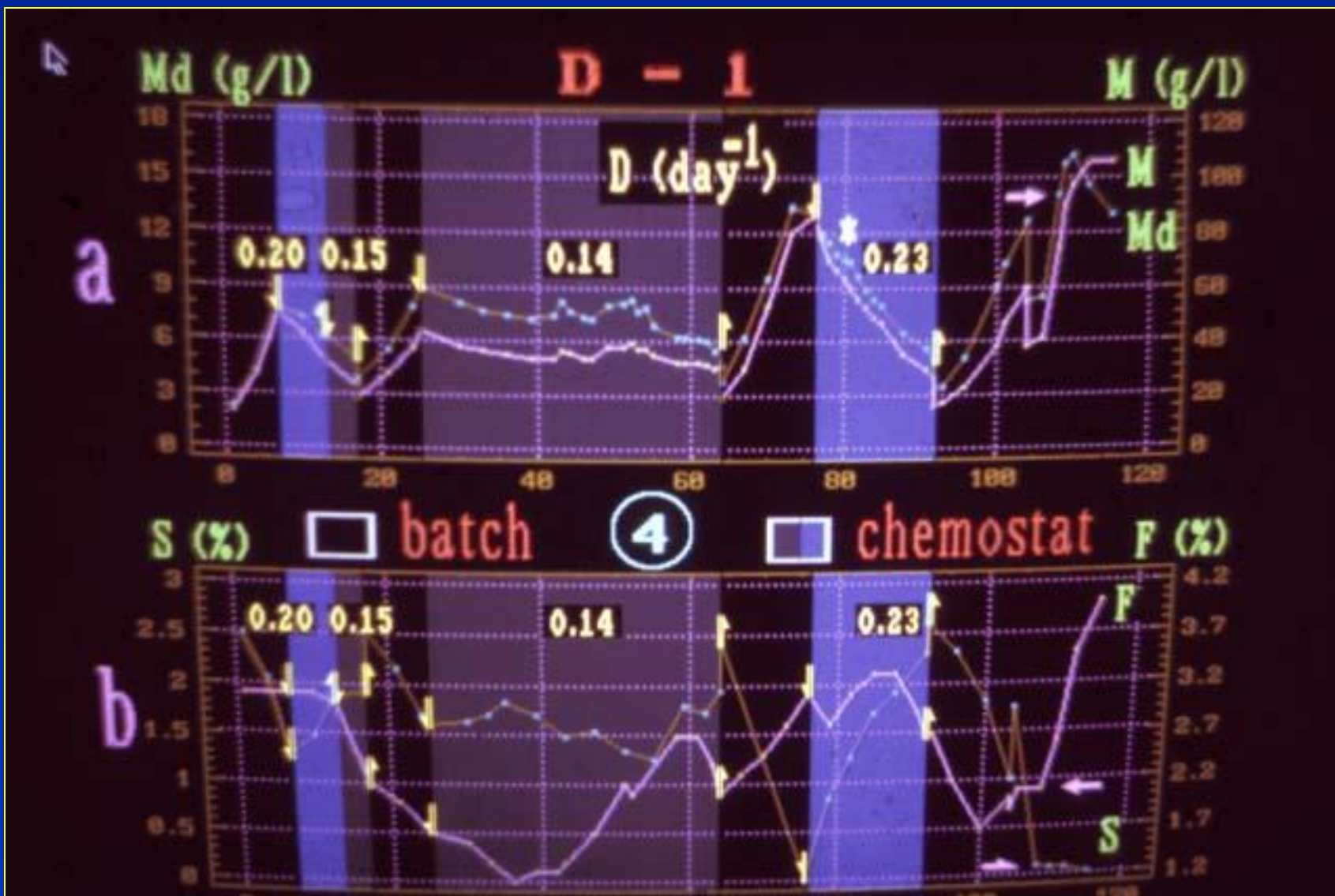
ХЕМОСТАТ.

- Хемостат позволяет изучать популяцию клеток в фазе интенсивного роста, а также выделять фактор (чаще всего концентрацию рост-лимитирующего компонента питательной среды), определяющий физиолого-биохимическое состояние клеточной популяции
- Сложности поддержания в течение продолжительного времени стационарного состояния.
- Увеличение скорости протока выше μ_{max} может приводить к вымыванию культуры растительных клеток из биореактора.
- При увеличении скорости протока может происходить уменьшение гетерогенности клеточной популяции вследствие повышения доли быстрорастущих клеток – наблюдается постепенное вымывание клеток, прекративших рост или растущих с меньшей удельной скоростью, чем скорость протока

Рост и содержание гинзенозидов в культуре клеток *P. japonicus* при выращивании в режиме потока

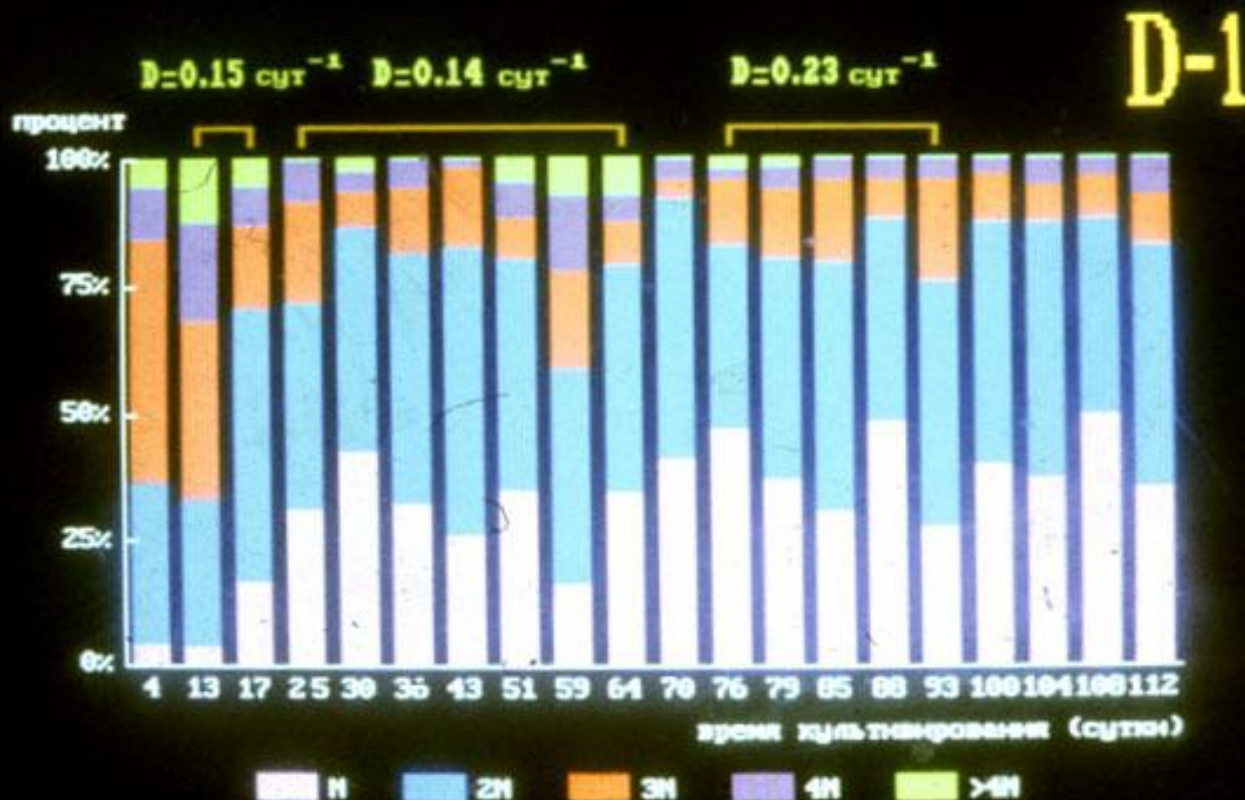


Выращивание культуры клеток диоскорей в проточном режиме

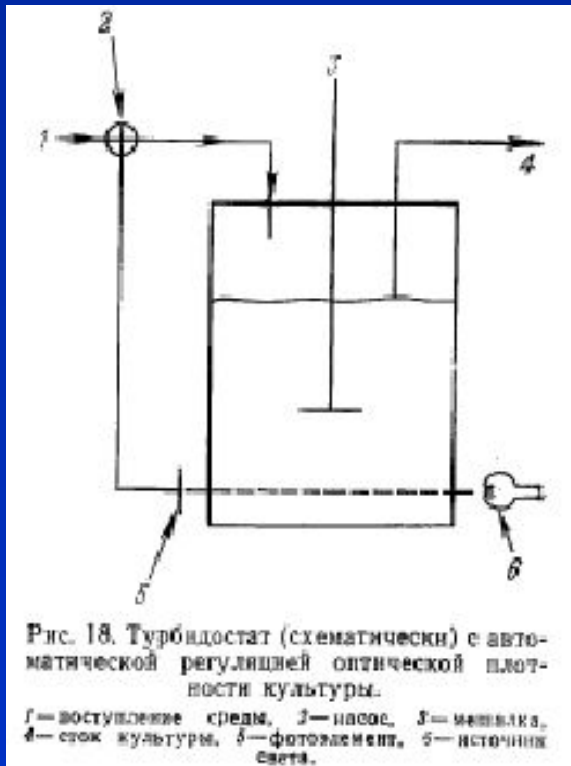


Изменение ploидности клеток при выращивании культуры клеток диоскорей в проточном режиме, штамм Д1

В состоянии *stady-state* (по уровню накопления биомассы) – наблюдается изменение состава популяции (идет отбор гаплоидных клеток)



Проточные (непрерывные) методы выращивания. Гомогенно-проточный способ (системы полного смешения). ТУРБИДОСТАТ.



- Основан на измерении мутности выходящего потока (снабжен фотоэлектрическим элементом, чувствительным к мутности суспензии).
- Изменение оптической плотности клеточной суспензии регулирует скорость поступления в ферментер свежей питательной среды:
 - при снижении оптической плотности до определенного выбранного значения фотоэлемент подает сигнал на насос, подающий среду. $V_{\text{суспензии в аппарате}} = \text{const.}$

Для выращивания растительных клеток применяется крайне редко – низкая корреляция между оптической плотностью культуры и реальной концентрацией клеток; также отмечают залипание датчиков плотности из-за высокой адгезии клеток

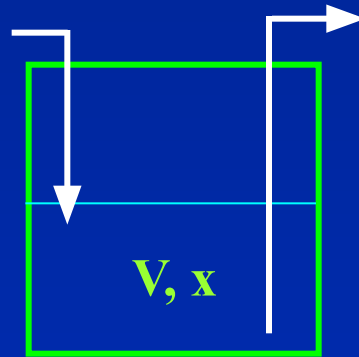
Проточные (непрерывные) методы выращивания.

Сравнение хемостата и турбидостата.

хемостат

- Рост клеток с глубоким лимитированием (модель сформировавшейся популяции). Автоселекция клеток с **повышенным средством к лимитирующему субстрату**, отбор более «экономичных» и жизнеспособных форм.
- Фиксируется **скорость разбавления**, к стационарному уровню подстраивается **концентрация биомассы**
- **постоянство потоков** ($F = \text{const}$)

F, S_0



F, x

турбидостат

- Рост клеток **в нелимитированных условиях**. Автоселекция клеток с увеличенной μ , более «резистивные» мутанты.
- С помощью турбидостатного контроля устанавливается **плотность биомассы**, к стационарному уровню подстраивается **скорость разбавления**.
- **постоянство организации** ($X = \text{const}$)

Проточные (непрерывные) методы выращивания.

Закрытое по биомассе проточное культивирование («закрытый проток»).

- Отличительная особенность - **необходимость непрерывной подачи питательной среды и отбора бесклеточной культуральной жидкости**. В техническом плане это реализуют при помощи перистальтических насосов, простейших измерителей расхода протекающей жидкости и емкостей для слива бесклеточной культуральной жидкости и подачи питательной среды.
- Основная сложность - **разработка конструкции непрерывного отделения биомассы от культуральной жидкости**. Наиболее распространены следующие варианты решения этой проблемы: путем иммобилизации, разделением с использованием мембран и путем седиментации клеточной биомассы.

Проточные (непрерывные) методы выращивания.

Закрытое по биомассе проточное культивирование («закрытый проток»).

Позволяет изучать популяции (состоящие преимущественно из специализированных клеток) в фазах замедления роста или стационара.

основные регулирующие воздействия – изменение концентрации лимитирующего субстрата, скорости потока

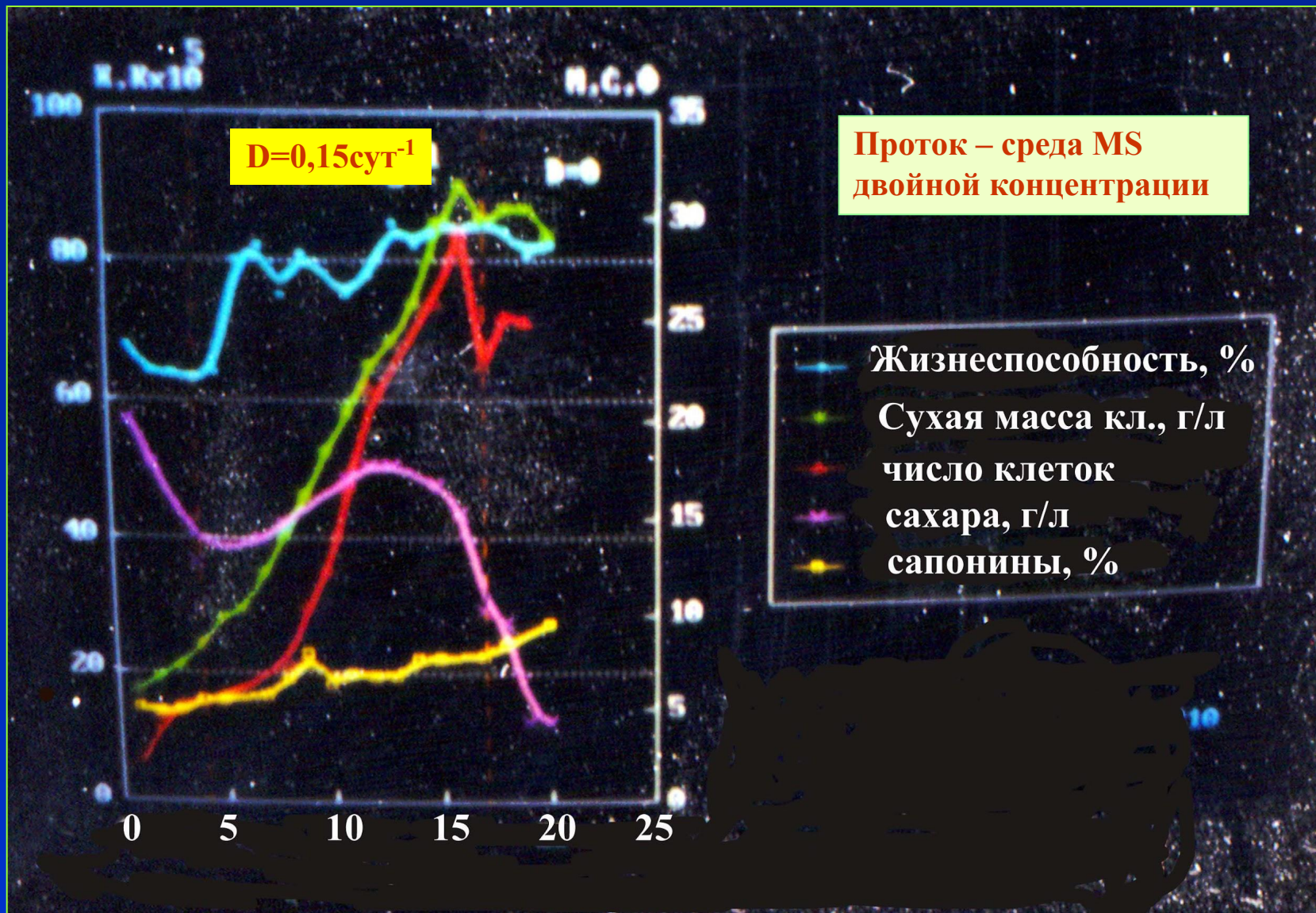
наиболее часто используют:

- для получения продуктов первичного и вторичного метаболизма, ассоциированных с ростом клеточных культур;
- при выращивании клеточных суспензий, для которых характерно ингибирование роста продуктами клеточного метаболизма.

Проточные (непрерывные) методы выращивания.

**Закрытое по биомассе проточное культивирование
(«закрытый проток»).**

«Закрытое» проточное культивирование культуры клеток диоскореи дельтовидной



Комбинированные методы выращивания.

Открытые системы с элементами периодического культивирования

К ним относят:

- **периодические культуры с подпиткой субстратом** (периодическое или непрерывное добавление питательной среды или отдельных лимитирующих питательных компонентов без удаления биомассы)
- **«отъемно-доливные» системы** (периодическое добавление свежей среды при удалении части культуры)
- **двустадийные системы** и т.д.

Отличие от проточных режимов: **не являются стационарными**

Для них характерны:

периодические изменения объема суспензии и скорости, времени и степени её разбавления, а также зависящих от этих параметров характеристик (удельной скорости роста, продуктивности и т.п.)

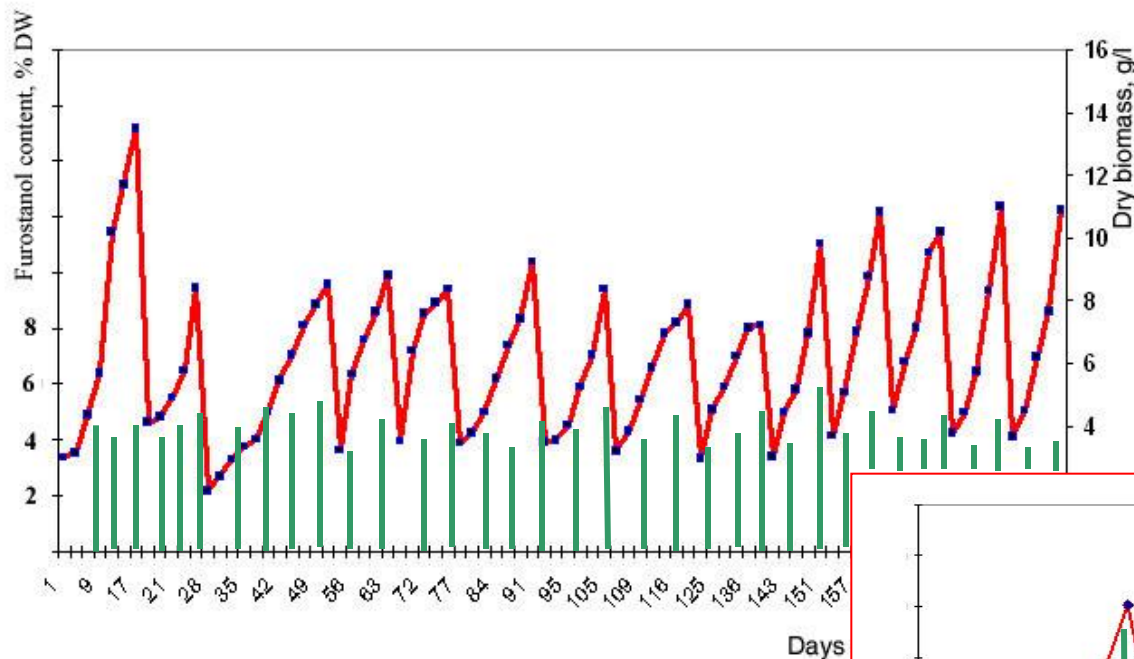
Комбинированные методы выращивания.

Открытые системы с элементами периодического культивирования

просты в аппаратном оформлении и сочетают преимущества проточных и периодических методов:

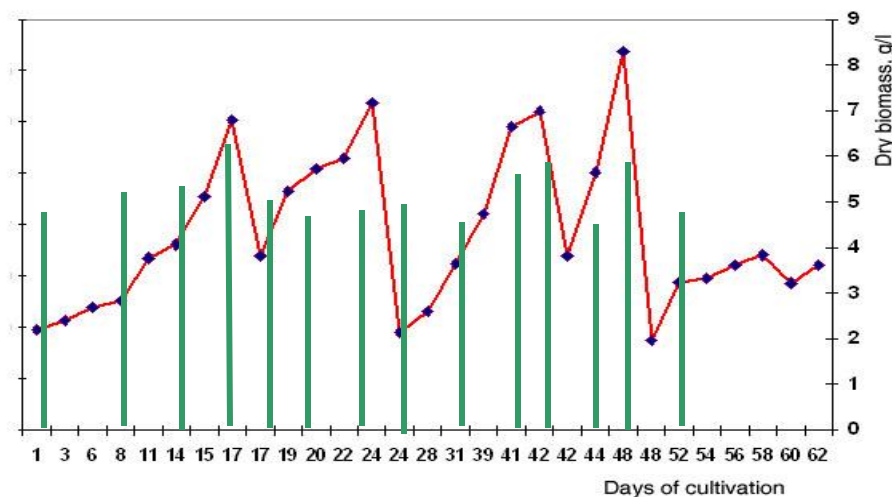
- более широкие возможности для контроля и оптимизации условий культивирования в зависимости от фазы ростового цикла, продуктивности или возраста культуры;
- снижен риск мутаций клеточной популяции;
- отсутствует риск «вымывания» клеток;
- гарантирована высокая степень утилизации субстрата;
- возможность варьировать продолжительность субкультивирований в зависимости от изменений физиологических характеристик клеточной популяции;
- отсутствуют временные затраты на подготовку оборудования и инокулята к каждому новому циклу субкультивирования

Ростовые кривые и содержание фураностаноловых гликозидов в культуре клеток *Diocorea deltoidea* в полупроточном режиме выращивания («отъемно-доливной метод»)



Лабораторный биореактор (20 литров) барботажного типа

Биореактор пилотного объема (75 литров) с механическим перемешиванием



Комбинированные методы выращивания.

Открытые системы с элементами периодического культивирования

Комбинированные системы широко используют при масштабировании культивирования объектов, для которых применение периодических и проточных методов менее эффективно:

- при исследований роста, лимитированного субстратом,
- при выращивании культур, для которых характерен синтез целевых продуктов, не ассоциированный с ростом,
- высокоагрегированных культур,
- культур с низкой скоростью роста и т.п.

Полупроточное выращивание суспензионной культуры клеток *Polyscias filicifolia* в биореакторе объемом 0.63 м³.

