

На правах рукописи



Титова Мария Владимировна

**Физиологические характеристики суспензионных культур клеток
Polyscias filicifolia, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при мас-
штабировании процесса выращивания.**

03.01.05 – физиология и биохимия растений
03.01.06 – биотехнология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории физиологии культивируемых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Носов Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

Лобакова Елена Сергеевна,

доктор биологических наук, профессор

кафедра биоинженерии биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, Москва, профессор.

Цоглин Лев Наумович,

доктор биологических наук

лаборатория управляемого фотобиосинтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

ОАО «БИОХИММАШ» Институт прикладной биохимии и машиностроения, Москва

Защита состоится 23 апреля 2013 г. в 13 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальностям 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” и 03.01.06 – «Биотехнология» (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Автореферат разослан «22» марта 2013 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

Актуальность проблемы. Культура клеток высших растений – это экспериментально созданная популяция соматических клеток, нуждающаяся в тщательнейшем изучении. Помимо теоретического интереса к исследованию поведения растительных клеток вне организма, культура клеток имеет прямое практическое значение. Известно, что в настоящее время значительное количество лекарственных препаратов создаются на базе растительного сырья. Между тем возможности их получения сильно ограничены сокращающимися ресурсами дикорастущих растений. В связи с этим культуры клеток лекарственных растений представляют собой перспективный источник биологически активных веществ для нужд косметической, фармацевтической и пищевой промышленности. (Ramachandra et al., 2002; Bourgaud et al., 2001; Collin et al., 2001) Однако успешных примеров масштабного промышленного использования клеток высших растений *in vitro* немного. Это связано, прежде всего, с трудностью получения штаммов-продуцентов, трудоемкостью работ по оптимизации их выращивания и, наконец, сложностью масштабирования процессов культивирования. Кроме того, известно, что культуры клеток высших растений часто характеризуются нестабильностью процессов роста и синтеза целевых вторичных метаболитов при длительном выращивании. Для решения этих проблем и создания эффективных биотехнологий на основе растительных клеток *in vitro* необходим комплекс как фундаментальных, так и прикладных работ, в том числе исследование общих закономерностей роста, первичного и вторичного метаболизма клеток растений *in vitro*; особенностей выращивания в различных системах культивирования; создание оптимальных схем промышленного выращивания. (Verpoorte et al., 2002)

Тем не менее, подобное комплексное изучение культур клеток – продуцентов биологически-активных веществ с учетом как продуктивности и индивидуальных физиологических особенностей клеток *in vitro*, так и технологических характеристик используемого оборудования до сих пор не получило широкого распространения.

Большой интерес с практической точки зрения представляют работы по исследованию культур клеток лекарственных растений, синтезирующих тритерпеноиды с высокой биологической активностью - женьшеня *Panax japonicus* (продуцент гинзенозидов), полисциаса *Polyscias filicifolia* (комплекс биологически-активных соединений, в том числе тритерпеновых гликозидов на основе олеаноловой кислоты) и диоскореи *Dioscorea deltoidea* (продуцент фураностаноловых гликозидов). Как было пока-

зано многочисленными исследованиями, суспензионные культуры клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* обладают достаточно высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками для проведения исследований по изучению возможностей аппаратного выращивания для рентабельного получения клеточной биомассы. (Липский и др., 1985; Орешников и др., 1994; Ключин и др., 2000) В связи с этим комплексный анализ изменения их физиологических показателей при масштабировании процесса культивирования с учетом технологических ограничений, обусловленных особенностями аппаратного оформления, представляется актуальной фундаментальной и прикладной задачей.

Цель работы. Исследовать особенности физиологических характеристик суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при длительном выращивании в различных системах (колбах и биореакторах различного типа), провести масштабирование процесса выращивания и отработать эффективную технологию получения клеточной биомассы в аппаратах полупромышленного объема (630 л).

Для достижения указанной цели были поставлены **следующие задачи:**

1. Охарактеризовать по физиологическим показателям суспензионные культуры клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при стандартных условиях выращивания (в колбах)
2. Провести сравнительное исследование физиологических и продукционных (по биомассе и целевым продуктам вторичного метаболизма) характеристик суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при периодическом и полупроточном режимах выращивания в биореакторах различного типа и объема.
3. Исследовать возможность длительного непрерывного аппаратного выращивания суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при сохранении максимальной продуктивности по клеточной биомассе и целевым продуктам вторичного метаболизма.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование ростовых и биосинтетических характеристик суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при полупроточном выращивании в биореакторах различного типа и объема. Показано влияние характеристик биореакторов (интен-

сивность аэрации и перемешивания, конструктивных особенностей) на физиологические показатели штаммов-продуцентов. Впервые осуществлено длительное непрерывное полупроточное выращивание суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* в полупромышленных аппаратах при сохранении продуктивности по клеточной биомассе и синтезируемым вторичным метаболитам. Показана воспроизводимость основных ростовых и биосинтетических характеристик при использовании предлагаемой схемы масштабирования процесса культивирования.

Практическая значимость работы. Отработанная в результате проведенных исследований технология является основой создания технологических регламентов получения биомассы культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* глубинным способом в пилотных и промышленных установках. Основные ростовые и физиологические показатели исследованных штаммов, полученные при выращивании в различных системах культивирования, не уступают мировым аналогам разработанных технологий получения биомассы культур клеток высших растений. Полученная в результате проведенных работ биомасса клеток была использована НПК «Биофармтокс» (Санкт-Петербург) при производстве пищевых добавок, обладающих тонизирующими и адаптогенными свойствами.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на VIII и IX Международных конференциях «Биология растительных клеток *in vitro* и биотехнология» (Саратов, 2003; Звенигород, 2008), Международной конференции 1st Workshop on Molecular Biotechnology / XV Biotechnology Summer School (Gdansk, Poland, 2009), Международной конференции «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере» (Якутск, 2010)

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 19 печатных работ в отечественных и зарубежных научных журналах, материалах конференций и научных сборниках (в том числе 7 в журналах ВАК), а также получено 2 авторских свидетельства.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертационная работа изложена на

128 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 15 таблиц. Список цитируемой литературы включает 210 наименований.

Автор выражает особую благодарность за помощь в проведении аппаратного культивирования сотрудникам Отдела Шумило Николаю Анатольевичу и к.б.н. Орешникову Александру Викторовичу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В качестве объектов исследования использовали следующие суспензионные культуры клеток, депонированные в ВККК ВР ИФР РАН: *Dioscorea deltoidea* Wall - штамм ИФР ДМ-05 – сверхпродуцент фураностаноловых гликозидов (коллекционный № 6); *Polyscias filicifolia* Bailey - штамм ВФТ-001-95 (коллекционный № 58); *Panax japonicus* С. А. Меу. var. *repens* Maxim - штамм-продуцент гинзенозидов (коллекционный № 62). Культуры выращивали на модифицированных питательных средах с минеральной основой по Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) и с добавлением источников углеводов, витаминов и регуляторов роста (в соответствии с коллекционными паспортами).

Культивирование проводили в колбах и в биореакторах. Культивирование в колбах на круговой качалке осуществляли в темноте при температуре 26-27°C, влажности 70-75 % и частоте оборотов 95-100 об/мин. Для аппаратного выращивания использовали биореакторы 3-х типов: 1) барботажный ферментер (разработка Отдела биологии клетки и биотехнологии РАН); точечное аэрирующее устройство; 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; точечное аэрирующее устройство; тип перемешивающего устройства "морской винт"; 3) барботажный аппарат (1Т, ОКБА, Йошкар-Ола); кольцевое аэрирующее устройство; 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 10-30% от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования.

Для характеристики роста и физиологического состояния культур использовали сухую и сырую массы клеток, степень агрегированности культур, жизнеспособность и концентрацию клеток, которые определяли по общепринятым методикам. (Бутенко,

1964; Носов, 2008) По первичным результатам, характеризующим рост культуры, рассчитывали индекс роста I , удельную скорость роста в экспоненте μ , время удвоения T , продуктивность по сухой биомассе P . (Носов, 2008)

Количественное определение общего содержания фураностаноловых гликозидов в клеточной биомассе проводили спектрофотометрическим методом с использованием реактива Эрлиха. (совместно с н.с. Куличенко И.Е.) (Васильева и др., 1987)

Количественное содержание и качественный состав гинзенозидов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (совместно с с.н.с., к.ф.н. Решетняк О.В.). (Решетняк и др., 2008)

Определение доли различных путей дыхательного обмена в общем процессе поглощения кислорода клетками исследуемых штаммов производили полярографическим методом на полярографической установке с ячейкой открытого типа и электродом Кларка с применением ингибиторного анализа. (Kapulnik et al., 1992)

Для оценки коэффициента массопередачи по кислороду (K_{La}) в бесклеточной среде использовали оригинальную методику, примененную ранее для оценки массопередачи при выращивании культур клеток животных, и адаптированную в дальнейшем для культур растительных клеток. (Алеева и др., 1977; Данилов, Зайцева и др., 1981)

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам (Рокицкий, 1964). На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из 3 биологических повторностей (по 3 колбы или по 3 фиксированных объема клеточной суспензии (при отборе проб из биореакторов) на точку) для каждого срока, пассажа и варианта культивирования. Стандартные отклонения менее 10% от величин средних значений на графиках не отображали.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

1. **Изучение ростовых и биосинтетических характеристик суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при выращивании в колбах в стандартных условиях.** Для разработки успешной технологии аппаратного культивирования необходимо знать особенности физиологии используемых культур клеток. В связи с этим на первом этапе работы проводили изучение ростовых и биосинтетических характеристик исследуемых штаммов поли-

сциаса папортниколистного, женьшеня японского и диоскореи дельтовидной при стандартном периодическом выращивании в колбах на качалке. Данный способ выращивания является основным для поддержания суспензионных культур растительных клеток в лабораторных коллекциях, и физиологические показатели штаммов, полученные в процессе такого культивирования, обычно принимают в качестве контрольных.

Для всех штаммов были исследованы ростовые характеристики и построены кривые роста по всем изученным параметрам (сырой и сухой массе и числу клеток) (рис.1). Рассчитанные по полученным данным основные ростовые показатели представлены в табл.1. Проведенный комплексный анализ полученных результатов позволил выявить характерные физиологические особенности исследуемых культур клеток.

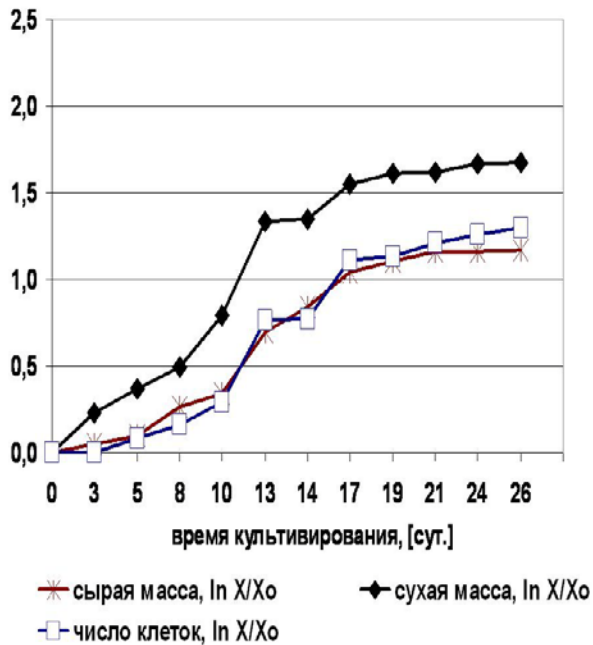
Все штаммы были представлены двумя типами клеток – меристемоидными и паренхимоподобными. Причем число последних увеличивалось к концу стационарной фазы цикла субкультивирования у всех вариантов. Для суспензионной культуры клеток *P.filicifolia* отмечено присутствие незначительного количества клеток удлинённой изогнутой формы, что, по-видимому, является специфической особенностью данного штамма (Клюшин и др., 2000)

По степени агрегированности клеток в суспензии отличаются от остальных штамм *D.deltoidea*: он является относительно мелкоагрегированным – более 80 % агрегатов в суспензии составляют кластеры, состоящие из 10 – 50 клеток. Штаммы *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* крупноагрегированные – более 50% приходится на агрегаты, размером >50 клеток. Количество жизнеспособных единичных клеток и мелких агрегатов (до 5 клеток) незначительно для всех вариантов.

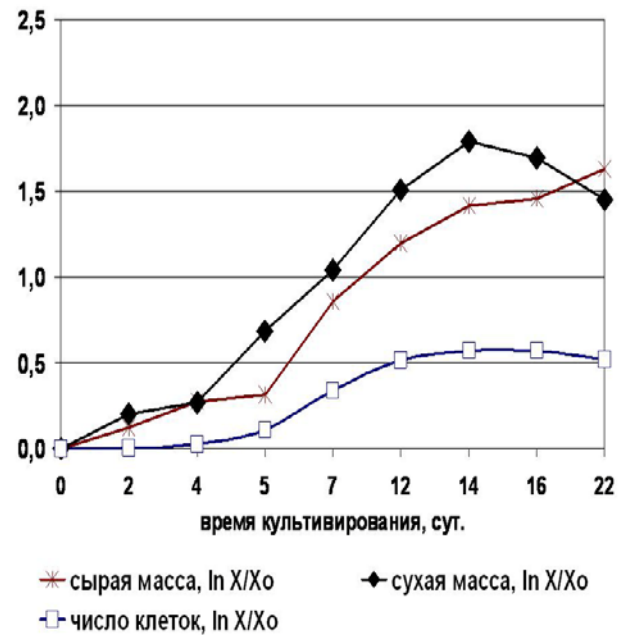
Для исследуемых культур (при контрольной начальной плотности посадки около 1.5-2.0 г/л по сухой биомассе клеток и жизнеспособности около 88-92 %) цикл субкультивирования при определении ростовых характеристик составлял 21-22 суток, продолжительность лаг-фазы роста находилась в пределах 3 – 5 суток, фазы экспоненциального роста – 7 – 9 суток. Характерная особенность роста штамма культуры клеток *D.deltoidea* - короткая фаза стационара (около 2-3 суток), что является специфическим признаком этой культуры клеток. (Носов, 1992) Стационарная фаза для культур клеток *P.filicifolia* и *P.japonicus* наступала довольно поздно (на 16–18-е су-

тки), в течение эксперимента для этих штаммов фазу деградации зафиксировать не удалось.

Polyscias filicifolia



Dioscorea deltoidea



Panax japonicus

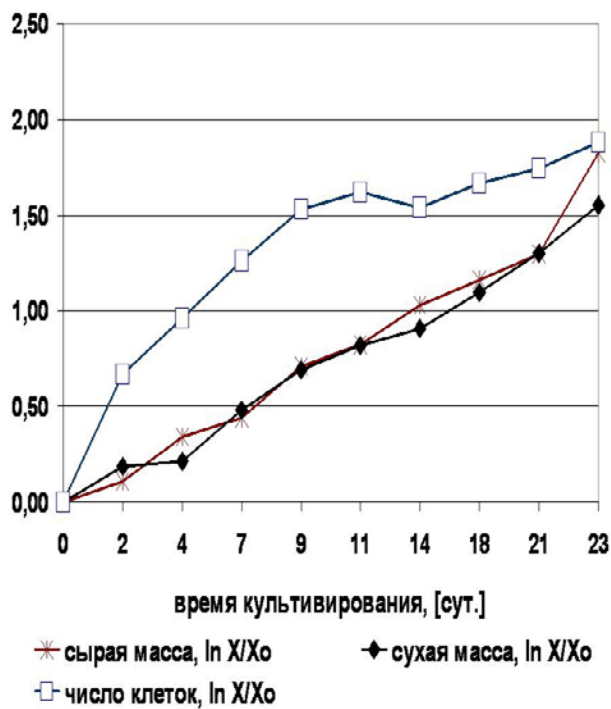


Рис. 1. Динамика роста суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* в полулогарифмической системе координат при стандартном выращивании в колбах объемом 250 мл

Таблица 1. Ростовые характеристики суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea*

Культура	M_{\max_dw} , г/л	v , %	μ_{dw} , сут ⁻¹	I_{dw}
<i>Dioscorea deltoidea</i>	9.31 - 10.81	89 - 95	0.15 – 0.20	4.75 – 6.35
<i>Polyscias filicifolia</i>	11.60 - 12.80	96 - 98	0.15 – 0.22	5.53 – 7.20
<i>Panax japonicus</i>	7.56 - 8.78	92 - 97	0.11 – 0.17	3.63 – 4.21

где M_{\max_dw} – максимальное значение концентрации биомассы клеток по сухому весу; v – жизнеспособность клеток; μ – удельная скорость роста; I – индекс роста.

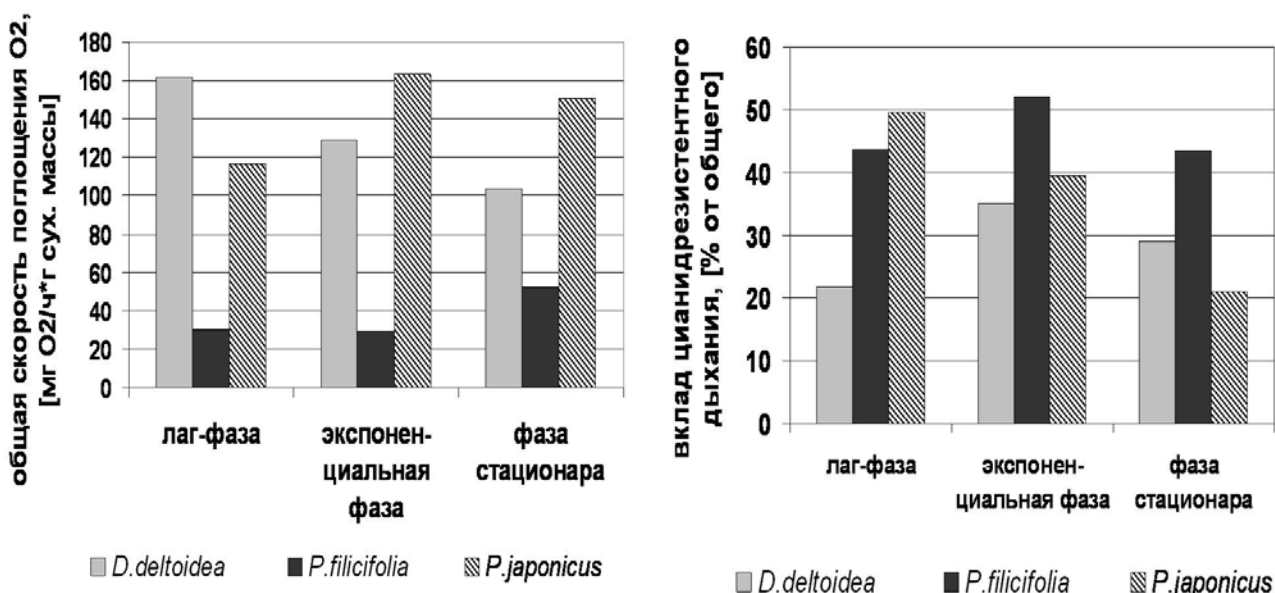
Как следует из представленных результатов, исследуемые штаммы обладают достаточно высокими характеристиками роста (табл.1). Наиболее высокие ростовые показатели наблюдали для суспензионной культуры *Polyscias filicifolia*, для которой были получены максимальные значения M_{\max_dw} , μ и I . (12.80 г/л, 0.22 сут⁻¹ и 7.20 соответственно).

Отмечена характерная для культур растительных клеток несбалансированность роста по различным критериям, связанная с растяжением клеток в заключительные стадии ростового цикла (по сырой массе) и частичной синхронизацией деления клеток (по числу клеток).

Известно, что измерение общей скорости поглощения кислорода является информативным методом контроля метаболической активности растительных клеток *in vitro* при культивировании в колбах или биореакторах и может адекватно отражать их реакцию на изменение условий выращивания. Также представляет интерес сравнение доли цианидрезистентного дыхания (активности альтернативной оксидазы, АО) для штаммов культур клеток высших растений, принадлежащих к разным видам, отличающихся механизмами адаптации к стрессовым условиям и по классам синтезируемых вторичных метаболитов.

На рис.2 представлены результаты измерений интенсивности дыхания исследуемых культур в течение ростового цикла при стандартном культивировании в колбах. Все исследуемые штаммы суспензионных культур растительных клеток отличались по общей скорости поглощения кислорода. Наиболее высокий уровень дыхательной активности был получен для клеток *Dioscorea deltoidea* и *Panax japonicus* – на протяжении всего цикла роста общая интенсивность дыхания этих культур-продуцентов была в 3-4 раза выше, чем у *Polyscias filicifolia*. Также отмечены разли-

чия в динамике изменения общей скорости поглощения кислорода для разных штаммов по фазам ростового цикла. Максимальные значения для *Dioscorea deltoidea* наблюдали в лаг фазе (161.75 ± 19.19 мгО₂/ч*г сухой массы) с постепенным снижением общей интенсивности дыхания в последующие фазы роста. Для штамма *Polyscias filicifolia* в лаг-фазе и экспоненциальной фазе общая скорость поглощения кислорода изменялась незначительно, однако в фазе стационара отмечено повышение дыхательной активности – до 52.43 ± 1.46 мгО₂/ч*г сухой массы. Максимальная интенсивность дыхания для штамма *Panax japonicus* показана в экспоненциальной и стационарных фазах роста – до 153.59 ± 9.81 мгО₂/ч*г сухой массы. У исследуемых штаммов также различен вклад альтернативного пути дыхания в общее поглощение кислорода. Дыхательная активность клеток *Dioscorea deltoidea* на протяжении ростового цикла была обеспечена в основном митохондриальным дыханием, максимальное участие АО наблюдали в экспоненциальной фазе роста (до 35 %). Для культуры клеток *Polyscias filicifolia* высокая активность АО сохранялась в течение всего цикла выращивания (не ниже 43%) и достигала максимальных значений в экспоненциальной фазе (до 52 %). Для *Panax japonicus* активность АО была максимальна в лаг фазе и постепенно снижалась в процессе последующего роста (от 49 до 21 %).



А.

Б.

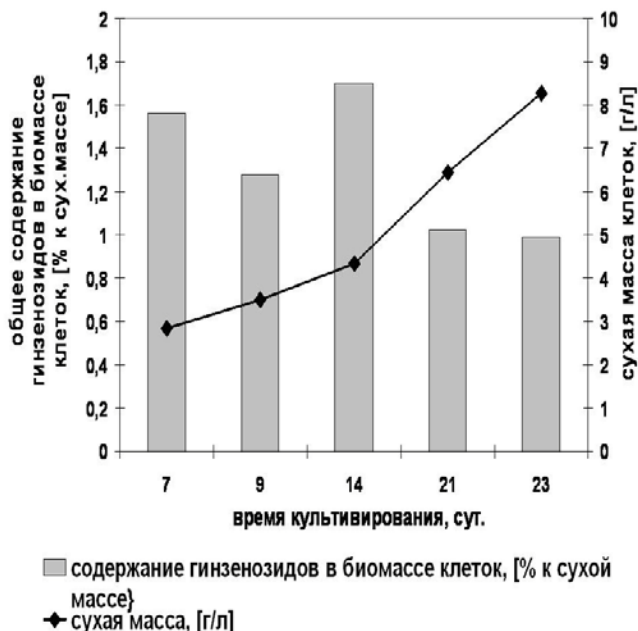
Рис. 2. Общая интенсивность дыхания (А) и вклад АО (Б) на разных стадиях роста культур клеток *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* (выращивание в колбах).

Важнейшей характеристикой штаммов-продуцентов является содержание в клеточной биомассе целевых продуктов вторичного метаболизма. В связи с этим для культур клеток *Dioscorea deltoidea* и *Panax japonicus* была изучена динамика накопления вторичных метаболитов (фуростаноловых гликозидов и гинзенозидов соответственно) в цикле субкультивирования (рис. 3 и 4).

Рис. 3. Динамика накопления фуростаноловых гликозидов в цикле субкультивирования для суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* при стандартном выращивании в колбах объемом 250 мл



А.



Б.

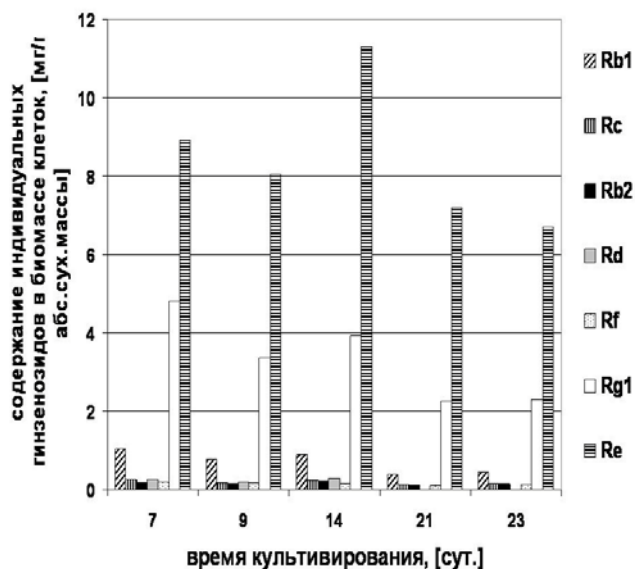


Рис. 4. Динамика накопления гинзенозидов в цикле субкультивирования для суспензионной культуры клеток *P. japonicus* при стандартном выращивании в колбах объемом 250 мл: а – общее содержание гинзенозидов; б – содержание индивидуальных гинзенозидов.

Для штамма *D. deltoidea* активный синтез фураностаноловых гликозидов сохранялся на протяжении всего цикла роста, причем максимум их содержания наблюдали в основном в стационарной фазе роста (12-16 сутки) - до 12.9 % к сухой массе клеток. (рис. 3) У суспензионной культуры *Panax japonicus* наиболее активный синтез приходился на 12-14 сутки и достигал 1.70 % к сухой массе клеток по общему содержанию гинзенозидов. (рис. 4а) Количественное содержание индивидуальных гинзенозидов представлено на рис. 4б. Показано присутствие основных гинзенозидов дамманового ряда - Rb-группы (агликон протопанаксадиол – Rb1, Rс, Rb2, Rd) и Rg-группы (агликон протопанаксатриол – Rg1, Re, Rf). Из результатов произведенного анализа следует, что мажорными являются Rg1- и Re-гинзенозиды (до 4.0-4.8 и до 11.3 мг/г абс. сухой массы соответственно), что соответствует данным, полученным для *P. japonicus* ранее. (Чайко и др., 1999; Смоленская и др., 2001)

Таким образом, на первом этапе работы суспензионные культуры клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* были охарактеризованы по основным физиологическим параметрам при стандартном периодическом культивировании в колбах. Все исследуемые штаммы обладали достаточно высокими ростовыми и биосинтетическими показателями для проведения дальнейших экспериментов по аппаратному выращиванию.

2. Изучение физиологических показателей суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при выращивании в биореакторах.

При проведении экспериментов по длительному полупромышленному аппаратному выращиванию использовали следующий алгоритм:

- предварительные эксперименты в лабораторном и пилотном биореакторах по выращиванию штаммов в периодическом режиме;
- полупроточное выращивание в лабораторном и пилотном биореакторах (режим «отъем суспензии-долив среды»);
- масштабирование выращивания в полупроточном режиме до полупромышленного биореактора.

Режимы перемешивания и аэрации суспензионных культур клеток подбирали экспериментально с учетом следующих требований:

- изменение расхода воздуха на аэрацию должно происходить с таким расчетом, чтобы концентрация растворенного кислорода (pO_2) не опускалась ниже 10-15 %;
- скорость вращения мешалки необходимо сочетать с интенсивностью аэрации таким образом, чтобы в биореакторе отсутствовали застойные зоны.

2.1. Культивирование в периодическом режиме.

2.1.1. Культивирование в лабораторном биореакторе объемом 20 л.

Проведенные ранее в Отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН работы показали, что наименьшее стрессовое воздействие на клетки оказывают барботажные ферментеры V-типа, в которых перемешивание осуществляется за счет потока стерильного воздуха, подаваемого в аппарат под давлением. (Липский, 1992; Ключин и др., 2000)

Для штаммов *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* было проведено периодическое выращивание в лабораторных барботажных биореакторах (с рабочим объемом 15 л). Для оптимизации плотности инокулюма были выбраны два варианта начальной концентрации клеточных суспензий – 2 г/л и 3 г/л по сухой массе клеток. В процессе культивирования определяли накопление сухой биомассы клеток и изменение жизнеспособности. Полученные в результате представлены в таблице 2.

Таблица 2. Ростовые показатели суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* при периодическом выращивании в 20 л барботажном биореакторе.

Культура	ρ_0 , г/л	M_{\max_dw} , г/л	v , %	I_{dw}	μ_{dw} , сут ⁻¹
<i>Dioscorea deltoidea</i>	2 г/л	8.12	80 – 90	4.06	0.10
	3 г/л	8.97	82 – 88	3.00	0.11
<i>Polyscias filicifolia</i>	2 г/л	13.40	88 – 92	6.68	0.18
	3 г/л	15.10	88 – 90	5.03	0.23
<i>Panax japonicus</i>	2 г/л	9.32	90 – 92	4.66	0.12
	3 г/л	8.20	85 – 90	2.73	0.14

где M_{\max_dw} – максимальное значение концентрации биомассы по сухому весу;
 v – жизнеспособность клеток; μ – удельная скорость роста клеток; I – индекс роста;
 ρ – начальная концентрация клеточных суспензий по сухой массе клеток.

Общий характер роста исследуемых культур клеток в аппаратах данного типа при периодическом режиме был сходен с характером их роста в колбах. Установ-

лено, что увеличение начальной плотности до 3 г/л по сухой массе клеток приводило к увеличению удельной скорости роста у штаммов *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* (на 25, 15 и 10 % соответственно). Однако для клеточной суспензии *P. japonicus* при этом наблюдали снижение жизнеспособности к концу цикла субкультивирования (до 85%) и уровня максимального накопления клеточной биомассы (на 10 %).

В целом, как показали полученные результаты, увеличение начальной плотности клеточной суспензии при инокуляции 20л биореактора до 3 г/л по сухому весу оптимально для штаммов *D.deltoidea* и *P.filicifolia*, тогда как для штамма *Panax japonicus* предпочтительней ρ_0 2 г/л.

2.1.2 Культивирование в пилотном биореакторе объемом 75 л.

При использовании аппарата с механическим перемешивающим устройством, для снижения стрессового механического воздействия на начальных фазах роста устанавливали минимальную скорость перемешивания порядка 35-40 об/мин (по отсутствию седиментации клеток). По мере роста культур клеток скорость вращения мешалки увеличивали до максимально возможной, не приводящей к разрушению клеток – 55-60 об/мин. При увеличении скорости вращения выше 75 об/мин наблюдали быстрое падение жизнеспособности и появление в культуральной среде значительного количества разрушенных клеток. (табл.3). Дальнейшие эксперименты проводили при наиболее щадящих условиях механического перемешивания – при скорости вращения мешалки в пределах 35-50 об/мин.

Таблица 3. Влияние скорости вращения перемешивающего устройства на жизнеспособность исследуемых штаммов при периодическом выращивании в 75л биореакторе.

Культура	скорость вращения перемешивающего устройства, об/мин		
	35-40	55-60	>75
<i>D.deltoidea</i>	79 – 83 %	75 – 77 %	< 70 %
<i>P. filicifolia</i>	79 – 84 %	76 – 80 %	< 70 %
<i>P. japonicus</i>	79 – 83 %	79 – 81 %	< 70 %

Таблица 4. Ростовые показатели исследуемых штаммов при периодическом выращивании в 75л биореакторе (скорость вращения мешалки 35-50 об/мин).

Культура	M_{\max_dw} г/л	μ_{dw} , сут ⁻¹	I_{dw}
<i>D. deltoidea</i>	8.19	0.08	3.80
<i>P. filicifolia</i>	11.80	0.10	4.72
<i>P. japonicus</i>	9.05	0.09	3.77

Обозначения см. Таблицу 1.

В процессе культивирования также определяли накопление сухой биомассы клеток и изменение жизнеспособности. Полученные в результате проведенных экспериментов ростовые показатели представлены в сводной таблице 4.

Показано, что в сравнении с проведенным ранее периодическим культивированием в колбах и барботажных биореакторах при выращивании в аппарате данного типа происходило значительное снижение ростовых характеристик всех исследуемых штаммов. Наиболее выраженное изменение наблюдали для жизнеспособности и удельной скорости роста – эти показатели снизились в среднем на 15-20 % . Такой характер изменения ростовых параметров обусловлен, по-видимому, повреждающим действием перемешивающего устройства на клетки суспензии (несмотря на выбранный максимально щадящий режим перемешивания), а также особенностями его конструкции.

Полученные на данном этапе работ результаты показывают, что ростовые показатели суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus* и *Dioscorea deltoidea* в значительной степени зависят от условий культивирования, в частности от технических характеристик аппаратов (интенсивности аэрации и перемешивания, конструктивных особенностей), а также, по видимому, обусловлены различной способностью к адаптации исследованных клеточных штаммов вследствие цитологических различий.

2.2. Культивирование в режиме полупотока (многоциклическая схема).

Для реализации «отъемно-доливного» режима культивирования был использован ряд аппаратов с рабочим объемом от 15 до 550 литров и различной системой перемешивания, причем аппараты меньшего объема использовали как инокуляторы для аппаратов большего объема.

В течение 10 лет для каждого штамма были проведены многократные эксперименты по длительному полупроточному культивированию во всех типах биореакторов. Процесс «отъем суспензии - долив среды» осуществляли при достижении плотности суспензии, соответствующей началу фазы замедления роста. Разбавление средой в каждом цикле проводили до концентрации биомассы, исключающей появление лаг-фазы (не ниже 2.0-2.5 г/л среды по сухому весу). В процессе культивирования определяли физиологические и продукционные (по биомассе и целевым продуктам) показатели исследуемых суспензионных культур клеток.

2.2.1. Культивирование в лабораторном биореакторе объемом 20 л. При выращивании исследуемых штаммов «отъемно-доливым» способом в 20 л барботажном биореакторе общая продолжительность мультициклов варьировала в пределах 60-150 суток, причем каждый мультицикл состоял из 6-14 циклов субкультивирования. В ряде экспериментов выращивание осуществляли параллельно в 2 – 3 биореакторах.

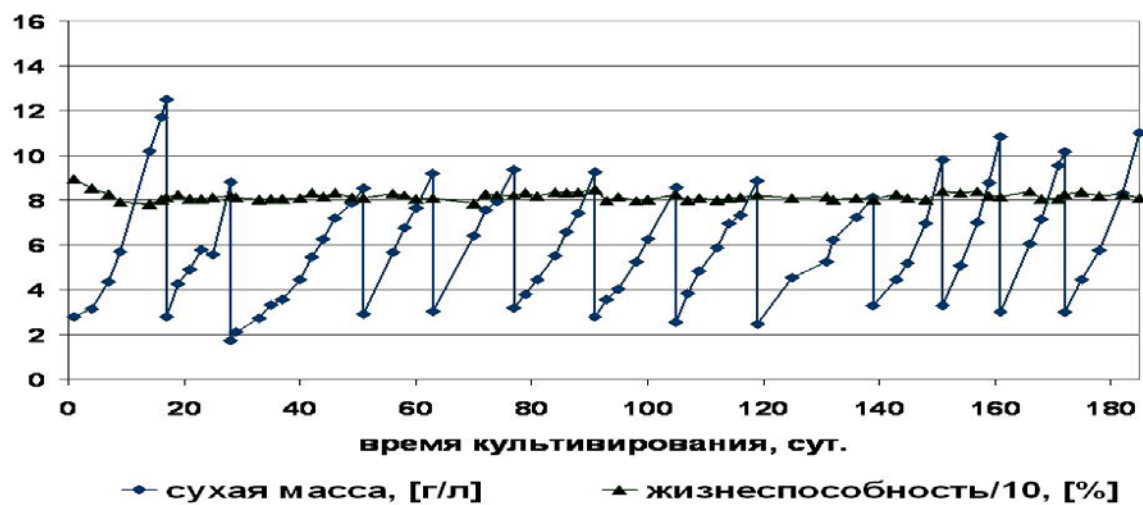
Полученные типичные кривые роста, а также соответствующие им основные ростовые характеристики приведены на рис.5 и в табл.5. Из представленных результатов следует, что ростовые показатели штаммов соответствуют таковым, полученным ранее при периодическом выращивании в колбах и барботажном биореакторе. Жизнеспособность клеток сохранялась на уровне 80-90% для всех штаммов, максимальное накопление сухой биомассы наблюдали на 11-14 день культивирования (до 12 г/л, 15 г/л и 10 г/л по сухой массе клеток для *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* соответственно). (табл.5.) На том же уровне при длительном полупроточном выращивании сохраняется и скорость прироста клеточной биомассы. Аналогичную картину наблюдали при проведении повторных экспериментов.

Таблица 5. Ростовые показатели суспензионных культур клеток при полупроточном выращивании в 20л барботажном биореакторе.

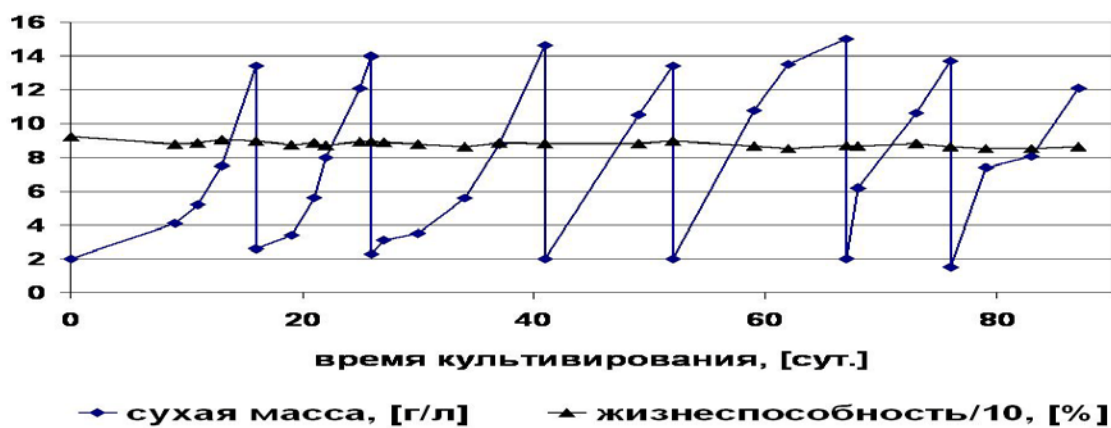
Культура	M_{\max_dw} , г/л	v , %	μ_{dw} , сут ⁻¹	I_{dw}
<i>Dioscorea deltoidea</i>	8.50 – 12.50	80 – 85	0.11 – 0.13	2.28 – 3.98
<i>Polyscias filicifolia</i>	10.00 – 15.12	85 – 90	0.16 – 0.23	6.51 – 7.10
<i>Panax japonicus</i>	8.65 – 10.78	84 – 91	0.12 – 0.14	3.32 – 4.87

Обозначения см.Таблицу 1.

Dioscorea deltoidea



Polyscias filicifolia



Panax japonicus

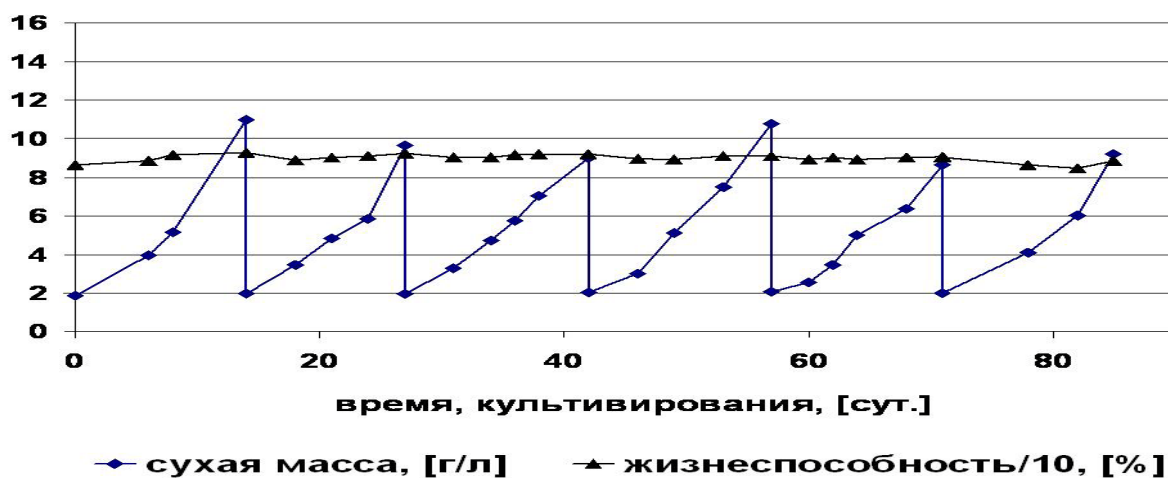


Рис. 5. Динамика роста суспензионных культур клеток при полупроточном выращивании в 20 л барботажном биореакторе

2.2.2. Культивирование в пилотном биореакторе объемом 75 л.

При отработке длительного полупроточного культивирования в пилотном 75 л биореакторе для всех штаммов проводили выращивание в режиме «отлива-долива», где каждый мультицикл состоял из 2-4 циклов субкультивирования. Общая продолжительность мультициклов для всех вариантов не превышала 60 суток. Следует отметить, что получить устойчивый рост штаммов с сохранением продуктивности по биомассе и целевым продуктам вторичного метаболизма в течение более длительного времени в 75л биореакторе не удалось.

Режим аэрации и механического перемешивания соответствовал схеме, отработанной при периодическом культивировании в аппарате данного типа.

Полученные основные ростовые характеристики приведены в табл.6.

Таблица 6. Ростовые показатели суспензионных культур клеток при полупроточном выращивании в 75л пилотном биореакторе.

Культура	M_{\max_dw} , г/л	v , %	μ_{dw} , сут ⁻¹	I_{dw}
<i>Dioscorea deltoidea</i>	7.70 – 8.40	74 – 79	0.08 – 0.11	2.11 – 3.09
<i>Polyscias filicifolia</i>	10.70 – 12.10	79 – 82	0.12 – 0.14	3.76 – 5.10
<i>Panax japonicus</i>	8.50 – 9.50	80 – 85	0.09 – 0.10	2.62 – 3.51

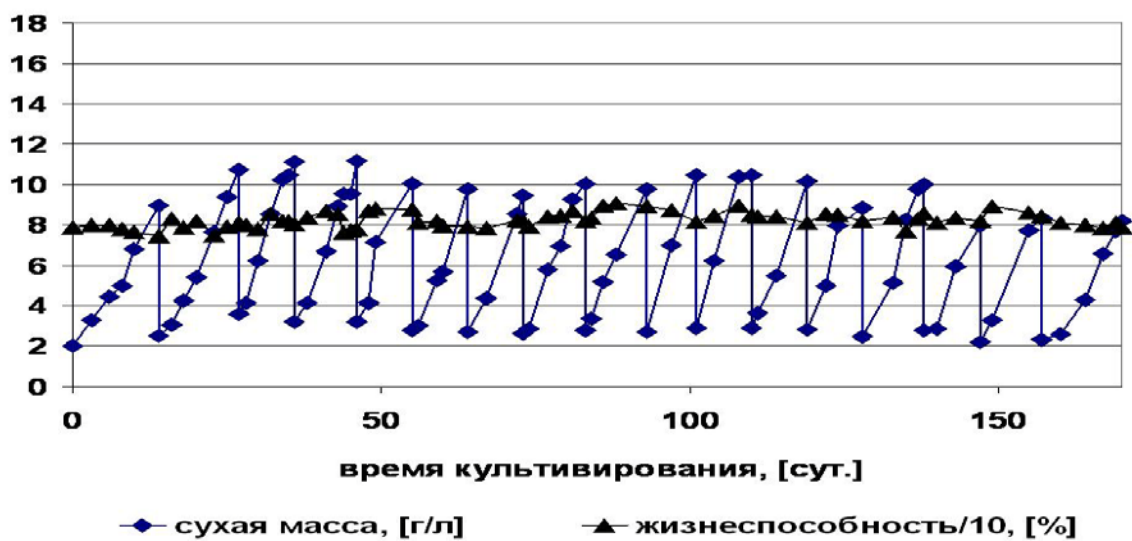
Обозначения см. Таблицу 1.

Показано характерное для данного биореактора снижение основных ростовых показателей культур клеток – жизнеспособности и скорости накопления клеточной биомассы (в среднем на 15-20% в сравнении с контрольными). Отмечали появление большого количества разрушенных клеток в среде культивирования, что затрудняло дальнейшее отделение клеток от культуральной жидкости при фильтрации.

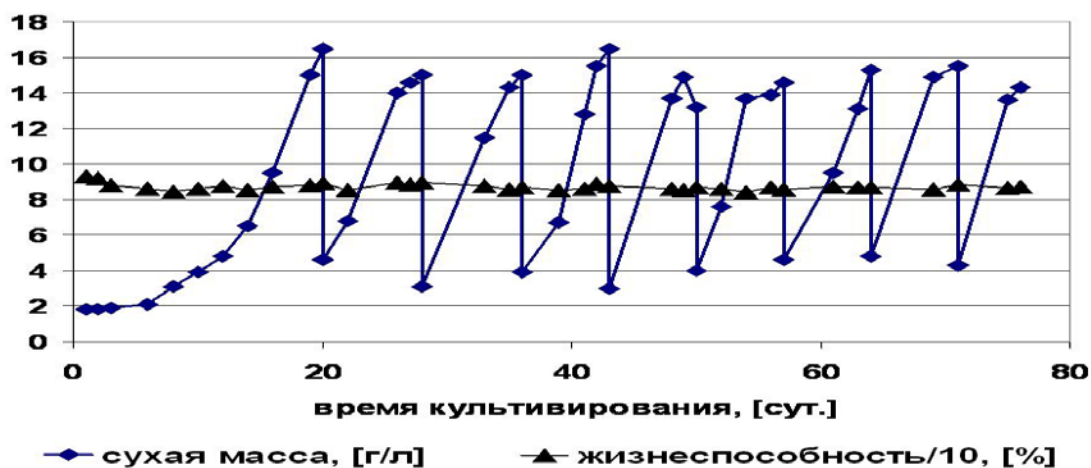
2.2.3. Культивирование в полупромышленном барботажном биореакторе объемом 630 л.

Основным этапом исследований были эксперименты по длительному непрерывному полупроточному выращиванию в полупромышленном барботажном биореакторе с кольцевым барботёром и объёмом 630 литров. Алгоритм культивирования и режимы перемешивания соответствовали отработанным ранее в аппаратах меньшего объема. На рис 6 и в табл.7 представлены полученные динамики роста штаммов, а также основные ростовые показатели.

Dioscorea deltoidea



Polyscias filicifolia



Panax japonicus

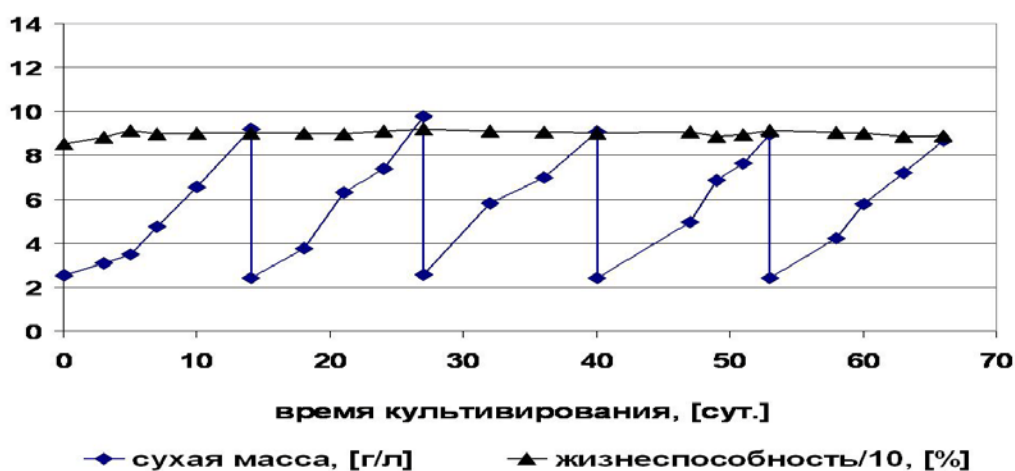


Рис. 6. Динамика роста суспензионных культур клеток при полупроточном выращивании в 630 л барботажном биореакторе.

Продемонстрировано, что при переходе к непрерывному длительному выращиванию в полупромышленных аппаратах ростовые показатели исследуемых штаммов также сохраняются на достаточно высоком уровне.

Таблица 7. Ростовые показатели суспензионных культур клеток при полупрочном выращивании в 630л барботажном биореакторе

Культура	M_{\max_dw} , г/л	v , %	μ_{dw} , сут ⁻¹	I_{dw}
<i>Dioscorea deltoidea</i>	8.87 – 11.13	79 – 86	0.11 – 0.14	2.78 – 3.93
<i>Polyscias filicifolia</i>	13.00 – 16.55	85 – 90	0.12 – 0.19	3.21 – 5.27
<i>Panax japonicus</i>	9.85 – 8.60	88 – 92	0.11 – 0.13	2.54 – 3.14

Обозначения см. Таблицу 1.

2.2.4. Влияние смены системы культивирования на степень агрегированности суспензионных культур растительных клеток.

В процессе масштабирования процесса выращивания определяли изменение степени агрегированности клеточных суспензий. Показано, что при переходе к выращиванию в аппарате с механическим перемешиванием вследствие травматического разрушающего воздействия перемешивающего устройства почти в 2 раза снижается число крупных агрегатов с числом клеток >50 у крупноагрегированных суспензий *Panax japonicus* и *Polyscias filicifolia*, а также уменьшается количество одиночных клеток и мелких агрегатов (от 1 до 10 клеток) для всех штаммов. Напротив, при выращивании в 630л барботажном аппарате для всех вариантов отмечено некоторое увеличение степени агрегированности (количество крупных клеточных кластеров увеличивается в среднем на 15-20%).

2.2.5. Влияние смены системы культивирования на дыхательную активность суспензионных культур растительных клеток.

При масштабировании аппаратного выращивания культур клеток до промышленных объемов важнейшей задачей является мониторинг физиологического состояния клеток. В работе была оценена возможность использования в качестве подобного экспресс-теста анализ активности дыхательного метаболизма клеток. Кроме того, поскольку кислород является одним из основных лимитирующих факторов при глубинном выращивании растительных клеток *in vitro*, представлялось актуальным изучить влияние массообменных характеристик используемых систем культивирования на дыхательную активность штаммов. Исследования проводили на примере штамма-

продуцента *Dioscorea deltoidea*, для которого при полупроточном выращивании в барботажных биореакторах (20 л и 630 л) в экспоненциальной фазе роста измеряли общую скорость поглощения кислорода и долю АО в этом процессе. Полученные результаты представлены на рис. 7.

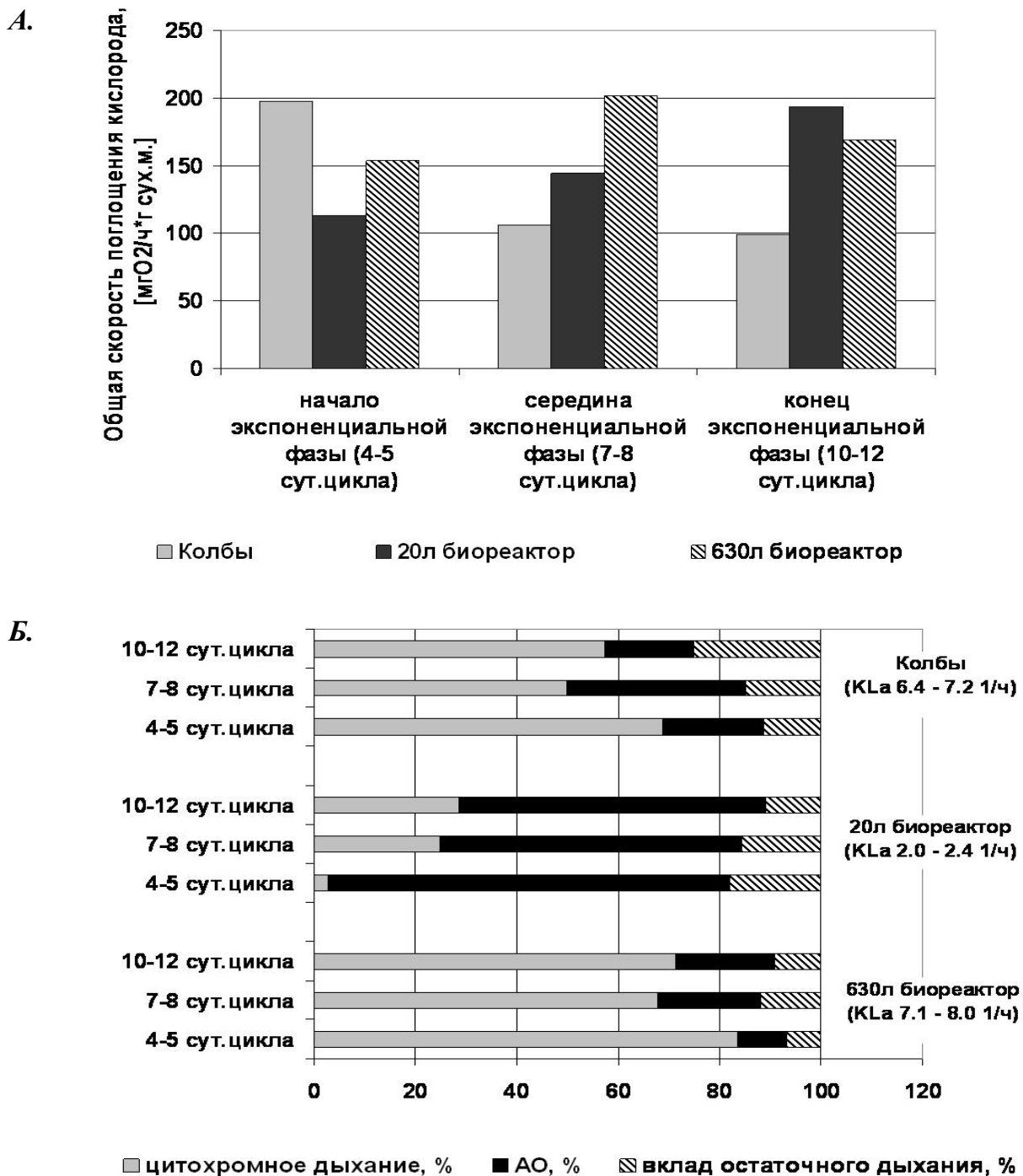


Рис. 7. Вклад различных путей дыхания (в % от общей интенсивности, Б) в общее поглощение кислорода (А) клетками *Dioscorea deltoidea* Wall. в экспоненциальной стадии роста при культивировании в различных системах.

Для каждого биореактора измерения проводили на протяжении 3 циклов субкультурирования, начиная со 2-ого цикла от момента инокуляции. Коэффициенты массопередачи по кислороду (K_{La} , $ч^{-1}$) определяли при оптимальных режимах перемешивания и аэрации.

По представленным данным видно, что максимальная доля цианидрезистентного дыхания наблюдалась при выращивании в 20 л барботажном биореакторе с точечным аэрирующим устройством. Для этого же аппарата были получены минимальные значения K_{La} , а также был отмечен более низкий уровень содержания фураностаноловых гликозидов (см.табл. 8) и более низкая продуктивность по накоплению клеточной биомассы (см.табл. 5). Минимальная активность АО была отмечена для системы с более интенсивным массообменом по кислороду – 630 л барботажного биореактора с кольцевым аэратором. Для этого же биореактора отмечали более высокие ростовые и биосинтетические показатели (см.табл. 8 и 7).

2.2.6. Влияние смены системы культивирования на накопление вторичных метаболитов у штаммов продуцентов *Dioscorea deltoidea* и *Panax japonicus*.

Для изучения влияния смены условий культивирования на синтез вторичных метаболитов у штаммов-продуцентов проводили исследование изменения содержания фураностаноловых гликозидов и гинзенозидов в биомассе клеток *Dioscorea deltoidea* и *Panax japonicus* соответственно при полупроточном выращивании в биореакторах различного типа. Полученные результаты представлены в табл. 8 и 9.

В целом динамика накопления целевых метаболитов соответствовала динамике их накопления при стандартном выращивании штаммов-продуцентов в колбах. Максимальное содержание фураностаноловых гликозидов и гинзенозидов отмечали к концу циклов субкультурирования при достижении соответствующих значений M_{max_dw} . Показано варьирование уровня максимального накопления целевых метаболитов при переходе к длительному аппаратному культивированию по сравнению с результатами химического анализа, полученными при стандартном выращивании в колбах. При выращивании в 20л биореакторе содержание фураностаноловых гликозидов в биомассе клеток *D.deltoidea* в среднем не превышало 8.0 % к сухой массе клеток (при 5.6 – 12.0 % к сухой массе клеток при выращивании в колбах). Для культуры клеток *P.japonicus* наблюдали снижение общего содержания гинзенозидов и изменения в соотношении

индивидуальных гинзенозидов, в частности – в 2.0 раза снизилось содержание Re гинзенозидов, в 1.5 раза – Rd и Rb2 гинзенозидов, в 2.5-3 раза – Rb1 гинзенозидов.

Таблица 8. Содержание фураностаноловых гликозидов в биомассе клеток *Dioscorea deltoidea* при полупроточном выращивании в различных системах (в % к сухой массе клеток в период максимального накопления биомассы)

Параметр	20л биореактор	75л биореактор “Electrolux”	630л биореактор	Колбы (контроль)
F_{\max_dw} , [% к сухой массе клеток]	4.2 – 8.0	3.4 – 4.7	7.7 – 13.9	5.6 – 12.0

F_{\max_dw} – максимальное содержание фураностаноловых гликозидов в биомассе клеток

Таблица 9. Содержание индивидуальных гинзенозидов в биомассе клеток *Panax japonicus* при полупроточном выращивании в различных системах (в мг/г сухой массы клеток в период максимального накопления биомассы)

$G_{i\max_dw}$	20л биореактор	75л биореактор “Electrolux”	630л биореактор	Колбы (контроль)
Rb1	0.14 – 0.36	0.16 – 0.27	0.16 – 0.34	0.41 – 1.00
Rc	0.07 – 0.20	0.19 – 0.24	0.05 – 0.44	0.12 – 0.23
Rb2	0.05 – 0.19	0.05 – 0.13	0.05 – 0.11	0.11 – 0.22
Rd	0.05 – 0.28	0.08 – 0.10	0.05 – 0.08	0.11 – 0.27
Rf	0.16 – 0.22	0.22 – 0.31	0.14 – 0.42	0.10 – 0.19
Rg1	2.32 – 4.26	2.33 – 4.84	2.31 – 5.80	2.27 – 4.80
Re	2.50 – 4.29	4.00 – 10.20	2.00 – 3.83	6.70 – 8.91

$G_{i\max_dw}$ – максимальное содержание индивидуальных гинзенозидов в биомассе клеток

При культивировании в 75 л аппарате для *D.deltoidea* наблюдалось снижение уровня содержания фураностаноловых гликозидов в среднем в 2.0-2.5 раза (до 3.4-4.7 % к сухой массе клеток). Для *Panax japonicus* не отмечено существенных изменений в содержании гинзенозидов Re, Rc, Rf и Rg1, однако показано уменьшение уровня содержания Rb1 гинзенозидов – в среднем в 2.5-3.0 раза, а также Rd и Rb2 гинзенозидов – в 2.0 раза. Аналогичный эффект для *Panax japonicus* наблюдали при масштабировании выращивания до 630 л биореактора, однако для клеток *D.deltoidea* уменьшения уровня накопления фураностаноловых гликозидов в этом аппарате не отмечено.

На основании представленных данных можно предположить, что уменьшение уровня накопления Rb1, Rd и Rb2 гинзенозидов является специфической стрессовой реакцией клеток *Panax japonicus* на изменение условий культивирования при переходе к аппаратному выращиванию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При масштабировании аппаратного глубинного культивирования растительных клеток, как правило, достаточно сложно точно предсказать адаптационные изменения поведения используемых штаммов, т.к. сложно точно выдержать геометрическое и технологическое подобие используемого оборудования. Мы рассмотрели эту проблему при помощи поэтапного анализа наиболее существенных физиологических параметров культур растительных клеток на всех стадиях процесса масштабирования - от колб до биореакторов полупромышленного объема.

Были выявлены характерные отличия исследуемых культур по динамике роста и накопления вторичных метаболитов. Полученные результаты показали, что отобранные штаммы являются лабильными системами, достаточно чувствительными к смене условий культивирования и претерпевающими определенные перестройки в результате изменений условий выращивания. Представленные данные также позволяют сделать вывод, что дыхательная активность клеток штаммов-продуцентов является информативной характеристикой физиологического состояния культуры и может быть использована для мониторинга и оптимизации роста клеток при масштабировании процесса выращивания. При анализе полученных результатов отмечена определенная корреляция между изменением интенсивности дыхания и динамикой накопления вторичных метаболитов для культур-продуцентов *Dioscorea deltoidea* и *Panax japonicus* – максимальную скорость поглощения кислорода наблюдали перед началом активного синтеза соответствующих вторичных метаболитов. Кроме того, на примере *Dioscorea deltoidea* показана зависимость активности АО от условий выращивания, в частности - от массообменных характеристик систем культивирования.

Подтверждено, что для проведения длительного аппаратного культивирования штаммов-продуцентов предпочтительной системой является барботажный биореактор. При использовании аппаратов этого типа (20 л и 630 л биореакторы) для исследуемых штаммов наблюдали наиболее высокие ростовые и биосинтетические харак-

теристики. Выращивание «отъемно-доливым» способом в данном случае в целом было более продуктивно как по выходу клеточной биомассы, так и по целевым продуктам вторичного метаболизма. Анализ полученных данных также показывает, что для создания наиболее оптимальных условий массообмена и предотвращения лимитирования роста скоростью переноса кислорода в аппаратах различной емкости предпочтительно использовать не точечные, а кольцевые аэраторы. Пилотный аппарат с механическим перемешиванием, для которого были получены более низкие физиологические показатели, может быть рекомендован для краткосрочного культивирования в качестве промежуточного звена при переходе к промышленным аппаратам.

Важно отметить воспроизводимость основных ростовых и биосинтетических характеристик для всех выбранных штаммов при переходе к длительному аппаратному культивированию. Масштабирование выращивания суспензионных культур клеток *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* по представленной схеме с использованием «отъемно-доливного» метода повторяли неоднократно при сохранении удовлетворительных физиологических показателей штаммов. Эту же схему успешно использовали для аппаратного глубинного культивирования клеток высших растений других видов (*Stephania glabra*, *Polyscias fruticosa*).

На основе отработанных в результате проведенных работ технологий составлены проекты опытно-промышленных технологических регламентов получения биомассы культур растительных клеток в полупромышленных установках.

ВЫВОДЫ.

1. Проведено комплексное исследование основных закономерностей роста, а также дыхательной и биосинтетической активности суспензионных культур клеток *P. filicifolia*, *P. japonicus* и *D. deltoidea* при стандартном выращивании в колбах. Все штаммы обладали достаточно высокими физиологическими характеристиками для проведения аппаратного выращивания – жизнеспособность в пределах 90-97%, удельная скорость роста в среднем в пределах 0,15-0,20 сут.⁻¹, индекс роста в среднем в пределах 4,00-6,00.
2. Проведено масштабирование и впервые осуществлено длительное (до 8-12 циклов субкультивирования) непрерывное выращивание суспензионных культур клеток *P. japonicus* и *D. deltoidea* «отъемно-доливым» методом в пилотных и полупромыш-

ленных аппаратах при сохранении высокой продуктивности штаммов по биомассе клеток и целевым вторичным метаболитам. Показана стабильность и воспроизводимость основных показателей штаммов при выращивании по предложенной схеме.

3. Отработана и усовершенствована технология длительного непрерывного выращивания суспензионной культуры клеток *Polyscias filicifolia* «отъемно-доливным» методом в полупромышленных аппаратах объемом 630 л при сохранении высокой продуктивности по клеточной биомассе.

4. На примере аппаратного культивирования клеток *D. deltoidea* показана зависимость активности цианидрезистентного дыхания от условий выращивания, в частности - от массообменных характеристик систем культивирования. Показана возможность использования этого показателя для мониторинга физиологического состояния культуры при масштабировании процесса выращивания.

5. Показано, что предпочтительной системой для длительного непрерывного глубинного культивирования клеток *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* являются барботажные биореакторы с кольцевыми аэраторами – для аппаратов именно этого типа получены наиболее высокие ростовые и биосинтетические показатели отобранных штаммов.

6. С использованием трех культур клеток высших растений, относящихся к различным таксономическим группам, показано, что переход к аппаратному выращиванию можно проводить по единой технологической схеме с учетом индивидуальных особенностей штаммов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК:

Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Коростелев В.В., Орешников А.В., Носов А.М. (2006) Длительное аппаратное выращивание суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* Wall в полупроточном режиме. *Биотехнология*, № 2, с. 28-31

Титова М.В., Шумило Н.А., Черняк Н.Д., Кривохарченко А.С., Орешников А.В., Носов А.М. (2007) Использование криосохранения для поддержания стабильности штамма при аппаратном культивировании суспензии клеток *Polyscias filicifolia* Bailey: 1. Оценка ростовых характеристик возобновленной культуры. *Биотехнология*, № 5, с. 60-65

Титова М.В., Решетняк О.В., Осипова Е.А., Осипьянц А.И., Шумило Н.А., Орешников А.В., Носов А.М. (2011) Выращивание суспензионной культуры клеток *Stephania*

glabra (Roxb.) Miers в различных системах: особенности роста и накопления алкалоида стефарина. *Биотехнология*, № 4, с. 40-46

Титова М.В., Беркович Е.А., Решетняк О.В., Куличенко И.Е., Орешников А.В., Носов А.М. (2011) Дыхательная активность суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia* Bailey, *Stephania glabra* (Roxb.) Miers и *Dioscorea deltoidea* Wall. *Прикладная биохимия и микробиология*, том 47, № 1, с. 95-101

Титова М.В., Решетняк О.В., Осипова Е.А., Суханова Е.С., Осипьянц А.И., Шумило Н.А., Орешников А.В., Носов А.М. (2012) Глубинное культивирование клеток *Stephania glabra* (Roxb) Miers: оптимизация гормонального состава питательных сред. *Вестник Марийского Государственного Технического Университета*, № 1 (14), с. 101-107

Кочкин Д.В., Зайцев Г.П., Качала В.В., Чижов А.О., Демидова Е.В., **Титова М.В.**, Чирва В.Я., Носов А.М., Кузнецов Вл В. (2012) Обнаружение гипенозида XVII в суспензионной культуре клеток женьшеня *Panax japonicus* var. *repens*. *Доклады РАН*, том 442, с. 705-708

Суханова Е.С., Кочкин Д.В., **Титова М.В.**, Носов А.М. (2012) Ростовые и биосинтетические характеристики разных штаммов культур клеток растений рода *Polyscias*. *Вестник ПГТУ*, №2

В прочих изданиях:

Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Орешников А.В., Носов А.М. (2003) Длительное культивирование суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* Wall в полупроточном режиме. *Сборник тезисов докладов VIII Международной конференции «Биология растительных клеток in vitro и биотехнология»*, с. 167-167

Титова М.В., Коростелев В.В., Орешников А.В., Носов А.М. (2003) Культивирование клеток *Polyscias filicifolia* Bailey в пилотном аппарате отъемно-доливным методом. *Сборник тезисов докладов VIII Международной конференции «Биология растительных клеток in vitro и биотехнология»*, с. 317-317

Tomczyk A., Kropczynska D., Ptak A., **Titova M.V.**, Shumilo N., Oreshnikov A., Nosov A., Furmanova M. (2007) Effect of *Polyscias filicifolia* extracts on the behavior of the L1af minor Camereria ohridella Deschka and Dimic on horse chestnut trees. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, том 49, № 1, с. 50-60

Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Беркович Е.А., Орешников А.В., Носов А.М. (2008) Аппаратное культивирование суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* Wall. *Сборник тезисов докладов Материалы IX конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология», 8-12 сентября 2008 г., Звенигород, Россия*, с. 400-400

Демидова Е.В., Решетняк О.В., Орешников А.В., **Титова М.В.**, Шумило Н.А., Носов А.М. (2008) Выращивание суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* var. *repens* с использованием сахарозы разной степени очистки в аппарате полупромышленного объема. *Сборник тезисов докладов Материалы IX конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология», 8-12 сентября 2008 г., Звенигород, Россия*, с. 106-106

Решетняк О.В., **Титова М.В.**, Осипова Е.А., Шумило Н.А., Коростелев В.В., Осипьянц А.И., Орешников А.В., Носов А.М. (2008) Изучение ростовых и биосинтетиче-

ских характеристик трех штаммов суспензионной культуры *STEPHANIA GLABRA* (ROXB.) MIERS. при выращивании в колбах и биореакторах. Сборник тезисов докладов *Материалы IX конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология», 8-12 сентября 2008 г., Звенигород, Россия*, с. 322-322

Беркович Е.А., **Титова М.В.**, Куличенко И.Е., Орешников А.В., Носов А.М. (2008) Особенности процесса дыхания в культивируемых in vitro клетках *Dioscorea deltoidea* Wall. Сборник тезисов докладов *Материалы IX конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология», 8-12 сентября 2008 г., Звенигород, Россия*, с. 46-46

Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Орешников А.В., Носов А.М. (2009) Оптимизация выращивания суспензионных культур клеток *Dioscorea deltoidea* Wall и *Polyscias filicifolia* Bailey в полупроточном режиме в биореакторах различного объема. *Труды Никитского Ботанического Сада*, том 131, с. 68-73

Titova M.V. (2009) Scale-up of plant cell suspension culture growth for biomass and secondary metabolites production. Сборник *Materials of the 1st Workshop on Molecular Biotechnology / XV Biotechnology Summer School (Gdansk, Poland)*, с. 58-58

Титова М.В., Суханова Е.С., Куличенко И.Е., Решетняк О.В., Носов А.М. (2010) Влияние ингибиторов мевинолина и фомидомицина на биосинтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. Сборник *Материалы Международной конференции «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере»*, с. 121-125

Суханова Е.С., **Титова М.В.**, Носов А.М. (2010) Исследование суспензионных культур клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms и *Polyscias filicifolia* Bailey. Сборник *Материалы Международной конференции «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере»*, с. 117-121

Кочкин Д.В., Демидова Е.В., **Титова М.В.**, Носов А.М. (2012) Влияние степени очистки сахарозы на накопление гинзенозидов в культуре клеток *PANAX JAPONICUS* VAR. *REPENS* при выращивании в аппаратуре полупромышленного объема. Сборник тезисов докладов *Материалы Международной конференции "Биология - наука XXI века". Москва, 24 мая 2012*, с. 422-423