

УДК 581.1

М.В. ТИТОВА^{2,*}, Н.А. ШУМИЛО², О.В. РЕШЕТНЯК², Е.С. ГЛАГОЛЕВА¹, А.М. НОСОВ^{2,*}

* Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234

** ФГБУН “Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева” РАН, Москва, 127276

e-mail: titomirez@mail.ru

Физиологические характеристики суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* при масштабировании процесса выращивания

Осуществлено масштабирование выращивания суспензионной культуры клеток женьшеня японского *Panax japonicus* var. *repens* в полупроточном режиме (отъемно-доливной метод) от колб до биореакторов полупромышленного объема (630 л). Исследованы изменения ростовых и биосинтетических характеристик клеточной популяции. Показано, что влияние условий аппаратного выращивания на ростовые характеристики культур клеток менее существенно, чем на биосинтетические (образование гинзенозидов). При переходе к аппаратному выращиванию культуры клеток женьшеня наблюдали снижение общего содержания основных гинзенозидов в клеточной биомассе, а также изменения в соотношении индивидуальных соединений. Установлено, что исследуемый штамм характеризуется широким пределом варьирования содержания гинзенозидов как при стандартном выращивании в колбах, так и при выращивании в биореакторах. По результатам регулярно проводимого анализа суммарное содержание семи основных гинзенозидов (Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd, Rg₁, Re) в биомассе клеток может составлять от 0,5 до 3,0 % от сухой массы клеток.

Ключевые слова: биореактор, гинзенозиды, суспензионная культура растительных клеток, *Panax japonicus* var. *repens*.

В настоящее время значительное количество лекарственных препаратов создаются на базе растительного сырья, однако возможности их получения ограничены сокращающимися ресурсами дикорастущих растений. В связи с этим культуры клеток лекарственных растений представляют собой перспективный источник биологически активных веществ для нужд косметической, фарма-

цевтической и пищевой промышленности [1–3]. Тем не менее, успешных примеров масштабного промышленного использования клеток высших растений *in vitro* немного. Это связано прежде всего с трудностями в селекции растительных штаммов-продуцентов, трудоемкостью работ по оптимизации их выращивания и, наконец, сложностью масштабирования процессов культивирования [4].

Титова Мария Владимировна, Шумило Николай Анатольевич, Решетняк Оксана Владимировна, Глаголева Елена Сергеевна, Носов Александр Михайлович.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

* Авторы для переписки.

Большой интерес с практической точки зрения представляют работы по исследованию возможности аппаратного выращивания культур клеток лекарственных растений, синтезирующих изопреноиды с высокой биологической активностью. Один из наиболее известных представителей подобных растений — женьшень японский (*Panax japonicus*), продуцент гинзенозидов, относящийся к классу тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда.

Женьшень активно используется в восточной народной медицине уже более 2000 лет. В течение XX века отмечается неуклонный рост интереса к его фармацевтическим свойствам. Только за 2000—2004 годы в мировой научной литературе было опубликовано более 900 статей, посвященных биологической активности женьшеня [5, 6]. К настоящему времени накоплена обширная информация, отражающая действие препаратов женьшеня на центральную нервную систему, нейроэндокринные функции, метаболизм углеводов и липидов, иммунную и сердечнососудистую системы человека. Кроме того, показано, что женьшень и его компоненты обладают противоопухолевым, антистрессорным и антиоксидантным действием [7—9].

В ИФР РАН в конце прошлого века была получена суспензионная культура клеток эндемичного для Дальнего Востока женьшеня японского *Panax japonicus* var. *repens* [10]. В дальнейших исследованиях было установлено, что полученная суспензионная культура клеток обладает достаточно высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками. Было показано наличие в этой культуре клеток гликозидов даммаранового ряда (основные — гинзенозиды Rg₁, Re, Rb₁, Rb₂, Rc, малонил-Rb₁) и гликозидов олеаноловой кислоты (гинзенозид R₀) [11—14].

По содержанию индивидуальных гликозидов преобладающими в культуре клеток *Panax japonicus*, как правило, являются гинзенозиды Rg₁, малонил-Rb₁ и R₀. Значительное накопление гликозидов олеананового ряда характерно именно для женьшеня японского. В доступной литературе очень мало сведений о процессах экономически рентабельного выращивания культур клеток женьшеня в аппаратах промышленного объема [15, 16].

Целью настоящей работы было изучить возможность эффективного масштабирования процесса глубинного культивирования клеток женьшеня японского *Panax japonicus* var. *repens* на основании комплексного анализа физиологических показателей исследуемого штамма в процессе указанного изменения условий выращивания.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования. В качестве объекта использовали суспензионную культуру клеток женьшеня японского *Panax japonicus* С. А. Меу. var. *repens* Maxim коллекционного штамма — продуцента гинзенозидов (депонирован во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений, коллекционный № 62).

Условия культивирования. Культуру выращивали на модифицированной питательной среде с минеральной основой по Мурасиге—Скугу [17] с добавлением источников углеводов, витаминов и регуляторов роста (в соответствии с коллекционным паспортом).

Культивирование проводили в колбах или биореакторах.

Для выращивания суспензионных культур клеток (1/6—1/7 от общего объема колбы) на круговой качалке использовали колбы объемом 0,25—0,50 л. Культивирование осуществляли в темноте при температуре 26—27°, влажности 70—75% и частоте оборотов качалки 95—100 об/мин.

Для аппаратного выращивания использовали биореакторы трех типов:

1) барботажный соплоконусный ферментер (разработка отдела биологии клетки и биотехнологии РАН) с точечным аэрирующим устройством общим объемом 20 л и рабочим объемом 15 л.

2) аппарат с барботажом и механическим перемешиванием (фирма Electrolux, Швеция) с точечным аэрирующим устройством общим объемом 75 л и рабочим объемом 50 л. Тип перемешивающего устройства — "морской винт"; частота вращения мешалки 30—65 об/мин.

3) барботажный аппарат (1Т, ОКБА, Йошкар-Ола) с кольцевым аэрирующим устройством общим объемом 630 л и рабочим объемом 550 л.

Концентрацию растворенного кислорода (pO₂) поддерживали на уровне 10—40% от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования.

Для уменьшения отрицательного воздействия механического перемешивающего устройства в биореакторе на начальных фазах роста устанавливали минимальную скорость вращения устройства, при которой отсутствовала седиментация клеток. В период экспоненциального роста скорость вращения мешалки увеличивали до максимально возможной, не приводящей к разрушению клеток (степень повреждения определяли с помощью микроскопа). Температуру клеточной суспензии поддерживали на уровне 26±0,5°.

Ростовые и цито-физиологические параметры суспензионных культур *P. japonicus*. Для характеристики роста и физиологического состояния культуры определяли сухую и сырую массу клеток, степень их агрегированности, жизнеспособность и концентрацию [18].

При определении сырой массы клеток отбирали аликвоты по 10—15 мл суспензии, клетки отделяли от среды культивирования на бумажных фильтрах под вакуумом, промывали на фильтре дистиллированной водой и взвешивали. Для определения сухой массы отфильтрованную биомассу клеток высушивали до постоянной массы при 55—60°. При проведении химического анализа использовали аналогично подготовленные образцы клеточной биомассы.

Для характеристики агрегированности выделяли группы агрегатов с числом клеток до 5, 6—10, 11—20, 21—50 и более 50. Размер клеточных агрегатов определяли с помощью светового микроскопа. Агрегаты различали по количеству входящих в него клеток, агрегированность — по соотношению групп агрегатов в процентах. Просчитывали не менее 200 клеточных агрегатов на 1 препарат.

Жизнеспособность определяли под микроскопом как процент не окрашиваемых 0,025%-ной синькой Эванса (Panreac, Испания) клеточных агрегатов от их общего количества. Просчитывали не менее 250 агрегатов в трех повторностях.

Для подсчета числа клеток 0,5 мл суспензии инкубировали с 2,0—2,5 мл 20%-ного раствора хромовой кислоты («Реахим», Россия) при 60° в течение 15—20 мин в зависимости от возраста суспензии. Число клеток просчитывали в камере Фукса—Розенталя.

По первичным результатам, характеризующим рост культуры, рассчитывали следующие параметры [17]:

— индекс роста: $I = (X_{max})/X_0$,

— удельную скорость роста в экспоненциальной фазе: $\mu = (\Delta \ln X/X_0)/\Delta t$, [сут⁻¹],

где X_{max} — максимальное значение параметра (содержание сухой M_{dw} или сырой M_{fw} массы) в цикле роста, г/л; X_0 — начальное значение параметра в цикле роста г/л; Δt — длительность экспоненциальной фазы роста, сут.

Анализ количества и состава гинзенозидов в культуре клеток женьшеня методом ВЭЖХ. При выращивании суспензионной культуры клеток *P. japonicus* регулярно (через каждые 2—3 сут культивирования) отбирали образцы био-

массы и проводили определение количественного содержания гинзенозидов.

Для подготовки пробы 3—4 г сырой биомассы или 150—200 мг воздушно-сухой биомассы дважды экстрагировали метанолом (Sigma-Aldrich) при постоянном перемешивании. Время первой экстракции составляло 3 ч, второй — 1 ч. Экстракты объединяли и упаривали досуха под вакуумом на роторном испарителе при температуре 45—50°. Сухой остаток растворяли в воде и очищали на патронах Sep-Pak (Tessek, Чехия) размером 9×12 мм, заполненных сорбентом с фазой Separon SGX C18 (60 мкм). Патрон с нанесенной пробой последовательно промывали водой, 20%-ным и 80%-ным этанолом (Sigma-Aldrich). Сухой остаток последней фракции растворяли в смеси ацетонитрил (Panreac) — вода (36 : 65, об/об). Подготовленные таким образом образцы пропускали через тефлоновые микрофильтры (Tessek) с порами 0,2 мкм и использовали для ВЭЖХ-анализа. Разделение гинзенозидов проводили на приборе фирмы LKB (Швеция) со стальной колонкой (4×250 мм), заполненной Lichrosorb RP-18 с размером частиц 5 мкм (LKB). Анализ проводили при двух различных изократических режимах и скорости потока 0,5 мл/мин:

1) для гинзенозидов Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd — с использованием смеси ацетонитрил — вода в объемном соотношении 35 : 65;

2) для гинзенозидов Rg₁, Re — смеси ацетонитрил — вода в объемном соотношении 22 : 78.

Детекцию осуществляли при длине волны 203 нм. Для количественного определения использовали метод абсолютной калибровки стандартными препаратами индивидуальных гинзенозидов фирмы Sigma (США). Пересчет суммарного и индивидуального содержания гинзенозидов проводили на абсолютно сухую массу. Влажность образцов определяли по методике Государственной фармакопеи (XI издание). Минимальное определяемое количество каждого индивидуального гинзенозида было равно 20 мкг/г абсолютно сухой биомассы [19].

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам [20]. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения по 3 биологическим повторностям (3 колбы или 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.

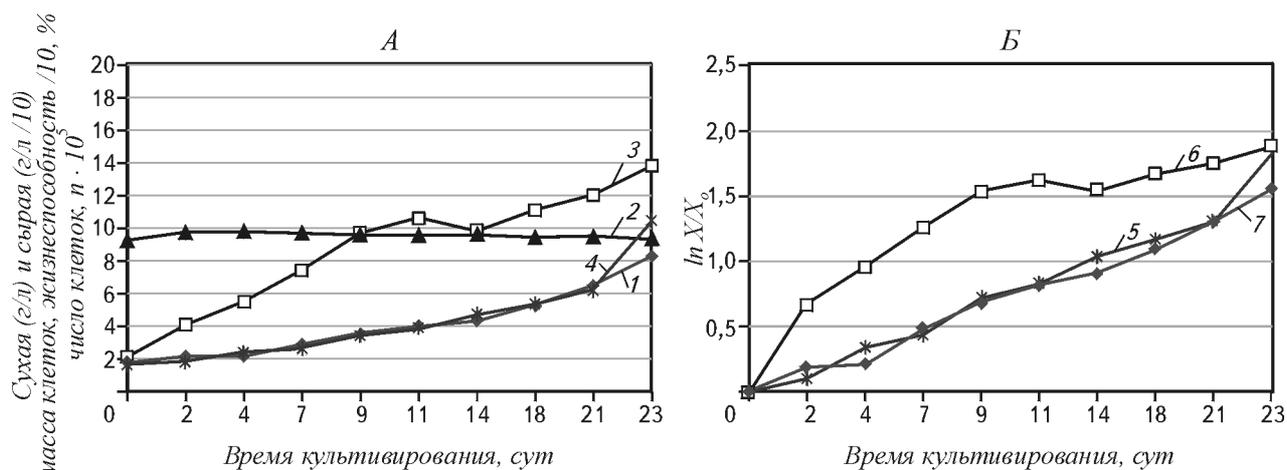


Рис. 1. Динамика роста суспензионной культуры клеток *P. japonicus* при выращивании в колбах объемом 250 мл в нормальной (А) и полулогарифмической (Б) системе координат: 1 — сухая масса, г/л; 2 — жизнеспособность/10, %; 3 — число клеток, $\cdot 10^5$; 4 — сырая масса/10, г/л; 5 — сырая масса, $\ln X/X_0$; 6 — число клеток, $\ln X/X_0$; 7 — сухая масса, $\ln X/X_0$ (X — текущие значения параметра в цикле культивирования, X_0 — начальные значения параметра в цикле культивирования)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *P. japonicus* при выращивании в колбах в стандартных условиях

Были исследованы ростовые характеристики и построены кривые роста по всем изученным параметрам (сырой и сухой массе, жизнеспособности и числу клеток) в нормальной и полулогарифмической системах координат при культивировании клеток в колбах (рис. 1). Рассчитанные по полученным данным основные ростовые показатели представлены в табл. 1. Для подтверждения стабильности полученных результатов определение

основных ростовых характеристик повторяли через каждые 7—10 циклов культивирования. Проведенный комплексный анализ полученных результатов позволил выявить характерные особенности исследуемой культуры клеток.

Для изучаемого штамма характерно наличие двух типов клеток — меристемоподобных и паренхимоподобных. Причем число последних увеличивалось к концу стационарной фазы цикла субкультивирования. Культура штамма *P. japonicus* является крупноагрегированной, более 50% ее массы приходится на агрегаты размером более 50 клеток. Форма агрегатов преимущественно округлая. Количество жизнеспособных единичных клеток и мелких агрегатов (до 5 клеток) незначительно (рис. 2).

Таблица 1

Ростовые показатели штамма *P. japonicus* при выращивании в различных системах (усредненные данные за несколько лет)

Система культивирования	M_{max_dw} , г/л*	v , %	μ_{dw} , сут ⁻¹	I_{dw}
Колбы	7,56—8,78	92—97	0,11—0,17	3,63—4,21
Биореактор				
20 л	8,65—10,78	84—91	0,12—0,14	3,32—4,87
75 л	8,50—9,50	80—85	0,09—0,10	2,62—3,51
630 л	8,60—9,85	88—92	0,11—0,13	2,54—3,14

* M_{max_dw} — максимальная концентрация биомассы по сухой массе; v — жизнеспособность клеток; μ_{dw} — удельная скорость роста по сухой массе; I_{dw} — индекс роста по сухой массе.

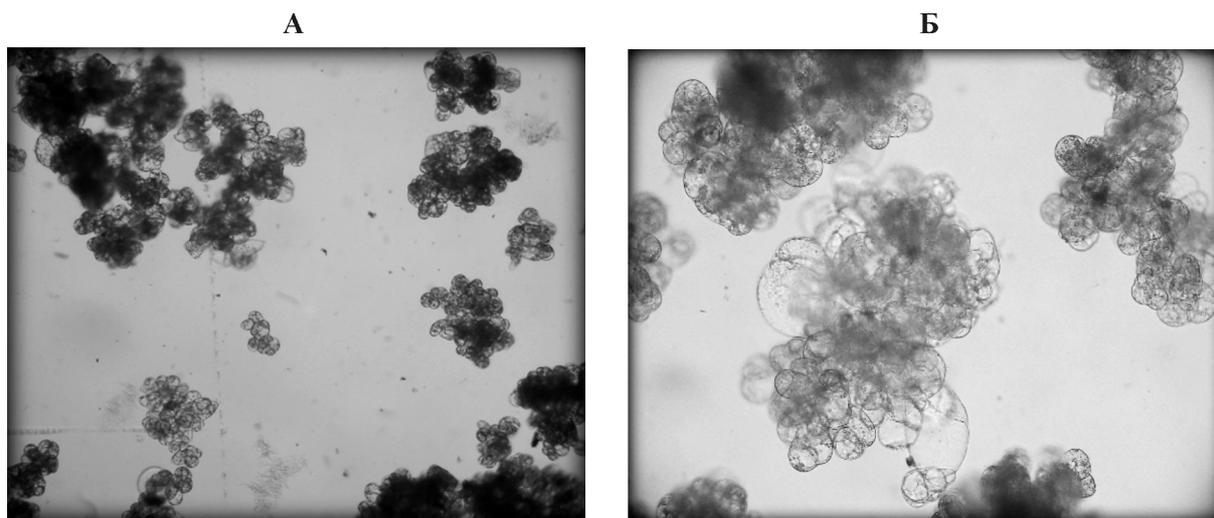


Рис. 2. Клетки и клеточные агрегаты суспензионной культуры клеток *P. japonicus* в экспоненциальной фазе роста при выращивании в колбах (увеличение $\times 5$ — А и $\times 10$ — Б)

Для исследуемой культуры (при начальной плотности 1,5—2,0 г/л по сухой биомассе и жизнеспособности клеток около 88—92 %) цикл субкультивирования составлял 22—26 сут, продолжительность лаг-фазы роста — в пределах 2—5 сут, фаза экспоненциального роста — 10 сут и более. Стационарная фаза наступала довольно поздно — на 18-е сутки и позже; при проведении экспериментов с указанной начальной плотностью инокуляции фазу деградации зафиксировать не удалось.

Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *P. japonicus* при выращивании в биореакторах

Масштабирование осуществляли по последовательной схеме от лабораторного барботажного биореактора (емкость 20 л, точечный барботер) к пилотному биореактору (емкость 75 л, механическое перемешивание, точечный барботер) и к промышленному барботажному биореактору (емкость 630 л, кольцевой барботер), причем аппараты меньшего объема использовали как инокуляторы для аппаратов большего объема.

Культивирование проводили в полупроточном многоциклическом режиме (периодическое добавление свежей среды после извлечения из биореактора определенного объема культуры, так называемый отъемно-доливной режим). «Отъем—долив» осуществляли при достижении плотности культуры, соответствующей началу фазы замедления роста. Разбавление средой в каждом цикле проводили до концентрации биомассы, исключая

щей наступление лаг-фазы (не ниже 2,0 г/л среды по сухой массе).

При выращивании исследуемого штамма в 20-литровом барботажном биореакторе общая продолжительность мультициклов варьировала в пределах 60—150 сут, причем каждый мультицикл состоял из 6—14 циклов субкультивирования. В ряде экспериментов выращивание осуществляли параллельно в 2—3 биореакторах.

Полученные результаты показывают, что жизнеспособность клеток в указанных условиях сохранялась на уровне 80—90%, максимальное накопление сухой биомассы наблюдали на 11-й—14-й день культивирования (до 10 г/л по сухой массе клеток) (рис. 3 и см. табл. 1) На достаточно высоком уровне при длительном полупроточном выращивании сохраняется и скорость прироста клеточной биомассы. Аналогичную картину наблюдали и при проведении повторных экспериментов.

В процессе отработки длительного полупроточного культивирования в пилотном 75-литровом биореакторе каждый мультицикл выращивания состоял из 2—4 циклов субкультивирования. Общая продолжительность мультициклов для всех вариантов не превышала 60 сут. Следует отметить, что получить устойчивый рост штаммов с сохранением продуктивности по биомассе и целевым продуктам вторичного метаболизма в течение более длительного времени в 75-литровом биореакторе не удалось. Основные ростовые характеристики культуры при росте в 75-литровом реакторе приведены в табл. 1 и на рис. 4.

Для выращивания культуры клеток женьшеня в данном биореакторе характерно снижение ос-

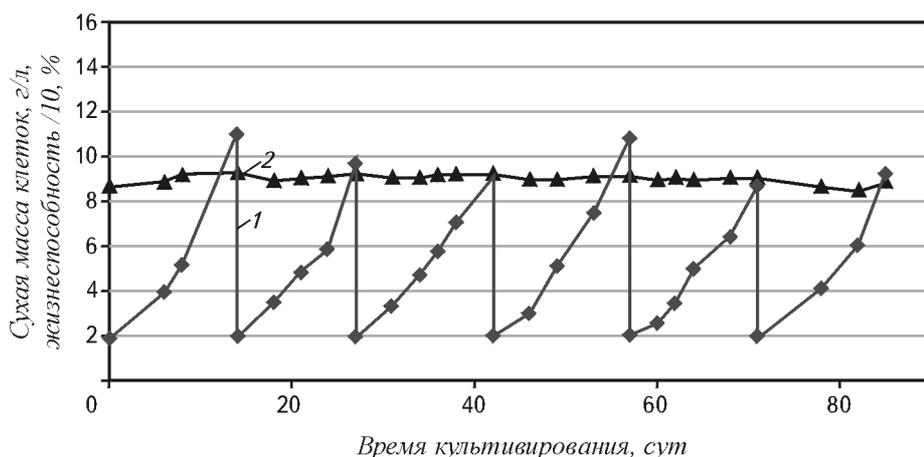


Рис. 3. Динамика роста суспензионной культуры клеток *P.japonicus* при полупроточном выращивании в 20-литровом барботажном биореакторе: 1 — сухая масса, г/л; 2 — жизнеспособность /10, %

новых ростовых показателей культуры клеток — жизнеспособности и скорости накопления клеточной биомассы (в среднем на 15—20%) — по сравнению с выращиванием в колбах (см. табл. 1), а также появление большого количества разрушенных клеток в среде культивирования.

В процессе полупроточного выращивания в 630-литровом биореакторе алгоритм культивирования и режим перемешивания соответствовали отработанным ранее в аппаратах меньшего объема. На рис. 5 и в табл. 1 представлены данные по динамике роста штамма, а также основные ростовые показатели. Продемонстрировано, что при переходе к непрерывному длительному выращиванию в полупромышленном аппарате ростовые характеристики исследуемого штамма сохранялись на достаточно высоком уровне. Максимальный уровень накопления сухой биомассы клеток наблюдали на 8—12-е сутки циклов субкультивирова-

ния; величина этого параметра не опускалась ниже 8,60 г/л (см. рис. 5).

Влияние смены системы культивирования на степень агрегированности клеток исследуемых штаммов

Определение состава клеточных популяций исследуемого штамма проводили в конце экспоненциальной фазы роста; при аппаратном выращивании отъемно-доливым методом измерения осуществляли для каждого цикла субкультивирования. Обобщенные результаты представлены в виде сводных диаграмм на рис. 6.

Показано, что в сравнении с культивированием в колбах при переходе к выращиванию в аппарате с механическим перемешиванием вследствие травматического разрушающего воздействия перемешивающего устройства у крупноагрегиро-

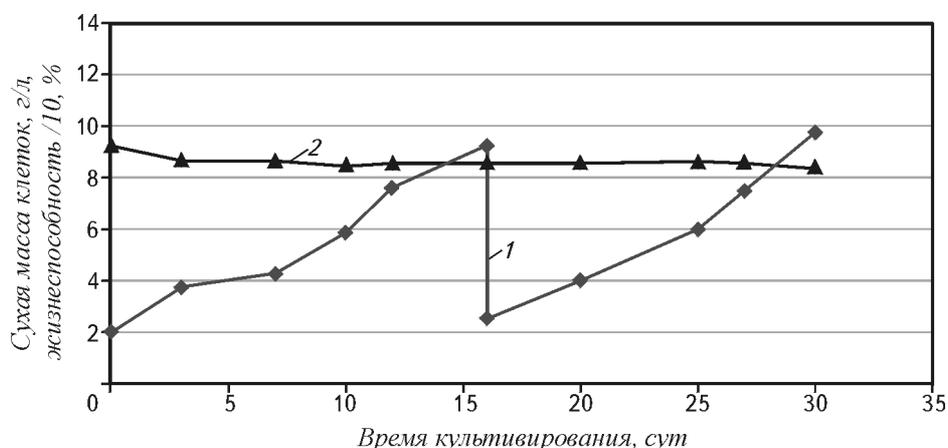


Рис. 4. Динамика роста суспензионной культуры клеток *P.japonicus* при полупроточном выращивании в 75-литровом барботажном биореакторе с механическим перемешиванием: 1 — сухая масса, г/л; 2 — жизнеспособность /10, %

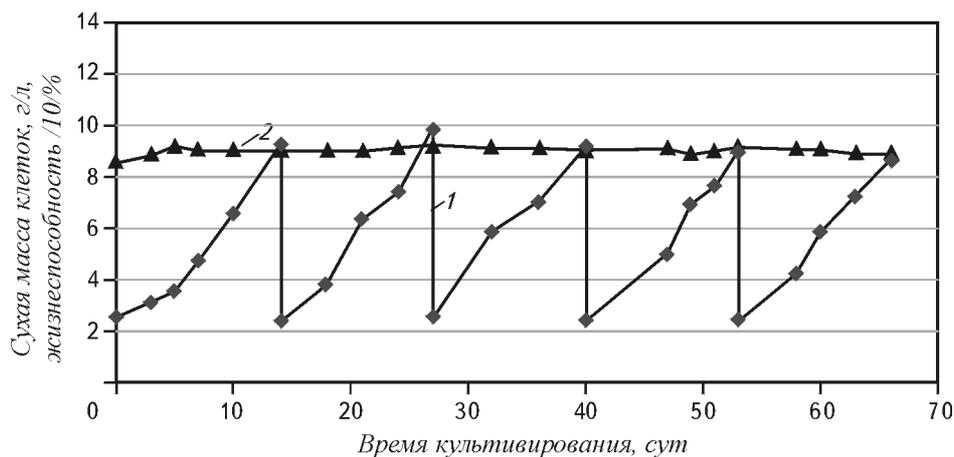


Рис. 5. Динамика роста суспензионной культуры клеток *P. japonicus* при полупроточном выращивании в 630-литровом барботажном биореакторе: 1 — сухая масса, г/л; 2 — жизнеспособность/10, %

ванной суспензии *P. japonicus* число крупных агрегатов с числом клеток более 50 снижается почти в 2 раза, а также уменьшается количество одиночных клеток и мелких агрегатов (от 1 до 10 клеток) (см. рис. 6). Напротив, при выращивании в 630-литровом барботажном аппарате отмечено некоторое увеличение степени агрегированности (количество крупных клеточных кластеров увеличивается в среднем на 15—20% по сравнению с культивированием в колбах).

Влияние смены системы культивирования на накопление вторичных метаболитов

Проводили исследование содержания гинзенозидов даммаранового ряда Rb-группы (агликон протопанаксадиол — Rb₁, Rc, Rb₂, Rd) и Rg-группы

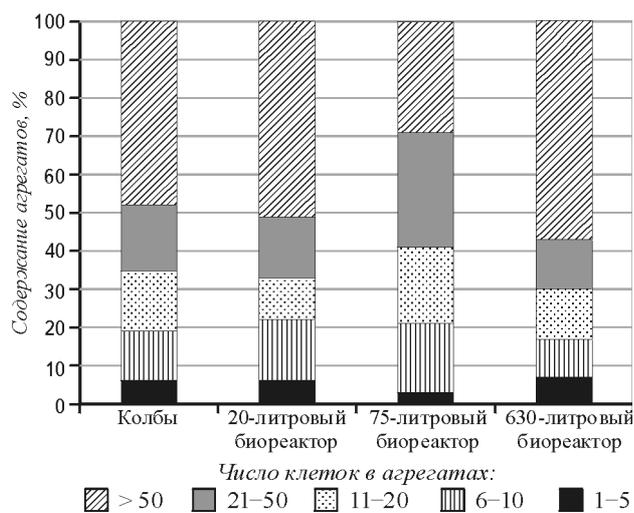


Рис. 6. Содержание агрегатов в суспензионных культурах клеток при полупроточном выращивании в различных системах (при M_{max_dw}), %

(агликон протопанаксатриол — Rg₁, Re, Rf) в биомассе клеток *P. japonicus* при полупроточном выращивании в биореакторах различного типа. Полученные результаты, соответствующие максимальному уровню накопления тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов), представлены в сводной табл. 2 и на рис. 7.

При стандартном культивировании в колбах наиболее активный синтез гинзенозидов приходился на 12-е—14-е сутки. Из результатов произведенного анализа следует, что доминирующими являются Rg₁- и Re-гинзенозиды (до 4,8 и до 11,3 мг/г сухой массы, соответственно, см. рис. 7), что соответствует данным, полученным для *P. japonicus* ранее [10, 11].

При переходе к выращиванию в биореакторах, динамика накопления гинзенозидов существенно не изменялись. Максимальное содержание гинзенозидов отмечали к концу циклов субкультивирования при достижении соответствующих значений M_{max_dw} (см. рис. 7). Однако при длительном аппаратном культивировании в 20-литровом реакторе наблюдали иную картину, а именно снижение общего содержания гинзенозидов и изменения в соотношении их индивидуальных компонентов в сравнении с таковым при стандартном выращивании в колбах; в частности, в 2,0 раза снижалось содержание Re-гинзенозидов, в 1,5 раза — Rd- и Rb₂-гинзенозидов, в 2,5—3,0 раза — Rb₁-гинзенозидов.

При культивировании в 75-литровом аппарате 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 снижения уровня гинзенозидов для *P. japonicus* наблюдали при масштабировании выращивания в 630-литровых биореакторах.

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

Компонент	20-литровый биореактор	75-литровый биореактор	630-литровый биореактор	Колбы (контроль)
Rb ₁	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
Rb ₂	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
Rg ₁	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

На основании представленных данных можно предположить, что уменьшение уровня накопления Rb₁-, Rd- и Rb₂-гинзенозидов является спе-

цифической стрессовой реакцией клеток *P. japonicus* на изменение условий культивирования при переходе к аппаратному выращиванию.

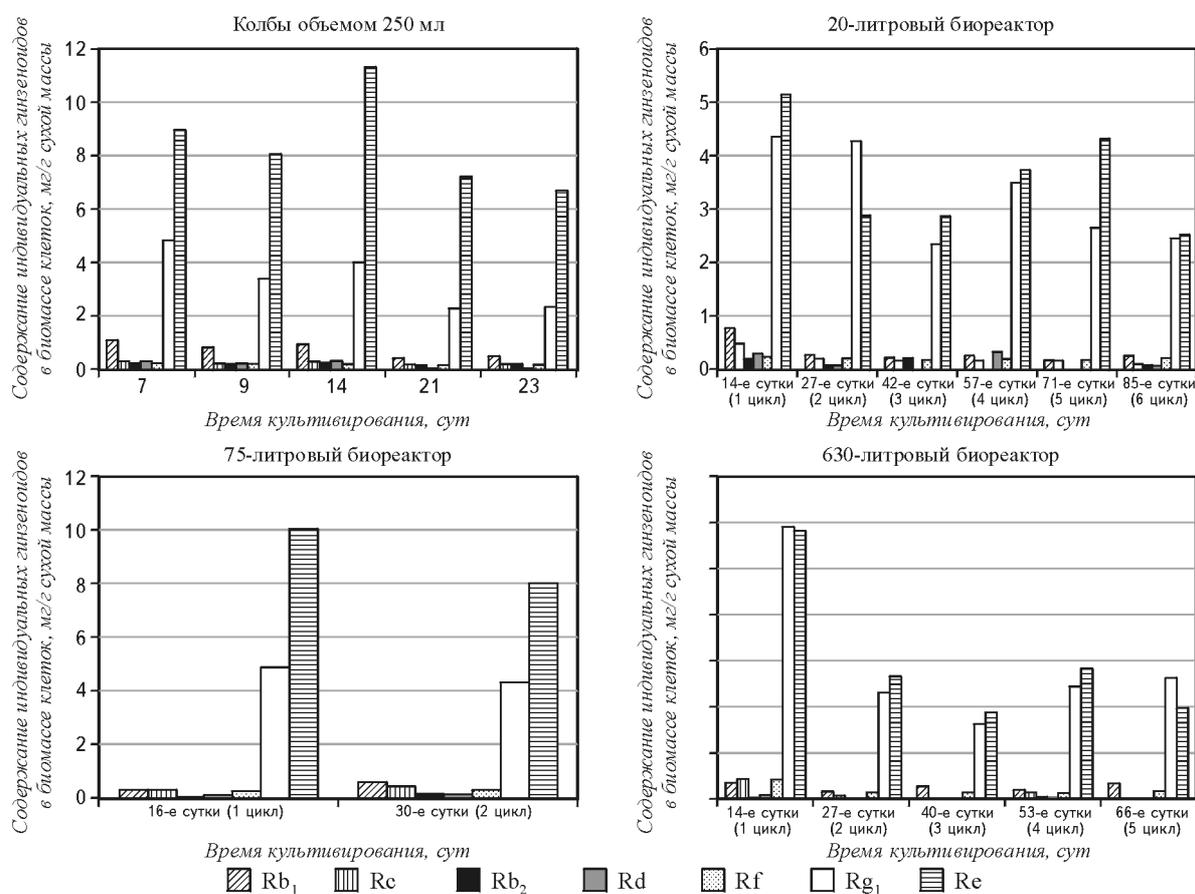


Рис. 7. Содержание индивидуальных гинзенозидов в биомассе клеток *P. japonicus* при полупроточном выращивании в различных системах

Таким образом, была рассмотрена возможность промышленного аппаратного культивирования суспензионной культуры клеток женьшеня японского при помощи поэтапного анализа наиболее существенных параметров, характеризующих физиологическое состояние штамма на всех стадиях процесса масштабирования — от колб до 630-литровых биореакторов.

Было показано снижение общего содержания основных гинзенозидов в клеточной биомассе при переходе к выращиванию в биореакторах, а также изменения в соотношении индивидуальных соединений. Кроме того, исследуемый штамм характеризовался некоторой нестабильностью синтеза гинзенозидов, в том числе и при стандартном выращивании в колбах на качалке: по результатам регулярно проводимого анализа общее содержание гинзенозидов в клеточной биомассе варьировало в пределах 0,6—2,8% от сухой массы клеток.

Полученные результаты также показали, что отобранный штамм является лабильной системой, претерпевающей определенные изменения свойств в результате смены условий окружающей среды. При этом влияние аппаратного выращивания на ростовые характеристики культур клеток было менее существенно, чем на биосинтетические (образование вторичных метаболитов).

Масштабирование выращивания суспензионной культуры клеток *P. japonicus* по представленной схеме с использованием отъемно-доливного метода повторяли неоднократно при сохранении удовлетворительных физиологических показателей. Было продемонстрировано, что для проведения длительного аппаратного культивирования клеток *P. japonicus* предпочтительной системой является барботажный биореактор. При использовании аппаратов этого типа (20-литровый и 630-литровый биореакторы) были получены наиболее высокие ростовые и биосинтетические характеристики штамма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках реализации Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» (Государственный контракт № 14.М04.12.0002).

Получено 20.05.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramachandra Rao, S. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites / S. Ramachandra Rao, G.A. Ravishankar // *Biotechnol. Adv.* — 2002. — V. 20. — P. 101—153.
2. Bourgaud, F. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective / F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier // *Plant. Sci.* — 2001. — V. 161. — P. 839—851.
3. Collin, H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures // *Plant Growth Regulat.* — 2000. — V. 34. — P. 119—134.
4. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // *Phytochem. Rev.* — 2002. — V. 1. — P. 13—25.
5. Corbit, P.M. Simplified extraction of ginsenosides from American Ginseng (*P. quinquefolium* L.) for High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet analysis / P.M. Corbit, J.F.S. Ferreira, S.D. Ebbs, L.L. Murphy // *J. Agric. Food Chem.* — 2005. — V. 53. — P. 9867—9873.
6. Ji, L.L. Aging, exercise, and phytochemicals promises and pitfalls / L.L. Ji, D.M. Peterson // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2004. — V. 1019. — P. 453—461.
7. Дардымов И.В. Женьшень и элеутерокок (к механизму биологического действия). — М.: Наука, 1976. — 189 с.
8. Kitts, D.D. Efficacy and safety of ginseng / D.D. Kitts, C. Hu // *Public Health Nutrition.* — 2000. — V. 3. — P. 473—485.
9. Fukushima, S. Inhibition by ginseng of colon carcinogenesis in rats / S. Fukushima, H. Wanibuchi, W. Li // *J. Korean Med. Sci.* — 2001. — V. 16. — P. 75—80.
10. Чайко А.Л. Культура клеток женьшеня японского *Panax japonicus* (var. *repens*): получение каллусной и суспензионной культуры, оптимизация роста и анализ панаксозидов / А.Л. Чайко, О.В. Решетняк, И.Е. Куличенко // *Биотехнология.* — 1999. — № 6. — С. 51—56.
11. Смоленская И.Н. Рост суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* (var. *repens*) и биосинтез панаксозидов в культуре / И.Н. Смоленская, О.В. Решетняк, С.Э. Зоринянец, А.Л. Чайко, А.М. Носов, И.Е. Князьков // *Цитология.* — 2001. — Т. 43. — С. 891—897.
12. Смоленская И.Н. Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* (var. *repens*) 1. Параметры роста и цитогенетические характеристики / И.Н. Смоленская, С.Э. Зоринянец, Ю.Н. Смирнова, А.В. Носов, А.Л. Чайко, А.М. Носов // *Биотехнология.* — 2005. — № 5. — С. 21—28.
13. Демидова Е.В. Влияние состава питательных сред на ростовые характеристики и содержание тритерпеновых гликозидов суспензионной культуры клеток женьшеня японского (*Panax japonicus* var. *repens*) / Е.В. Демидова, А.М. Носов, О.В. Решетняк // *Биотехнология.* — 2006. — № 2. — С. 32 — 39.
14. Kochkin, D.V. Malonyl-ginsenoside content of a cell-suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* / D.V. Kochkin, V.V. Kachala, A.S. Shashkov, A.O. Chizhov, V.Y. Chirva, A.M. Nosov // *Phytochemistry.* — 2013. — V. 93. — P. 18—26.
15. Строгов С.Е. Опыт крупномасштабного культивирования клеток женьшеня в суспензии. 1. Масштабирование опытно-промышленной установки / С.Е. Строгов, Г.В. Зайцева, И.М. Белоусова, Н.В. Шамков, Г.М. Симонова // *Биотехнология.* — 1990. — №4. — С. 43—45.
16. Шамков Н.В. Опыт крупномасштабного культивирования клеток женьшеня в суспензии. 2. Отработка режимов культивирования клеток женьшеня на опытно-промыш-

ленной установке / Н.В. Шамков, Г.В. Зайцева, И.М. Белоусова, С.Е. Строгов, Г.М. Симонова, Р.Г. Бутенко, А.М. Носов // Биотехнология. — 1991. — № 1. — С. 32—35.

17. *Murashige, T.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* — 1962. — V. 15. — P. 473—497.
18. *Носов А.М.* Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений [Под ред. Вл.В. Кузнецова и др.]. — М.: Бинном, 2012. — С. 386—402.
19. *Решетняк О.В.* Сравнительный анализ гинзенозидов в разных частях корней и в культивируемых клетках женьшеня настоящего / О.В. Решетняк, Н.Д. Черняк, И.Н. Смоленская, А.В. Орешников, Ю.Н. Смирнова, А.М. Носов // *Химико-фармацевтический журнал.* — 2008. — Т. 42. — С. 34—39.
20. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. — изд. 3 испр. — Минск: Вышэйшая школа, 1973. — 320 с.

M.V. TITOVA^{2,*}, N.A. SHUMILO², O.V. RESHETNYAK², E.S. GLAGOLEVA¹, and A.M. NOSOV^{2,*}

¹The Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow Russia

²The Timiryazev Institute for Plant Physiology, Russ. Acad. Sci., 127276, Moscow Russia

e-mail: titomirez@mail.ru

Physiological Characteristics of *Panax japonicus* Suspension Cell Culture during Growth Scaling-up

A scaled-up cultivation from flasks to semi-industrial bioreactors (up to 630 l) of the *Panax japonicus* suspension cell culture under a semi-continuous regime has been performed. The cell population growth and biosynthetic characteristics during the scaling-up process were investigated. It was shown that the cultivation in bioreactors had less effect on the growth than on biosynthetic characteristics (ginsenoside formation). The decrease in the total content of major ginsenosides in the cell biomass and also changes in the ratio of individual compounds were observed as a result of going to the bioreactor cultivation. The under-research strain is characterized by a wide variation of ginsenoside content under either conventional culturing in flasks or growing in a bioreactor. The regular chemical analysis showed, that the total content of 7 major ginsenosides (Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd, Rg₁ and Re) in cell biomass can vary from 0.5% to 3.0 % of dry cell biomass.

Key words: bioreactor, ginsenosides, *Panax japonicus* var. *repens*, plant cell suspension culture.

* Authors for correspondence.