Министерство образования Российской Федерации

ВОСТОЧНО-СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

В.Ж. Цыренов

Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений

Часть 2
Учебно-методическое пособие

Улан-Удэ 2003

Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: Учебно-методическое пособие. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. - с.

УДК 581.1:575.2

Рассмотрены вопросы культивирования in vitro изолированных клеток, каллусных тканей и протопластов растений, техник введения в культуру и методы культивирования изолированных клеток и тканей, прикладные аспекты культивирования растений in vivo, in vitro, промышленное производство БАВ из культуры клеток растений.

Учебное пособие предназначено для студентов направления 655500 «Биотехнология», 655600 «Производство продуктов питания из сырья растительного происхождения».

Рецензент: профессор *С.Н. Балдаев*, зав кафедрой органической и биологической химии Бурятской сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение
1. Культура клеток, органов и тканей растений
1.1. Историческая справка
1.2. Тотипотентность растительной клетки
1.3. Культура каллусных тканей
1.4. Культура протопластов

2. Техника введения в культуру и методы культивирования изолированных клеток и тканей растений
2.1. Стерилизация
2.2. Питательные среды
2.3. Влияние физических факторов
2.4. Методы культивирования изолированных клеток и тканей для получения БАВ
2.4.1. Твердофазный способ культивирования
2.4.2 Глубинное суспензионное культивирование
2.4.3. Непрерывное культивирование

3. Растения и их культура изолированных клеток и тканей как промышленный источник БАВ
3.1. Растения
3.2. Культура изолированных клеток и тканей

4. Промышленное производство БАВ из культуры клеток
4.1. Подготовка среды для культивирования продуцента и посевного материала (первая стадия)
4.2. Биосинтез БАВ (вторая стадия, главная ферментация)
4.2.1. Суспензионное культивирование для биосинтеза БАВ
4.2.2. Твердофазная ферментация для биосинтеза БАВ
4.3. Выделение и очистка БАВ и получение готовой продукции (третья стадия)
4.3.1. Предварительная обработка
4.3.2. Выделение и очистка БАВ
4.3.3. Получение готовой продукции

Словарь основных терминов клеточной и тканевой биотехнологии

Цитируемая литература

ВВЕДЕНИЕ

Мир растений определяет благополучие человечества. Известно, что 1,9 млрд. тонн (~ 99 %) употребляемого сухого вещества человечество получает из растений. Растения широко используют в различных областях производства: сельское хозяйство, получение продуктов питания, строительство, производство тканей, бумаги и энергии. Особый интерес представляет получение различных химических соединений, биологически активных веществ (БАВ), из которых производят лекарственные препараты (фитопрепараты), химикаты для сельского хозяйства и пр.

Существенное увеличение урожая сельскохозяйственных культур в XX веке достигнуто за счет химизации, механизации и мелиорации сельского хозяйства, что привело к загрязнению окружающей среды, истощению энергетических ресурсов, возрастанию затрат на единицу продукции. Кроме того, дополнительный прогресс в улучшении сельскохозяйственных культур в большинстве случаев достиг своего предела. Поэтому крайне необходимы поиск и внедрение новых подходов.

Среди новых подходов к этой проблеме наиболее перспективным является применение клеточной инженерии (синоним: клеточная и тканевая биотехнология).

Клеточная инженерия (клеточная и тканевая биотехнология) основана на использовании принципиально нового метода – метода изолированной культуры клеток эукариотических организмов (растений, животных). Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах (in vitro) в стерильных условиях получило название метода культуры изолированных тканей.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в трех направлениях (Шевелуха и др., 2003). Первое связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии,

косметики и других отраслей промышленности вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, выращенной на твердой (агаразованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. На основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин из клеток диоскорен, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине и парфюмерии продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимуществом такого способа получения веществ вторичного синтеза является также возможность использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях и получать продукцию круглый год.

Второе направление – это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Третье направление – использование изолированных клеток в селекции растений, дающее возможность получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды: засуха, засоление, низкие и высокие температуры, фитопатогены, тяжелые металлы и др. вместе с тем это направление предусматривает создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получения неполовых (соматических) гибридов.

Без сомнения XXI в. будет веком трансгенных растений. Эти растения, устойчивые к гербицидам, насекомым, вирусам быстро вытесняют старые сорта сельскохозяйственных культур. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов методами генной инженерии является перспективным методом получения трансгенных растений.

Культивирование изолированных пыльников и семяножек на искусственных питательных средах для возможности получать растения из невсхожих (с плохо развитым эндоспермом) гибридных семян. Оплодотворение в пробирке позволяет преодолеть не скрещиваемость некоторых растений.

1. КУЛЬТУРА КЛЕТОК, ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

В целом термин «культура клеток, органов, тканей» применяется асептически выращиваемым частям растений:

1. каллусным тканям на агарированной среде;
2. суспензионной культуре клеток и небольших агрегатов в жидкой среде;
3. культуре протопластов;
4. изолированным зародышам;
5. изолированным органам (кончиков корней, меристемам побегов).

1.1 Историческая справка

Попытки культивировать изолированные клетки ткани растений делались давно, и в истории развития этого метода можно выделить несколько этапов.

I этап (1892-1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Хаберландт, Фёхтинг, Рехингер. Они пытались культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани. Для сегментов стеблей одуванчика и тополя был изучен первичный каллус. Не достигнув положительных результатов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, которые подтвердились позже. Так, Хаберландт выдвинул гипотезу о типотентности любой живой растительной клетки, т.е. способности клеток реализовать свой потенциал развития и давать начало образованию целого растения при определенных условиях культивирования.

II этап (1902-1922гг.) ознаменовался создание первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как использовались мало подходящие для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

III этап (1922-1932 гг.). Американский ученый Робинс и немецкий ученый Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах мер…-ков корня томатов и кукурузы. Однако, через определенное время растительные ткани погибали.

IV этап (1932-1940 гг.). Французский ученый Р.Готре показал возможность долгого культивирования в условиях in vitro растительных тканей за счет периодического пересеивания их на свежую питательную среду. Впоследствии с помощью этого метода многие растения были введены в культуру.

V этап (1940-1960 гг.). С открытием в 1955г нового класса фитогормонов –цитокининов, была получена возможность стимулировать деление клеток кусочка ткани сердцевины паренхимы табака, лишенный проводящих пучков и камбия в зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. Было установлено положительное действие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений для поддержания неорганизованного клеточного роста и стимуляции процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей и клеточных суспензий.

VI этап (1960-1975 гг.). Профессор Ноттингемского университета Э.Коккинг разработал ферментативный метод получения изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивировать их в контролируемых условиях. Его сотрудником Пауэром было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. Французский ученый Ж.Морель разработал метод микроразомножения растений в условиях in vitro с использованием меристемиди культуры и применял его для получения оздоровленного посадочного материала орхидей.

VII этап (1975 г – по настоящее время). Продолжается быстрое развитие техники in vitro, изучение биологии культивируемых объектов, разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti – и Ri – плазмид Agrobacterium tumefaciens и A.rhizogenes. С помощью методов генной инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений. Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений. Однако объектом исследования, как правило, служили однодольные и двудольные травянистые растения и в редких случаях – древесные.

1.2 Тотипотентность растительной клетки.

Методы культивирования изолированных фрагментов растений основаны на исследовании важного свойства растительной клетки – тотипотентности.

Тотипотентность (лат. Totus – весь, potentia - сила) – это свойство клетки реализовать генетическую информацию, обеспечивающую её дифференцировку и развитие до целого организма.

Тотипотентностью обладают оплодотворенные яйцеклетка растений и яйцо животных организмов. Что касается дифференцированных клеток, то у животных тотипотентность присуща только некоторым клеткам кишечнополостных. Так, соматические клетки гидры дают начало новому организму. У высших животных с ранних этапов эмбриогенеза, с началом специализации клеток, тотипотентность не реализуется. Однако клетки, изолированные из эм-

брионов млекопитающих, в условиях культивирования способны сохранять плюрипотентность – способность дифференцироваться во все типы клеток как собственно зародыша, так и экстраэмбриональных тканей. Такие клетки получили название эмбриональных стволовых клеток, с ними связывают решение проблемы пересадки тканей.

У растений в природных условиях тотипотентность могут проявлять и специализированные клетки. Пример тому – вегетативное размножение, в том числе наблюдения в результате развития растений из клеток листьев бегонии, каланхое и др.

Тотипотентность у растений реализуется при заживлении ран; на раневой поверхности растений в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит развитие каллуса (лат. Callus – мозоль, толстая кожа).

Каллус способствует заживлению ран. Однако многие однодомные растений утратили способности к образованию каллуса и вегетативному размножению.

В экспериментальных условиях in vitro при выращивании фрагментов тканей, органов (эксплантов) или клеток на искусственных питательных средах возможна реализация супрессированной (подавленной) in vivo тотипотентности. Это осуществляется под действием регуляторов роста и развития фитогормонов. Реализация супрессированной in vivo тотипотентность легче всего осуществляется как при культивировании меристематических клеток, изолированных из кончиков корней и почек и использования сложных по составу культуральных сред, так и при культивировании каллуса. Эти подходы были удачно реализованы в 30-е годы в работах американского исследователя Филиппа Уайта и французского исследователя Роже Готре, которых принято считать родоначальниками современных методов культивирования изолированных органов и тканей растений.

1.3 Культура каллусных тканей.

Для производства БАВ используют каллусную ткань, которую получают твердофазной ферментацией и глубинным суспензионнным культивированием.

Калусная культура – это неорганизованная профилирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т.е. становятся таким образом дифференцированными. Каллус, может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) in vitro, так и на растении при поражении.

Каллусная ткань in vitro в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого света. Темно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. Последние окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции – рыхлой, средней плотности, плотной.

Основным условием превращения растений клетки в каллусную является присутствие в питательной среде фитогормонов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, приготавливающие её к делению, а цитокинины – пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деление клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делении. Каждая клетка имеет три фазы роста: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку. Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того, чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т.е. клетки

как в меристематическое состояние. Размножение дифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной ткани в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Процесс перехода к каллусному росту в базальной части апекса начинается с остановки клеточных делений. Лаг-фаза продолжается 24-48 часа, в течении которых клетки увеличиваются в размерах и ткань разрыхляется. После лаг-фазы клетки начинают быстро делиться, образуя каллусную ткань. Таким образом, если дедифференцировка специализированной клетки связана с индукцией деления под влиянием фитогормонов, то дедифференцировка делящейся меристематической клетки связана с остановкой деления, деспециализицией клетки и только после этого – с индукцией деления, приводящей к каллусообразованию.

Переход клетки in vitro из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов. Активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают белки, характерное для фотосинтезирующих клеток листа.

В клетках каллусной ткани происходит биохимические и цитологические изменения. Через 6-12 ч. после индукции дедифференцировки клеточная стенка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, число элементов аппарата Гольджи, а также размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу деления, которые начинаются через 48-72 ч. Следует учитывать, что в клетках экспланта в начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызванные как дедифференцировкой, так и травматическими синтезами. Для разделения этих процессов лучше проводить прединкубацию экспланта на безгормональной среде 3-6 сутки. Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки.

Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток, первичный каллус, возникающий на эксплантах, через 4-6 недель переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют пассированием. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течении десятков лет.

Кривая роста каллусных клеток имеет S-образную форму (рис. 1). Такой характер роста легко обнаружить у суспензионных культур каллусных клеток.

Особенности каллусных клеток. Каллусные клетки in vitro сохраняют многие физиолого-биохимические свойства нормальных клеток. Каллусные клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов. Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным из морозостойких растений.

Общим у каллусных и пористых клеток является устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению.

Каллусные клетки обладают отдельными свойствами, отличающими их от нормальных. В них появляются специфические белки и уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листьев, или они совсем исчезают. Каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

В результате выхода из под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно, и является неограниченным. При пересадках на свежую питательную среду культура каллусной ткани моркови, полученная Р. Готре более 60 лет назад, до сих пор растет в коллекции.

Клеточный цикл у каллусных клеток более длителен, чем у растений, произрастающих в открытом грунте.

Особенностью каллусных клеток является гетерогенность по возрасту: одновременно присутствуют в каллусной ткани клетки молодые и старые.

Значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток. Они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными. Это свидетельствует о сдвиге соотношения между дыханием и брожением в сторону усиления брожения, т.е. о снижении эффекта Пастера. Под эффектом Пастера понимают подавление брожения дыханием в присутствии кислорода.

Генетика каллусных клеток. Клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью. Генетическая неоднородность каллусных клеток выражается прежде всего в различной плотности, т.е. каллусные клетки отличаются по числу хромосом. Генетически стабильными in vitro являются меристематические ткани.

В каллусных и суспензионных культурах встречаются клетки, имеющие диплоидный набор хромосом, свойственный исходному растению, полиплоидные клетки, содержащие 3,4,5 и более хромосомных наборов. Наряду с полиплоидией в культуре каллусных тканей можно нередко наблюдать анеуплоидию (возрастание или уменьшение хромосомного набора на несколько хромосом). Чем длительнее культивируют каллусные клетки, тем больше они различаются по плоидности. В калусных клетках табака через четыре года культивирования совсем не остается диплоидных клеток: все клетки становятся полиплоидными или анеуплоидными.

Кроме изменения плоидности, культивирование клеток и тканей растений in vitro вызывает появление в клетках хромосомных абберраций. Последние сказываются на биологических особенностях культивируемых тканей, изменяя их внешний вид, обмен веществ, скорость роста.

Генетическое разнообразие каллусных клеток позволяет использовать их для клеточных селекций на устойчивость к неблагоприятным факторам среды, фитопатогенам и на повышенную продуктивность.

Гормононезависимые растительные ткани.

Каллусные клетки могут делиться только при наличии гормонов в питательной среде. Однако, при длительном культивировании они в ряде случаев могут приобрести способность расти на среде без гормонов, т.е. становятся автономными по отношению к ауксинам и цитокининам. Такие клетки называются «привыкшими». Нередко ткани, образованные «привыкшими» клетками, называют химическими опухолями. «Привыкшие» ткани, как и опухолевые, в большинстве случаев не способны к нормальной регенерации и образуют лишь тератомы.

У всех каллусных тканей, у некоторых культур уже начиная с 4 пассажа, заметно снижается, а затем и полностью утрачивается способность к регенерации. Из старых пересадочных культур получить растения – регенеранты не удается.

Кроме «привыкших» тканей представляющих собой химические опухоли, существуют опухоли растительного происхождения, вызывающие бактериями, вирусами, а также генетические опухоли, возникающие на межвидовых гибридах различных растений. Это коростые галлы –опухоли, индуцированные у двудольных растений агробактериями Agrobacterium tumefaciens, бородатый корень, заболевание вызываемое A.rhizogenes и др.

В «привыкших» тканях, также, как и опухолях, идет интенсивный синтез собственных гормонов, поэтому они не нуждаются во внесении их в питательные среды.

У «привыкших» тканей гормононезависимость достигается в результате изменения активности генов, отвечающих за синтез ферментных белков, участвующих в построении молекул гормонов, следовательно, отвечающих за синтез гормонов. В опухолевых тканях синтез гормонов связан с переносом в растительную клетку бактериального гена, отвечающего за этот процесс.

1.4 Культура протопластов.

Изолированный протопласт – это часть клетки, которая остается после удаления клеточной стенки, осуществленного, как правило, ферментативным способом.

Для проведения ферментативного способа изоляции цитопластов используют препараты целлюлаз и пектиназ, получаемых из различных грибов – Myrothecium, Aspergillus, Trichoderma и др. и из пищеварительного сока улитки Helix pomatia.

В зависимости от происхождения растения и взятой для изоляции протопластов ткани подбирается вид ферментов, их комбинация и концентрация. Для выделения протопластов используют разные ткани растения, а также каллусные и суспензионные культуры. С целью получения большого числа однотипных протопластов у двудольных используют мезофилл молодых листьев.

Общий принцип изоляции и культивирования протопластов заключается в следующем.

Изолированные листья молодых растений стерилизуют в течение 1 мин. в 70° спирте, а затем в течение 20 мин. в 2% растворе гипохлорида натрия. После промывания листьев стерильной водой у них удаляют нижний эпидермис и разрезают на мелкие части. Нарезанные фрагменты листьев помещают в чашки Петри в смесь ферментов пектиназы и целлюлазы.

Например, для листьев табака используют смесь 0,5 % пектиназы + 2% целлюлазы + 13% сорбитола, pH = 5,4. Инкубируют фрагменты листьев в ферментной смеси в темноте или при рассеянном свете до 15-18 часов при t = 25°C. После этого следует очистка протопластов от эпидермиса и листовых жилок посредством фильтрации через капроновую ткань. Отмывание протопластов от ферментов производится при последующем трехкратном центрифугировании при 170 g в течение 2 мин.

Отмытые протопласты ресуспендируют в культуральной среде, содержащей 13% маннитола, до концентрации $4 \cdot 10^5$ протопластов в 1 мл. Плотность протопластов должна быть оптимальной для каждой культуры. Суспензию протопластов переносят в чашки Петри с жидкой или агаризованной средой. Культивирование проводят при t = 26-28°C в темноте или при рассеянном свете. Образовавшиеся клеточные колонии переносят на поверхность агаризованной среды и культивируют на свету.

Для культивирования протопластов могут быть использованы модификации сред Мурасиге или Гамборга (В - 5) с добавлением комплекса витаминов и фитогормоном. До того как протопласты синтезируют клеточную стенку, необходимо обеспечить в среде соответствующий уровень осмотического давления для поддержания стабильности протопластов. В качестве осмотиков используют сахара: глюкозу, манитол, сорбит, ксилозу, сахарозу или их разные сочетания. После регенерации клеточной стенки и развития клеточных колоний осмотики из среды исключают. Другой важный фактор успешного культиврования протопластов – плотность их посева, которая может составлять 10^4-10^5 протопластов в 1 мл среды.

Использование культуры протопластов.

Отсутствие клеточной стенки у протопластов обусловливает им свойства, отличные от целых клеток. Благодаря тому, что протопласты способны поглощать макромолекулы и органеллы, их используют в качестве реципиентов при трансформации, а также в экспериментах по клеточной селекции и мутагенезу. Изолированные протопласты служат источником для выделения неповрежденных и функционально активных субклеточных и цитоплазматических структур и органелл (хлоропластов, ядер, хромосом). Способность протопластов сливаться друг с другом нашла применение для получения соматических гибридов.

2. ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ И МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И РАСТЕНИЙ

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности.

2.1.*Стерилизация.*

Изолированные от растения фрагменты (экспланты), которые помещают на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами. Поэтому надо стерилизовать как эксплант, так и питательную среду. Все манипуляции с изолированными тканями (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводят в асептическом помещении (ламинар-боксе) стерильными инструментами. Стерильность надо соблюдать и во время культивирования изолированных тканей.

Чистую посуду, предварительно завернутую в бумагу или в фольгу, инструменты, бумагу, вату стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160^{o}С в течение 1,5 – 2 ч. Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120^{o}С и давлении 0.75 – 1 атм в течение 20 мин. Если в состав питательных сред входят вещества, разрушающиеся при автоклавировании, их следует стерилизовать путем фильтрации через бактериальный фильтр. Затем стерильные профильтрованные компоненты добавляют в проавтоклавированную среду, охлажденную до температуры 40^{o}С.

Растительные ткани сами по себе могут служить серьезным источником заражения, так как на их поверхности всегда находится эпифитная микрофлора. Поэтому необходима поверхностная стерилизация, которую проводят следующим образом. Предварительно часть растения, из которой будет извлечен эксплант, промывают водой с мылом и споласкивают чистой водой. Затем растительный материал стерилизуют в растворах дезинфицирующих веществ. Некоторые из этих веществ, а также время стерилизации представлены в табл. 1.

Таблица 1

Стерилизация исходного растительного материала
(по Р.Г.Бутенко, 1999)

Объект	Время стерилизации, мин		
	диацид	сулема 0,1%	перекись водорода 10-12%
1	2	3	4
Семена сухие	15-20	10-15	12-15
Семена набухшие	6-10	6-8	6-8
Ткани стебля	20-40	20-25	-
листья	1-3	0,5-3	3-5
апексы	1-10	0,5-7	2-7

После выдерживания эксплантов в дезинфицирующем растворе несколько раз промывают в дистиллированной воде и скальпелем удаляют наружные слои клеток на срезах эксплантов, так как он может быть поврежден при стерилизации.

Микроорганизмы могут находиться и внутри растительной ткани. Наиболее часто внутреннее инфицирование встречается у тропических и субтропических растений. Поэтому кроме поверхностной стерилизации иногда приходится применять антибиотики, которые и убивают микробы внутри ткани. Следует, однако, заметить, что подобная обработка не всегда приводит к стерилизации внутренних тканей, так как трудно выбрать направленно действующий антибиотик.

2.2.*Питательные среды.*

Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах. Они могут существенно различаться по своему составу, однако, в состав всех сред обязательно входят необходимые растениям макро- и микроэлементы, углеводы, витамины. Фитогормоны и их синтетические аналоги. Углеводы (обычно это сахароза или глюкоза) входят в состав любой питательной смеси в концентрации 2-3%. Они необходимы в качестве питательного компонента, так как большинство каллусных тканей лишено хлорофилла и не способны к автотрофному питанию. Поэтому их выращивают в условиях рассеянного освещения или в темноте.

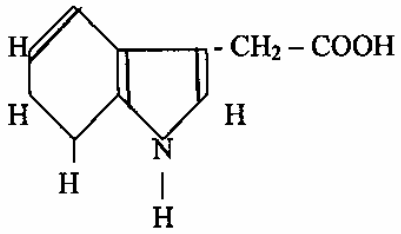
Высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия, фосфата способствует быстрому росту клеток. Истощение среды значительно снижает рост и процессы вторичного метаболизма. Од-

нако изначально низкое содержание фосфатов в питательной среде способно стимулировать синтез вторичных метаболитов. Установлено, что культивирование каллусов солодки голой на среде с половинной концентрацией азота и фосфора в темноте увеличивает содержание фенольных соединений в 1,6 раза по сравнению с каллусами, растущими на полной среде. В среду могут быть добавлены эндоспермы незрелых зародышей (кокосовый орех, конский каштан и др.), пасока некоторых деревьев, различные экстракты (солодовый, дрожжевой, томатный сок).

В качестве дополнительного источника азота в состав сред добавляют аминокислоты или гидролизат казеина – источник аминокислот. В состав сред включают водорастворимые витамины; тиамин, рибофлавин, биотин, пантотеновую кислоту, пиридоксин, аскорбиновую кислоту.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть фитогормоны. К ним относятся ауксины, вызывающие дифференцировку клеток экспланта, и цитокинины, индуцирующие клеточные деления. При изменении соотношения между этими фитогормонами или при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза.

Природный ауксин в растениях представлен в основном в виде β-индолил-3-уксусной кислоты (гетероауксином) – ИУК.



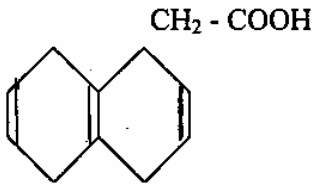
- гетероауксин (ИУК)

Наиболее выраженный эффект ауксина проявляется в стимуляции роста. Ауксин играет важную роль в процессах регенерации при размножении каллусных клеток; в процессе образования придаточных и боковых корней, луковиц, при заложении вегетативных почек.

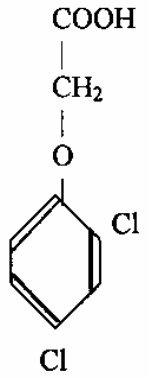
Для практических целей в сельском хозяйстве часто применяют не ИУК, а синтетические ауксины, так как они в растениях не разрушаются ИУК-оксидазой. Молекулы синтетических ауксинов имеют разную структуру, они содержат ароматическое или гетероциклическое кольцо, боковая часть которого представлена остатком алифатической кислоты. Это – индолил-3-масляная кислота (ИМК); α-нафтил-1-уксусная кислота (НУК); 2,4 - дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д); фенилуксусная кислота (ФУК); фенилмасляная (ФМК).

2,4-Д применяют для индукции каллуса у злаков, бобовых, томатов; для роста суспензионных культур; в сочетании с другими фитогормонами для формирования у протопластов клеточной стенки.

ИУК, ИМК, НУК, ФУК и ФМК применяют в качестве индукторов образования корней, а в сочетании с цитокининами эти фитогормоны могут быть использованы для развития проростков при культивировании изолированных зародышей.



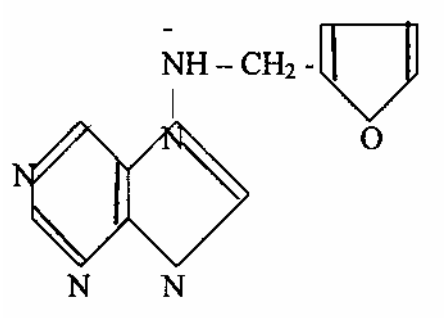
α-нафтил-1-уксусная кислота (НУК)



2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д)

ИУК необходима для индуцирования каллусогенеза.

В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин, зеатин, которые представляют собой N-замещенные производные аденина.



- кинетин (6-фурфуриламинопурин)

Действие цитокининов проявляется прежде всего в ускорении клеточных делений, что опосредуется усилением синтеза ДНК и РНК и белков. Благодаря этому замедляется старение клеток и повышается их устойчивость к неблагоприятным факторам среды.

Цитокинины в составе сред включают для стимуляции клеточного деления в каллусных и суспензионных культурах, в культурах протопластов, при регенерации проростков из соматических эмбриондов или стеблевых почек.

При культивировании протопластов в составе культурных сред используют и абсцизовую кислоту. Абсцизовая кислота оказывает противодействие ауксинам, гиббереллинам и цитокининам.

Гиббереллины оказывают множественные действия: стимулируют рост в фазе растяжения и деления клеток (например, камбия), вызывают рост плодов. Важное свойство гиббереллинов – вызывать вытягивание стебля у розеточных растений или у растений с укороченным стеблем, т.е. устранять физиологическую и генетическую карликовость.

Гиббереллины относят к условно половым гормонам; например, у тыквенных они способствуют образованию мужских цветков.

Для гиббереллинов доказано их непосредственное действие на биосинтез ферментов, например, α-амилазы и других гидролаз в прорастающих семенах злаков; эти ферменты расщепляют крахмал до простых сахаров, которые усваиваются развивающимся зародышем.

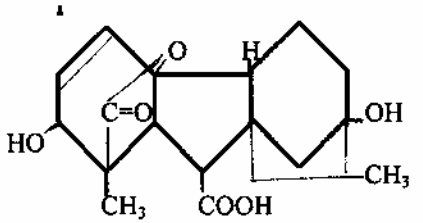
Гиббереллины обнаружены у сумчатого гриба (аскомицета) Gibberella fujikuroi, а также в тканях высших растений.

Гиббереллины – это дитерпеноиды с тетрациклическим гиббереллановым скелетом из 19-20 С-атомов.

Для практических целей наиболее часто используют гибберелловую кислоту, которая производится в промышленности.

Обработка гибберелловой кислотой семян и клубней приводит к снятию у них покоя и стимулирует быстрое прорастание. Ее действие на озимые злаки заменяет яровизацию, необходимую для таких растений.

В составе культуральных сред используют гибберелловую кислоту для поддержания роста суспензионных культур, а также для индукции побегообразования.



- гибберелловая кислота

В настоящее время известно большое число различных по составу питательных сред (табл.2). Среда Мурассиге и Скуга – самая универсальная. Она пригодна для образования и роста каллусов, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. Так изменение соотношения ауксина и кинетина приводит к образованию либо корней (преобладание ауксина), либо стеблевых культур (преобладание кинетина). Среда Ганборга и Эвелега подходит для культивирования клетокк и тканей бобовых растений и злаков. Среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после регенерации, а среда Нича и Нич пригодна для индукции андрогенеза в культуре пыльников. В состав некоторых сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или

ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток.

Таблица 2

Состав питательных сред, применяемых при культивировании клеток и тканей (по Р.Г.Бутенко, 1999)

Компонент сред	Концентрация питательных сред, мг/л			
	Мурасиге и Скуга,1962	Гамборга и Эвелега,1968	Уайта, 1939	Нича и Нич,1974 -1975
1	2	3	4	5
KNO_3	1900	3000	81	950
NH_4NO_3	1650	-	-	72
$Ca(NO_3)_2$	-	-	142	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	134	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	500	74	185
$CaCl_2 \cdot H_2O$	-	-	-	166
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	150	-	-
KCl	-	-	65	-
KH_2PO_4	170	-	12	68
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	150	-	-
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	10	-	-
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3	-	-	25
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8,6	-	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-	2	-	10
H_3BO_4	6,2	3	-	10
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,075	-	0,025
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	-	0,25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	-	-	27,8
$NaEDTA \cdot 2H_2O$	37,3	-	-	37,3
Секвестрен 330-Fe	-	28	-	-
Мезоинозит	100	-	-	200
Аскорбиновая кислота	-	-	-	3
Тиамин – HCl	-		-	3
Пиридоксин – HCl	0,5	-	-	1
Никотиновая кислота	0,5	-	-	-
Сахароза	0,5	-	-	60 000
Агар «Дифко», гель-	30 000	20 000	2000	7000

1	2	3	4	5
рит, агароза	-		-	

2.3. Влияние физических факторов.

На рост и развитие растительных тканей in vitro большое влияние оказывают физические факторы – свет, температура, аэрация, влажность.

Свет. Большинство каллусных тканей могут расти в условиях сильного освещения или в темноте, так как они не способны фотосинтезировать. Вместе с тем свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процесс вторичного синтеза. В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Для большинства растений оптимум освещенности составляет примерно 1000 люкс. Кроме интенсивности освещенности на культуру ткани и её физиологические особенности влияет качество света. Так, более 20 флавонов и флавонолевых гликозидов образуются в культурах клеток петрушки после освещения её непрерывным люминесцентным светом «холодный белый».

Температура. Для большинства каллусных культур оптимальна температура 26°С. В отличие от роста культур клеток и тканей индукция их морфогенеза требует более низких температур (18-20°С).

Аэрация. Для выращивания суспензионных культур большое значение имеет аэрация. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров.

При выращивании клеток в малых объемах (в колбах) нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

Влажность. Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должны составлять 60-70%.

2.4. Методы культивирования изолированных клеток и тканей для получения БАВ.

В качестве источника БАВ используют каллусную ткань, которую получают твердофазным способом культивирования и глубинным суспензионным культивированием, осуществленным в периодическом и непрерывном (проточном) режимах (Чуегов и др., 2003).

2.4.1. Твердофазный способ культивирования.

Каллусные клетки получают из фрагментов тканей разных органов высших растений, помещая кусочки такой ткани в питательную среду (пробирки, колбы, чашки Петри). Соблюдают строгую стерильность.

Чтобы обеспечить развитие каллусных клеток в питательных средах (табл. 2), содержащих необходимые для роста вещества, клетки тканей, запасающей паренхимы, корня и стебля, мезофилла листа и других тканей должны терять способность дифференцировки. Недифференцированному развитию клеток способствует прединкубация эксплантов на среде без гормонов в течение 3-6 суток.

Через 4-6 недели культивирования трансплантанта возникает первичный каллус, который необходимо перенести на свежую питательную среду. При культивировании на агаризованных средах кусочек каллуса должен иметь массу 60-100 мг на 30-40 мл свежей среды. Каллусная ткань, вырасшая на поверхности твердой питательной среды, имеет аморфную структуру, представляющую собой массу тонкостенных пареахимных клеток. Химический состав каллусной ткани обычно незначительно отличается от соответствующего органа растения.

Каллусные клетки после ряда делений переходят на обычный для данного растения цикл развития, т.е. начинается дифференциация. Этот процесс регулируют гормоны.

2.4.2. Глубинное суспензионное культивирование.

Для глубинного культивирования и получения суспензионных культур необходимо использовать линии клеток, образующих

небольшие агрегаты (по 5-10 клеток). Более пригодна каллусная ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при перемешивании её в нере….. жидкую среду. Трансплантат желательно обрабатывать пектиназой. Рекомендуется использовать среды, содержащие 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту и не содержащие ионы Са. При подборе среды культивирования важно из среды исключить цитокинины или снижать их концентрацию, а концентрацию ауксинов увеличивать.

Перед пересевом первичную культуру фильтруют через два слоя марли или через сита (нейлоновые, металлические), чтобы отделить крупные агрегаты каллусной ткани и остатки трансплантата. На образование клеточных агрегатов также сказывает влияние интенсивность перемешивания среды, так как клетки чрезвычайно чувствительны и быстро лизируются. Большинство клеток погибает.

Суспензионные культуры, как правило, состоят из отдельных клеток, варьирующих по форме и размеру, и неоднородных многоклеточных агрегатов. Соотношение отдельных клеток и таких агрегатов в суспензии зависит от видовой принадлежности растения и условий культивирования.

В процессе культивирования активно делящиеся клетки не только поглощают питательные вещества, но и выделяют продукты собственной жизнедеятельности, в том числе и ферменты: α-амилаза, фосфогидролаза и др. они изменяют дисперсность суспензии. Повышать дисперсность суспензионных культур можно добавлением в среду низких концентраций пектиназы и целлюлозы. При управлении процессом выращивания клеток важно иметь гомогенную систему.

Глубинное культивирование можно осуществлять в колбах на качалках при частоте вращения 100-120 об/мин. На 60-100 мл среды используют 2-3 г свежей каллусной ткани, чтобы начальная плотность клеточной популяции составила $0{,}5 \cdot 10^5$ – $2{,}5 \cdot 10^5$ клеток/мл среды. Сосуды с суспензией закрепляют на платформе тей-

кера или устанавливают на качалки ротационного типа. В этих условиях обеспечивается аэрация и, кроме того, нарастающая масса клеточных агрегатов распадается на отдельные фрагменты. В лабораторных условиях обычно используют сосуды объемом 100-250 мл с небольшим объемом питательной среды.

Необходимо отметить, что растительные клетки растут и размножаются значительно медленнее, чем клетки микроорганизмов. Время их удвоения 1-3сут. Процесс культивирования растительных клеток занимает 2-3 нед., что повышает требования к обеспечению асептических условий.

При выполнении работ с использованием культуры клеточных суспензий необходимо знать их основные параметры.

Плотность клеточной популяции - концентрация клеток в 1 мл суспензии.

Минимальное время удвоения клеточной популяции_в накопительной суспензионной культуре. Например, время клеточного удвоения для сахарной свеклы составляет 86 часов, табака - 48 часов, фасоли - 22 часа.

Вес сырого вещества суспензии определяют после помещения ее на предварительно взвешенный фильтр из нейлоновой ткани и промывания водой для удаления остатков питательной среды.

Вес сухого вещества определяют после просушивания определенной навески сырой биомассы при 60-70 °С в течение суток.

Количество клеток. Чтобы установить количество клеток в определенном объеме суспензии, необходимо диспергировать ее содержимое до одноклеточного состояния обработкой 5-10% хромовой кислотой. Подсчет клеток проводят, используя 1 мл одноклеточной суспензии, нанесенный на сетку счетной камеры.

Размер клеток определяют их измерением под микроскопом с помощью шкалы окуляр-микрометра.

Жизнеспособность культуры определяют соотношением количества жизнеспособных клеток к общему количеству в миллилитре суспензии. Жизнеспособные или живые культуры характеризуются наличием клеток с ядрами и движением цитоплазмы при

окрашивании препаратов красителями: 0,5 %-ным раствором синей Эванса или 0,01 %-ным раствором флуоресцеив-ацетата.

Во многих случаях изучение особенностей размножения и роста клеток связано с необходимостью использования синхронизированных клеточных популяций.

Как правило, клеточная популяция суспензионных культур не только гетерогенна, но и асинхронна, так как содержит клетки, различающиеся по времени вхождения в митоз. Для синхронизации клеточных культур используют методы индукции, когда течение клеточного цикла блокируется в определенном периоде под влиянием или физических факторов, например, пониженной температурой, или химических соединений.

Так, индукторами синхронизации в системе культивируемых клеток могут быть ингибиторы синтеза ДНК - тимидин, 5-аминоурацил, оксимочевина. В результате обработки клеток этими веществами клеточный цикл продолжается только до G_1-периода, и клетки накапливаются перед синтетическим периодом. Удаление из среды ингибитора приводит к синхронизированному переходу клеток к синтезу ДНК, а затем и делению.

Другой способ синхронизации заключается в создании условий «голодания» по одному из компонентов культуральной среды например, ауксину, цитокинину, углеводам, азоту. Клетки накапливаются в G_1 или C_2-периоде клеточного цикла.

Затем пассирование суспензии на среду с недостающим компонентом приводит к синхронизации клеточного деления.

С помощью индукции синхронизации клеточных делений удается повысить митотический индекс с 2-3 % до 30-35 %.

Фазы ростового цикла в периодическом суспензионной культуре.

Ростовой цикл, или *цикл выращивания* - это период от помещения *инокулюма* (части суспензионной культуры) на свежую среду до следующего субкультивирования.

Суспензионная культура представляет собой популяцию отдельных клеток и небольших клеточных агрегатов, которые, в свою очередь, являются субпопуляциями, состоящими из нескольких клеток.

Несмотря на морфологическую и физиологическую гетерогенность внутри популяции, рост клеточных культур описывается однозначно S-образной кривой (рис.1).

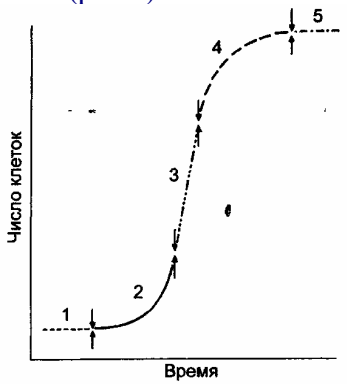


Рис. 1. Рост клеточной популяции при культивировании в накопительном режиме: 1 - латентная фаза; 2 - экспоненциальная фаза; *3* - линейная фаза роста; *4* - фаза замедления роста; 5 - стационарная фаза

Различают следующие фазы ростового цикла:

Латентная фаза (лаг-фаза). В этот период клетки не размножаются, отсутствует их видимый рост, но происходит активный процесс поглощения воды и питательных веществ.

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста. Это ограниченный период в ростовом цикле периодической (накопительной) культуры, в ходе которого происходит экспоненциальное (логарифмическое) увеличение количества клеток за счет их интенсивного деления, и как следствие - увеличение сухого вещества.

Различают раннюю и позднюю экспоненциальные фазы. В течение ранней экспоненциальной фазы наблюдается ряд цитологических изменений: в клетках исчезает большая вакуоль, происходит увеличение объема цитоплазмы, увеличивается число полирибосом и митохондрий. Наряду с цитологическими изменениями

имеет место и активация клеточного метаболизма: увеличивается содержание РНК, белка, ДНК, интенсивность поглощения кислорода. Все эти процессы приводят к активному делению клеток и образованию клеточных агрегатов.

В течение поздней экспоненциальной фазы роста суспензионной культуры наблюдается замедление клеточного деления, но происходит увеличение размера клеток. Таким образом, увеличение биомассы в этот период происходит в основном за счет растяжения клеток.

Линейная фаза очень короткая. Удельная скорость роста культуры в этой фазе практически постоянная.

Фаза замедления роста (ранняя стационарная фаза). В этот период средний размер клеток продолжает возрастать, отмечается гетерогенность клеточной популяции и начало синтеза вторичных веществ.

Стационарная фаза. К этому периоду ростового цикла суспензионная культура достигает максимума сухого веса. В культуральной среде накапливаются продукты жизнедеятельности клеток, угнетающие рост культуры. Культуральная среда истощается по наличию основных компонентов, обеспечивающих азотное, фосфорное, углеводное питание. С тем чтобы не наступила гибель клеток, необходимо субкультивирование суспензионной культуры на свежую среду.

В среднем от начала культивирования до стационарной фазы роста проходит 21 -28 дней.

Продолжительность ростового цикла зависит от условий культивирования, исходной плотности, возраста инокулюма, состава и объема питательной среды, видоспецифичности исходной культуры.

Непрерывное культивирование

Другой метод выращивания клеточных культур - непрерывное культивирование - основан на поддержании баланса между разбавлением питательной среды и удалением части суспензии.

Установлено, что если при периодическом культивировании клеточных суспензий в экспоненциальной фазе роста в культуральную систему добавлять свежую среду, то деление клеток может поддерживаться неограниченно долго. Это послужило основой создания систем, позволяющих осуществлять непрерывное культивирование.

Культуральные системы, функционирующие непрерывно, разделяют на *полупроточные* и *проточные*.

При *полупроточном режиме выращивания* через определенные интервалы времени производится отбор части суспензии и разбавление оставшейся суспензии свежей средой. Через суспензию пропускают стерильный воздух. Культуру перемешивают с помощью магнитной мешалки. Культивирование может продолжаться в течение нескольких месяцев.

Проточный режим культивирования позволяет осуществлять непрерывное снабжение культуральной системы свежей средой с удалением равного объема клеточной суспензии. В таком режиме автоматизированные ферментеры (культуральные сосуды) могут функционировать в течение нескольких лет. Ферментеры, используемые для производства больших клеточных биомасс, могут достигать объема до 1500 л. Для осуществления многостадийных процессов при промышленном культивировании клеток-продуцентов веществ вторичного обмена используют конструкции, состоящие из системы нескольких ферментеров.

3. РАСТЕНИЯ И ИХ КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ КАК ПРОМЫШЛЕННЫЕ ИСТОЧНИКИ БАВ

3.1. Растения.

Растения являются продуцентами многих БАВ – соединений, способных оказывать слияние на биологические процессы в организме. К таким соединениям принадлежат сердечные гликозиды, сапонины, стерины, каратиноиды, полифенолы, алкалоиды, витамины, хиноны, а также вещества, обладающие специфическим ароматом, вкусом и окраской.

Биологически активные вещества принадлежат к продуктам вторичного обмена, которые называют вторичными метаболитами или вторичными продуктами биосинтеза. В настоящее время известно более 100 000 вторичных метаболитов, продуцируемых растениями. Многие из них являются практически, экономически важными продуктами и используются в фармакологической, косметической, пищевой промышленности. (табл.3)

Таблица 3

Промышленное использование некоторых растительных продуктов

Промышленное производство	Растительный продукт	Вид растения
1	2	3
Фармацевтические средства	Кодеин (алкалоид)	Papaver somniferum
	Диосгенин (стероид)	Dioscorea deltoidea
	Хинин (алкалоид)	Cinchona ledgeriana
	Дигоксин (сердечный гликозид)	Digitalias lanata
	Скополамин (алкалоид)	Datura stramonium
	Винкристин (алкалоид)	Catharanthus roseus
Агрохимикаты	Пиретрин	Chrysanthemum cinerariaefolium
Производство продуктов питания	Хинин (алкалоид)	Cinchona ledgeriana
	Тауматин (халькон)	Thaumatococcus danielli
Косметические	Жасмин	Jasminum sp

Лекарственные препараты составляют основную статью расхода веществ растительного происхождения, но скорее, в финан-

совом отношении, чем по объему. Лекарственные растения все еще вносят значительный вклад в фармацевтическую промышленность, составляя около 25% важнейших лекарственных средств. В табл. 4 приведены сведения о 10 основных лекарственных препаратах, их происхождении и клиническом действии. Это вещества не только самых разнообразных химических форм, но и широкого спектра терапевтического действия.

Таблица 4

Десять наиболее употребляемых лекарственных веществ, получаемых из растений

Лекарственное вещество	Активность	Растение – источни
1	2	3
Стероиды из диосгенина	Противозачаточные средства	Dioscorea deltoidea
Кодеин	Болеутоляющее	Papaver somniferum
Атропин	Антихолинэргическое	Atropa belladonna L.
Резерпин	Снижающее давление	Rauwolfia serpentina L.
Геоциамин	Антихолинэргическое	Hyoscyamus niger L.
Дигоксин	Тонизирующее сердечную деятельность	Digitalis lanata L.
Скопомамин	Антихолинэргическое	Datura metel L.
Дигитоксин	Сердечно-сосудистые	Digitalis purpurea L.
Пилокарпин	Холинэргическое	Pilocarpus jabonandi
Хинидин	Антималярийное	Cinchona ledgeriana

К лекарственным веществам примыкают наркотики и стимулирующие вещества. Наркотики являются промежуточным звеном между ядами и лекарственными препаратами. В небольших количествах они часто являются эффективными лекарствами, например морфий. При высоких концентрациях или при постоянном применении они могут стать причиной пагубного влечения (наркомании) или смерти. Они представляют собой основную группу запрещенных натуральных продуктов. Наиболее известными являются марихуана (или гашиш) из Cannabis, опиум и героин из Papaver somniferum и кокаин Erythroxylon. Табак тоже принадлежит к этой группе, поскольку содержит никотин.

Стимуляторы – отличные от наркотиков вещества и в целом не вредны. Чаще всего применяют кофеин или связанные с ним теобромин, используя в виде напитков. Кофеин найден во многих растениях, из которых наиболее известны Camellia sinensis (чай) и Coffea arabica (кофе).

Яды – вероятно, крайнее лекарственное средство. Нейротоксические яды растений все еще используют охотники в Африке и Южной Америке, например, яд кураре. Многие растительные яды обладают сильным нейротоксическим действием, например, рицин из клещевины обыкновенной.

Химикаты, применяемые в сельском хозяйстве. Помимо регуляторов роста растений наиболее выдающимся событием было открытие пиретринов. Перетрины, выделяемые из цветков Chrysanthemum cinerariacfolium, являются мощными инсектицидами (уничтожающие насекомых). С природными пиретринами конкурируют синтетические, однако, при применении последних появляется устойчивость к ним у насекомых, а также возникает кумулятивная токсичность.

Тонкие химические соединения. «Тонкие химикаты» - это общее название веществ, применяемых в качестве добавок для духов, а также вкусовые ароматические вещества, красители пищевых продуктов. Это и очень дорогие, выпускаемые в небольших количествах вещества и дешевые препараты, производимые десятками тысяч тонн. Например, жасминовая эссенция.стоит в США 6000 долларов за 1 кг и производится в объеме лишь 20-30 кг в год, а масло какао, основной компонент шоколада, стоимостью 4 доллара за 1 кг производится в объеме 20 000 т в год. Вещества варьируют от простых соединений типа хинина до сложных смесей типа эфирных масел. Последние представляют собой типичные монотерпены, часто летучие соединения, составляющие основу промышленности, производящей ароматические соединения – отрасли, создающие ценные и дорогостоящие продукты.

Следует отметить все возрастающий интерес промышленности к миру растений как к источнику химических соединений. Разработка нового синтетического лекарственного препарата обходится примерно в 100 млн. американских долларов и занимает в 10 лет, поэтому нетрудно понять возобновляющейся интерес к растениям как «фабрикам» для их синтеза.

3.2 Культура изолированных клеток и тканей растений.

Культуры клеток и тканей, полученные in vitro, как и клетки интактного растения, могут синтезировать вторичные метаболиты, которые могут иметь большое практическое значение. Причем по качественному составу и количественному составу они могут схожи.

Культуры клеток и тканей можно использовать для получения природных веществ растительного происхождения следующими способами:

- новые пути синтеза уже известных веществ, например кодеина, хинина, пиретроинов;
- синтез новых продуктов из тех растений, которые трудно выращивать или внедрять, например тебаин из Papaver bracteatum;
- использование культуры клеток как источника совершено новых веществ, например, рутакультин из культур Ruta;
- использование культуры клеток в качестве систем для биотрансформации: как самого процесса с получением конечного продукта, так и отдельного звена химического процесса, например при синтезе дигоксина.

Практически важные результаты использования культуры клеток и тканей были получены в 60-х годах XX века. Было показано, что такие практически важные БАВ как диосгенин, гармин и виснагин синтезируются культурами клеток в тех же количествах, как в исходном растении.

Скрининг, проведенные среди большого количества растений показал, что, во-первых, круг БАВ, синтезируемых в культурах,

свидетельствует об огромном синтетическом потенциале и разнообразии вторичного метаболизма; во-вторых, относительно небольшое число их пригодно для использования в промышленности. К тому же, определенной трудностью биосинтеза является то, что во многих системах растений вторичные метаболиты накапливаются в значительных количествах на стационарной фазе роста; в физиологическом плане биосинтез БАВ связан с морфологическим развитием растения, с формированием дифференцированных тканей.

В настоящее время собрана большая коллекция клеточных культур растений из различных семейств синтезирующие вторичные метаболиты, широко используемые в промышленности. К ним относятся: женьшень дальневосточный – источник диосгенина, диоскорея дельтовидная – стероидные гликозиды, равольфия змеиная – продуцент антиаритмического алкалоида аймалина и т.д. Установлено недавно, что клетки тиса ягодного синтезирует вещество-таксон, которое является антираковым препаратом.

Осуществляются большие научно-технологические исследования по культивированию клеток и тканей растений in vitro.

Прирост клеточной биомассы в условиях in vitro и in vivo может проходить с разной скоростью. Биомасса клеток женьшеня в суспензии при выращивании в 50 литровом ферментере увеличивается на 2,0 г в литре среды за сутки, что в 1000 раз больше, чем выращивании на плантации.

Учитывая высокую стоимость женьшеня (килограмм плантационного корня стоит 100-150 дол. США; цена дикорастущего корня может доходить до нескольких тысяч долларов США) биотехнологический способ получения биомассы культуры клеток женьшеня весьма привлекателен.

В таб. 5 приведены некоторые экономически важные продукты, синтез которых получен в культуре клеток высших растений.

Таблица 5

Экономически важные продукты, полученные в культуре клеток высших растений (по Р.Г. Бутенко, 1999)

Традиционные растительные продукты	Новые активные вещества	Продукты биотрансформации
Алкалоиды	Ингибиторы фитовирусов	Метилдигоксин, дигоксин
Стероиды терпены и терленоиды	Антиканцерогены, композиции	Ментол Неоментол
Бетанины гликозиды полифенолы полисахариды эфирные масла натуральные красители (пигменты убихинон вкусовые добавки инсектициды латекс	Ингибиторы протеиназ необычные белки	Герониол Нерол цитронеллол

4. ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО БАВ ИЗ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

В основе промышленного производства БАВ (лекарственный субстанций и др.) из культуры клеток растений лежит ряд последовательных стадий и операций: получение высокопродуктивных продуцентов, разработка оптимальных условий культивирования продуцента БАВ с максимальным биосинтезом целевого продукта, разработка и внедрение в практику соответствующих методов и условий выделения и очистки БАВ, создание готовых препаратов и контроль качества. Работа на каждом из этих этапов должны проводится соответствующими специалистами: биотехнологами, генетиками, химиками-технолагами (Чуешов и др., 2002).

4.1 Подготовка среды для культивирования продуцента и посевного материала (первая стадия).

Для каждого продуцента БАВ, для каждого вновь образуемого каллуса и суспензионной культуры растений разрабатывается своя оптимальная среда, которая должна отвечать следующим основным требованиям:

1) обеспечивать хороший рост биомассы и максимально возможное образование целевого продукта – алкалоидов, гликозидов, полисахаридов и др. продуктов вторичного синтеза;
2) содержать доступные по стоимости компоненты;
3) обеспечивать применение наиболее экономических и эффективных приемов выделения и очистки БАВ.

Среды Мурасиге-Скуча (МС) и Шенке-Хильдебрандта (ШХ) относятся к наиболее употребляемым в работе с культурами клеток растений и оказались эффективными для роста различных одно- и двудольных растений (табл. 2). Их считают средами с высоким содержанием солей (по сравнению с низкосолевой средой Уайта). Среда ШХ от других сред отличается очень высоким, десятикратным содержанием мезоинозината. Среди МС и ШХ содержат железо в хелатированной форме в комплексе с ЭДТА. Это обеспечивает его доступность при pH до 8,0 в течение всего периода роста культуры, тогда как при отсутствии хелатирующего агента недостаток железа может проявиться очень быстро.

Компоненты среды для выращивания каллусных и суспензионных культур можно разделить на шесть групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных растворов:

1) основные неорганические питательные вещества (макроэлементы);
2) микроэлементы
3) источники железа;
4) органические добавки (витамины);
5) источники углерода;
6) регуляторы роста растений.

В реактор с мешалкой с помощью вакуума вносят поочередно приготовляемые растворы, соблюдая следующий порядок:

- раствор макросолей;
- агарированный раствор;
- раствор хелата железа;
- раствор микроэлементов;
- раствор кальция, нитрата;
- раствор сахара.

Смеси тщательно перемешивают в течение 5 мин., затем 1-2 мин ведут вертикальное перемешивание путем барботажа при включенной мешалке. Обязательно отбирают контрольные пробы для опредления pH среды (pH должно быть в пределах 5,0-6,2; температура раствора (22 ± 2,5°С).

В промышленных условиях стерилизация питательных сред осуществляется двумя основными методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации применяют при использовании небольших объемов среды. Он заключается в том, что среда, нагретая до определенной температуры (120-125°С) непосредственно в ферментаторах или в специальных паровых стерилизаторах ГПСД-1700, выдерживается при этой температуре в течение 30-60 мин (в заивисимости от объема среды или от её состава, после чего охлаждается до 27-30°С).

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять при использовании больших объемов среды. Приготовленная среда из специального сосуда с помощью насоса подается в стерилизационную колонну, через которую пропускается острый пар (давление пара около 5 атм.). Пар подается сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, благодаря чему пар поступает в среду и быстро её нагревает. Среда в колонну подается снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Нагретая в колонне до необходимой для стерилизации температуры (около 125°С), среда поступает в специальный аппарат – выдерживатель, где она выдерживается при температуре 120-125°С. время выдерживания зависит от состава среды и составляет 5-10 мин. Из выдерживателя стерильная среда поступает в змеевиковый холодильник.здесь она охлаждается до 30-35°С (на выходе) и поступает в ферментатор. Непрерывный метод стерилизации имеет ряд преимуществ перед периодическим методом: возможность автоматического регулирования процесса, быстрый и равномерный нагрев среды, обеспечение более полной стерильности среды.

Подготовка посевного материала – одна из ответственных операций в цикле биологического методы получения БАВ из культуры тканей.

Культуру ткани (коллекцию культуры) заводы получают из академий и университетов. Каждая культура имеет паспорт с подробным описанием морфологии, физиологии, характеристики среды для культивирования и хранения.

Для твердофазного метода культуру ткани выращивают на агаризованной стерильной питательной среде в колбах вместимостью 0,25 л в термостатируемом помещении или термостате с температурой 27±1°С. на 38-46 сут. Роста ткань материнской культуры режут ткаим образом, чтобы инокулюм состоял из вертикального столба (верхний слой, средний и часть нижнего слоя безагаризованной среды). Нельзя допускать воздействия на культуру дезсредств, бактерицидных ламп, так как это приводит к инактивации роста. Из материнской культуры пересаживают 7-9 дочерних культур и через 38-46 сут. Роста в термостатируемом помещении отбирают колбы с культурами тканей лучших ростовых признаков. Для таких культур характерен быстрый рост, максимальное использование питательной среды, цвет ткани от светло-желтого до молочного, отсутствие некротических включений.

Для глубинного (суспензионного) метода культуру ткани предварительно выращивают на агаризованной стерильной среде в пробирках, затем из пробирок высеивают в колбы с жидкой питательной средой и проводят две генерации глубинного выращивания на качалках в течение 38-46 сут. для каждой генерации. Из второй генерации культуры (в колбе) делают посев в небольшой (10 л) инокулятор, а затем хорошо развивающуюся культуру пере-

носят в основной ферментатор. Для посева в основном ферментаторе используют от 5 до 10 объемных процессов посевного материала (инокулята).

4.2 Биосинтез БАВ (вторая стадия, главная ферментация).

Стадия биосинтеза, главная ферментация – основная биологическая стадия процесса получения БАВ из культуры тканей.

Задача этой стадии – обеспечение для продуцента БАВ таких условий развития, которые бы способствовали максимальному уровню биосинтеза БАВ. Эффективность стадии биосинтеза зависит от уровня образования БАВ из культуры ткани и определяется генетическими особенностями организма, составом питательной среды, режимом развития продуцента. Она также зависит от времени максимального образования БАВ, стоимости компонентов среды, пеногасителей и энергетических затрат, связанных с процессом развития организма – продуцента БАВ.

В настоящее время производство БАВ из культуры тканей осуществляют двумя способами ферментации: суспензионное культивирование (погружение глубинное культивирование) и культивирование на поверхности твердой среды (твердофазная ферментация).

4.2.1 Суспензионное культивирование для биосинтеза БАВ.

Для крупномасштабного культивирования растительных клеток для препаративного получения вещества вторичного синтеза используют специальные металлические и стеклянные ферментаторы (биореакторы) различной конструкции (с мешалкой или барботажного типа). Режим ферментации периодический (накопительный) или непрерывный, главным образом хемостатный. Биосинтез продуктов вторичного синтеза проводят в ферментерах объемом от 0,1 до 63 $м^3$ и более (рис.2).

Аэрацию культуральной биомассы осуществляют стерильным воздухом через барботер. Воздух стерилизуют, как правило,

путем фильтрации на двух-трех последовательно установленных фильтратах. В ходе культивирования клеток растений регулируют температуру (25-37°С), pH и окислительно-восстановительные потенциал.

Рис. 2 Схема ферментатора с комбинированным подводом энергии для глубинного культивирования:
1 – вал; 2, 3, 6 – мешалки;
4 – статор; 5 - барботер

Процесс культивирования ведут до тех пор, пока идет интенсивный синтез целевого продукта и в среде не будут исчерпаны питательные вещества. При определении конца культивирования необходимо учитывать данные микроскопического контроля состояния культуры, отсутствие постоянной микрофлоры, концентрацию основных питательных веществ, биомассы, целевого продукта, pH.

Процесс развития – продуцента БАВ в ферментаторах проходит при строгом контроле всех стадий, очень точном выполнении разработанного регламента условий накопления БАВ. Большое внимание уделяется поддержанию заданной температуры культивирования, активной кислотной среды pH, степени аэрации и скорости работы мешалки. Учитывая потребление организмом основных питательных компонентов субстрата (источников углевода, азота, калия, магния, фосфора, аминокислот, витаминов), контролируется образование БАВ.

Особое внимание при развитии продуцента в ферментаторах обращают на процесс пеногашения. При продувании воздуха через

организм –продуцент БАВ часто происходит обильное образование пены, которая существенно нарушает протекание всего процесса развития штамма-продуцента БАВ в ферментаторе. Основная причина появления большого количества пены – высокая вязкость питательной среды, обусловленная обильным накоплением биомассы.

Для борьбы с пеной в ферментаторах при получении биомассы используют различные поверхностно-активные вещества: растительные масла (соевое, подсолнечное), минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют специальные синтезированные вещества (силиконы, диазобуталкарбомил и другие соединения).

Выращивание проводят в течение около 70 сут. в период ростового цикла осуществляют микробиологический, биохимический и визуальный контроль. Визуальный контроль проводят не реже одного раза в 10 дней – отбраковывают инфицированные ткани.

4.2 Твердофазная ферментация для биосинтеза БАВ.

Культивирование клеток растений на твердых средах осуществленный в различных механизированных установках. Схема одной из современных установок конструкции ВНИИбиотехника для твердофазного культивирования изображена на рис. 3. Аппарат представляет собой вертикальный сосуд цилиндрической формы с коническим днищем, снабженная рубашкой и змеевиками для охлаждения культуры. Внутри он разделен перфорированными пластинами. Субстрат перемешивается с помощью полистных мешалок, установленных в каждой секции на вертикальном валу. Засеянную питательную среду загружают через верхний люк, а готовую культуру высушивают через нижний.

Рис. 3. Схема аппарата конструкции ВНИИбиотехника для поверхностного выращивания продуктов биосинтеза:
1 – люк для выгрузки;
2 - валик секции; 3 – опора;
4 – коллектор стерильного

воздуха; 5 – змеевик;
6 – лопасть мешалки;
7 – коллектор обработанного
воздуха; 8 – крышка;
9 – бобышка манометра;
10 – штуцер; 11 – воздушник;
12 – шестерня привода вала;
13 – вал;
14 – люк для загрузки

Культура подается с верхних секций на нижние путем периодического переворачивания перфорированных пластин на 90°С вокруг горизонтальной оси. В каждую секцию под перфорированные пластины поступает стерильный воздух.

Перемешивание субстрата в данном аппарате позволяет вести процесс культивирования клеток в толстом слое субстрата (300-500 мм), при выращивании в кюветах – 20-30 мм. Это существенно повышает удельную производительность установки.

Процесс получения клеток твердофазным способом требует использования слишком большой площади, не гарантирует стерильности и дает низкий выход продукта.

4.3 Выделение, очистка БАВ и получение готовой продукции.

Полученные с помощью биосинтеза продукты оказываются в сложной смеси с другими продуктами жизнедеятельности, а также с веществами среды культивирования как растительных, животных, так и микробных клеток. Важнейшей задачей биотехнологии является очистка целевого продукта из этой сложной смеси. Решение этой задачи осуществляется обычно в две стадии: предварительная обработка биомассы и выделение, очистка БАВ.

Известно, что к БАВ, используемым в медицинской практике, предъявляются очень высокие требования:

- высокая степень очистки;
- фармакологическая активность;
- стерильность.

Поэтому необходимо соблюдать высокую степень чистоты на всех стадиях и операциях – поддерживать в исключительной чистоте не только используемое оборудование, но и помещение, где осуществляется как биосинтез БАВ и так получение препарата из него с соблюдением правил международной системы ЩМР.

4.3.1 Предварительная обработка биомассы.

Культура представляет собой суспензию клеток продуцента в культуральной среде. При этом целевой продукт может оказаться либо в составе клеточной биомассы, либо в культуральной среде (нативный раствор). Ясно, что в любом из этих случаев необходимо разделить клеточную массу и культуральную среду, что по сути является первым этапом очистки целевого продукта или на практике называется этапом предварительной обработки биомассы.

В зависимости от того, где БАВ сосредоточено (в культуральной среде или в клетке) применяют соответствующие методы его извлечения. Отделение нативного раствора от биомассы взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования.

Для процесса фильтрации применяют различные фильтрующие аппараты: фильтр-пресс, нути-, друк-фильтры, центрифуги, сепараторы.

Фильтр-прессы применяют для обработки больших объемов культуральной жидкости. Эти аппараты состоят из ряда чередующихся плит и рам и фильтрующих перегородок между ними. Процесс фильтрации осуществляется под давлением.

Для фильтрации небольших объемов культуральной жидкости обычно используют нути-, друк-фильтры. Первый аппарат работает под вакуумом, второй – в условиях повышенного давления над фильтрующейся жидкостью.

Для получения жидкости, освобожденной от взвешенных частиц, широкой распространение нашел метод центрифугирования.

Определение мицелия или других взвешенных частиц может также происходить в сепараторах. При скорости вращения барабана, равной 7000-7500 об/мин, благодаря центробежной силе, твердые частицы устремляются к стенкам барабана, где и осаждаются, а отсепарированная жидкость стремиться к центру барабана и поднимается в специальные камеры.

Выделение БАВ из клеток организма – продуцента осуществляют с помощью экстракции органическими растворителями. Есть БАВ содержится в культуральной жидкости и в клетках продуцента, первичной операцией его выделения является перевод в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. Для этого БАВ, содержащиеся в культуральной жидкости и в клетках продуцента, переводят в осадок, а затем его экстрагируют.

При суспензионном культивировании, если БАВ находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции растворителями, которые не смешиваются с жидкой фазой, или осаждают в виде нерастворимого соединений, или сорбируют ионообменными силами.

При твердофазном способе культивирования с использованием механизированных установок или качалок осуществляют съем сырой биомассы хорошо выросшей культуры, затем проводят сушку биомассы на противнях при температуре 58 ± 2°С. Время сушки биомассы зависит от:

- начальной влажности биомассы;
- толщины слоя биомассы;
- температуры сушки.

Окончание процесса сушки определяют на ощупь. Не должно быть мягких влажных комочков. Сухая масса должна быть от желтого до коричневого цвета, рыхлая, легко рассыпающаяся при продавливании между пальцами. Остаточная влажность биомассы после сушки не более 12%. Затем сухую биомассу подают на стадию выделения и очистки БАВ с аналитическим паспортом на содержание БАВ.

4.3.2 Выделение и очистка БАВ.

Одной из особенностей стадии выделения и очистки является то, что при выделении БАВ приходится работать с весьма невысокими концентрациями выделяемого вещества (не превышающих 2%). В конце стадии очистки уже имеют дело с более высоким концентрациями, достигающими 20-30%.

Цель очистки – извлечение БАВ из нативной жидкости или из клеток продуцента, концентрация его и освобождение (собственно очистка) от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высоко очищенного препарата, пригодного для соответствующего применения.

БАВ растительного происхождения под влиянием жестких внешних факторов (повышенная температура, высокая кислотность и щелочность и др.) в ряде случаев теряют свои свойства, инактивируются. Поэтому при их выделении и очистке необходим максимум осторожности.

Стадия выделения и химической очистки включает ряд процессов, начиная от обработки нативного раствора до сушки готового очищенного препарата. На этой стадии, в зависимости от свойств БАВ, его химического строения и места основного накопления применяют различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используют экстракцию с системах жидкость – жидкость, экстракцию осадка, сорбцию на различных сорбционных материалах, мембранные методы очистки, кристаллизацию, упаривание, сушку.

Методами экстракции и осаждения получают относительно грубо очищенные препараты – со степенью очистки целевого продукта 5-10. Для некоторых целей такой очистки оказывается достаточно, и этим следует пользоваться, поскольку простые по технологии процедуры с использованием дешевых реагентов приводят к получению препаратов с низкой себестоимостью. Это, в свою очередь, положительно сказывается на экономике производства.

Во многих случаях, однако, возникает необходимость получения высоко очищенных препаратов. К таким случаям относится,

в частности, получение продуктов для применения в медицине в качестве лекарственных и диагностических средств, а также для исследовательских целей.

При разработке процессов получения высокоочищенных биопрепаратов используются процедуры тонкой очистки, большая часть которых заимствована из лабораторной практики. К ним относятся хроматографическое разделение, препаративный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, фракционное осаждение (органическими растворителями, солями и т.п.) и ряд других. Эти методы используются в различных комбинациях и среди них наиболее широкое применение находит хроматография.

Для хроматографического разделения смесей веществ используют различные технологические приемы, основанные на различных принципах взаимодействия компонентов разделяемой смеси с хроматографическими материалами (сорбентами).

Наиболее часто используют:

- ионообменная хроматография (сорбент представляет собой твердый носитель, содержащий ионизирующие группы, с которыми связываются с тем или иным сродством компоненты разделяемой смеси);
- распределительная хроматография (сорбент представляет собой нейтральный твердый носитель, на котором сорбирована неподвижная фаза; подвижной фазой в данном случае является растворитель, сам процесс основан на распределении компонентов смеси между подвижной и неподвижной жидкими фазами);
- хроматография на молекулярных ситах (гель-проникающая хроматография, гель-фильтрация); сорбент представляет собой гранулы геля, имеющие поры определенного среднего размера, в которые могут проникать молекулы компонентов с размером некоторой величины и не могут проникать молекулы большего размера. В колонке, содержащей такой носитель, объем растворителя доступного для молекул разного размера, оказывается различным: малые моле-

кулы диффундируют как в межгранулярном, так и внутригранулярном объеме, крупные молекулы могут диффундировать лишь в межгранулярном пространстве. Разделение достигается за счет разной скорости перемещения частиц с различными размерами молекул по колонке, при этом частица большего размера движутся большой скоростью;

- аффиная хроматография (сорбент представляет собой твердый носитель, к которому химически присоединены функциональные группы, избирательно связывающие какой-либо из компонентов разделяемой смеси; остальные компоненты раствора не взаимодействуют с носителем и выходят в свободном объеме колонки).

Также могут найти применение адсорбционная хроматография и гидрофобная хроматография.

4.3.3 Получение готовой продукции.

После выделения и химической очистки БАВ его необходимо высушить – удалить из препарата свободную и связанную воду. Поскольку некоторые БАВ, полученные по этой технологии в той или иной степени термолабильны, для их высушивания необходимо применять методы, не приводящие к потере биологической активности и не изменяющие цвет препарата.

На современном этапе получения БАВ используют различные методы обезвоживания препарата. Помимо обычных методов сушки, широкое распространение получила лиофильная сушка БАВ, которая проводится при сравнительно низких температурах (-8, -12°С).

Прогрессивным методом при работе с большим количеством раствора, содержащего БАВ, является высушивание с применением распылительных сушилок. Раствор БАВ пневматически распыляется до мельчайших капель в камере потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания БАВ протекает в течение нескольких секунд. При этом даже термолабильные вещества не меняют своих свойств.

Фасовку порошков производят в емкость из оранжевого стекла.

Готовый порошок подвергается тщательному аналитическому, биологическому и фармакологическому контролю.

Словарь основных терминов клеточной и тканевой биотехнологии

Анеуплоид – ядро, клетка, организм с числом хромосом, отклоняющимся от Х и от чисел, кратных Х.

Биомасса – общая масса одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема ……

Биотехнология новейшая (синоним: молекулярная биотехнология) – наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных, микроорганизмов, вирусов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

Время генерации клетки – интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

Время удвоения популяции – интервал времени, за который число клеток в популяциях увеличивается вдвое.

Дедифференциация – переход специализированных, неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток.

Дифференциация - комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Дифференцировка - состояние специализации клеток, отличающее их от других.

Изолированный протопласт - растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Инокулюм (трансплант) часть суспензионной (каллусной) культуры, используемая для пересадки в свежую среду.

Каллус - ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

Клеточная селекция – метод выделения генетически модифицированных мутантных клеток и самоклональных вариаций с помощью селективных условий.

Клон – совокупность клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

Клональное микроразомножение – получение in vitro неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению.

Клонирование – получение генетически идентичных клеток органов популяций.

Культура каллусных тканей - выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов (пыльники, семяпочки и т. д.) растений.

Культивирование изолированных протопластов - выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок у изолированных протопластов культура превращается в культуру клеток.

Культура опухолевых тканей - выращивание в длительной культуре сегментов, изолированных из растительных опухолей разного происхождения и освобожденных от патогенов, индуцировавших развитие опухоли.

Культура отдельных клеток - выращивание одиночных клеток при низкой плотности высева: 1) на очень богатых питательных средах, 2) с помощью культуры «няньки» или 3) питающего слоя.

Культура эксплантов - инкубация в стерильных условиях на питательных средах, либо вызывающих, либо не вызывающих

пролиферацию сегментов, изолированных из разных органов растений.

Линия - культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Меристема – образовательные ткани с активно делящимися недиференцированными клетками.

Органогенез – процесс возникновения в неорганизованной растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней, листовых зачатков и побегов).

Полиплоид – ядро, клетка, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символы 3X, 4X и т.д.).

Популяция клеток - совокупность культивируемых клеток.

Редифференциация - переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Ростовой цикл - рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризуется S-образной кривой. Фазы ростового цикла: латентная, экспоненциальная, замедления роста, стационарная, деградации.

Слияние изолированных протопластов - формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

Самоклоны – регенеранты растений, полученные из соматических клеток и обладающие определенными отличиями от исходных форм.

Самоклональная вариабельность – размах колебаний в различии признаков у растений, регенированных из культивируемых соматических клеток.

Самоклональные вариации и варианты – фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органельных геномов растительных клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменение в структуре генов, хромосом, геномов).

Соматическая (парасексуальная) гибридизация - система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению соматических гибридов-растений и гибридных клеточных линий.

Соматический гибрид – регенерантное растение, полученное путем слияния (гибридизации) соматических клеток.

Субкультивирование – перенос трансплантов (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Суспензионная культура - выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

Тотипотентность - свойство трагических клеток растений полностью реализовать свою наследственную программу онтогенестического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян.

Трансгенные, генетически модифицированные организмы (ГМО) – растения, животные, микроорганизмы и вирусы с измененной наследственностью, вызванный включением в их геном чужеродных генов с помощью генно-инженерных методов.

Цикл выращивания - период от помещения инокулюма или трансплантата в свежую среду до последующего субкультивирования.

Штамм - культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, возникших из клеток, присутствующих в первичной культуре.

Эксплант - фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

In vitro - выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

In vivo – выращивание живого материала в естественных условиях.

Цитируемая литература

1. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве./ Пер. с болг. Е.В. Дененко. Отв. Ред. Шумный В.К., Новосибирск, 1993. – 241.

2. Артамонов В.И. Биотехнология – агропромышленному комплексу. М.: Наука, 1989. –160с.

3. Биотехнология. В 8-ми кн. Книга 3. Клеточная инженерия. Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Кидкин и др. М.: ВШ. 1987. –127 с.

4. Биотехнология сельскохозяйственных растений/ Пер. с англ. В.И. Негрука. Предисловие Р.Г. Бутенко. М.: Агропромиздат, 1987. –301с.

5. Биотехнология растения: культура клеток/ Г.П. Болвел и др., пер. с англ. Под ред. Р.Г. Бутенко. М.: Агропромиздат, 1989 – 280с.

6. Левенко Б.А. Биотехнология растений: сегодня и завтра. Физиология и биохимия культурных растений, 1999, т.31, №3, с.163-171.

7. Носов А.М. Физиологическая регуляция роста и синтеза вторичных соединений. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991, с.5-19.

8. основы сельскохозяйственной биотехнологии/ Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко и др. – М.: Агропромиздат, 1990. –384.

9. Першина Л.А. Методы культивирования in vitro в биотехнологии растений. Новосибирск, Изд. НГУ, 2000, 68 с.

10. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб/ В.С. Шевелуха и др. М.: ВШ, 2003. –496с.

11. Сидоров В.А. Биотехнология растений: клеточная селекция. – Киев: Наук. Думка, 1990. 280с.

12. Чуетов В.И. и др. Промышленная технология лекарств / Учебник. Том 2. Изд-во НФАУ, Харьков, 2002, 716 с.

13. Komamine A., Asami J., Endo Jet al Jene expression during somatic emryogenesis in carrot suspension cultures// Plant Bitechnology and in vitro biolodgy in the 21st Century klewer Academic Publishers. Dordrecht; Boston; London 1999, p. 65-68.

Ключевые слова: культура изолированных клеток и тканей растений, клеточная инженерия растений, вещества вторичного синтеза, каллусная ткань, твердофазная ферментация, глубинная суспензионная культура, непрерывное культивирование