

УДК 577.13+576.535.2

## РОСТ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *TAXUS BACCATA* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В КОЛБАХ И БИОРЕАКТОРЕ

Л. В. Орлова<sup>1</sup>, Е. Б. Глоба<sup>2</sup>, Н. Д. Черняк<sup>2</sup>, Е. В. Демидова<sup>2</sup>, М. В. Титова<sup>2</sup>,  
А. Е. Соловченко<sup>3</sup>, Р. В. Сергеев<sup>4</sup>, А. М. Носов<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Казанский Федеральный университет,  
Российская Федерация, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18  
E-mail: love@orloffv.ru

<sup>2</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,  
Российская Федерация, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35  
E-mail: amn@ippras.ru

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Российская Федерация, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 12  
E-mail: wundy@mail.ru

<sup>4</sup>Поволжский государственный технологический университет,  
Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 3  
E-mail: sergeyevrv@volgatech.net

*Проведено выращивание и анализ ростовых характеристик суспензионной культуры Taxus baccata (линия 107ПВП) при выращивании в колбах и барботажном биореакторе рабочим объёмом 1,5 л в полупроточном режиме. Показано, что культура обладает удовлетворительным ростом, при этом ростовые показатели исследуемой линии при аппаратном культивировании близки к показателям, полученным при периодическом выращивании в колбах. По результатам фитохимического анализа (данные ВЭЖХ с диодноматричным детектором) установлено, что исследуемая суспензионная культура клеток тиса ягодного содержит таксоиды (баккатин III и паклитаксел). Образование таксоидов сохраняется при переходе к аппаратному выращиванию исследуемой культуры клеток Taxus baccata, что важно для её биотехнологического использования.*

**Ключевые слова:** культура клеток *in vitro*; ВЭЖХ; таксол; баккатин III; *Taxus baccata*.

**Введение.** Одним из наиболее перспективных направлений современной фитобиотехнологии является использование культур тканей и клеток высших растений для получения биологически активных веществ. Обоснованность такого подхода определяется, с одной стороны – постоянно растущей потребностью медицины в уникальных по структуре и активности природных соединениях, а с другой стороны – предельно низким уровнем естественных ресурсов растений продуцентов, многие из которых являются редкими исчезающими видами [1,2]. Альтернативным источником получения ценного растительного сырья для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой про-

мышленности может служить культура клеток растений. Данный способ имеет ряд преимуществ: экологическая чистота производства культуры клеток, гарантированное производство биомассы независимо от сезона и погодных условий, отсутствие в биомассе вредных добавок.

Значительный интерес для медицины представляют растения рода *Taxus*, так как вторичные метаболиты этих растений – дитерпеноиды сложного строения (таксоиды или таксаны), содержащиеся в коре и листьях этих растений, являются ценными противоопухолевыми агентами.

С 1992 в США, а с 1993 года и в России разрешён к применению лекарственный препарат «Paclitaxel», действующим

началом которого является таксоид паклитаксел (коммерческий синоним этого соединения – таксол) [3,4]. Открытие паклитаксела, впервые выделенного из коры *Taxus brevifolia*, является одним из самых значимых событий в лечении онкологических заболеваний [5].

Число раковых заболеваний, излечиваемых таксолом, достаточно быстро расширяется. На сегодняшний день он главным образом используется для лечения метастатического рака яичников, метастатического рака молочной железы и не мелкоклеточного рака лёгкого, а также в терапии второй линии от СПИДа, связанной с саркомой Капоши. Таксол в настоящее время изучается также для лечения болезней, не связанных с раком, которые требуют стабилизации микротрубочек во избежание клеточной пролиферации и ангиогенеза, например, псориаза и для лечения болезни Альцгеймера или Паркинсона [6].

С момента открытия таксола было проведено множество исследований, целью которых были попытки увеличить биосинтез данного соединения. Серьёзной проблемой в его получении является низкая концентрация (0,001–0,05 %) таксола в растительном материале, даже в наиболее продуктивных видах, таких как *T. brevifolia*. Поскольку для получения одного килограмма препарата необходимо около 10000 кг коры от более чем 3000 деревьев тиса, а одному пациенту на курс химиотерапии требуется примерно 2,5–3 г паклитаксела [7], то для лечения каждого пациента необходимо уничтожить около восьми 60-летних деревьев тиса. Кроме того, получение таксола из коры тиса требует сложной системы и специфических методов очистки с использованием современных и дорогостоящих технологий.

Принимая во внимание эти факты, вместе с сезонными изменениями концентрации таксоидов и высоким спросом на лекарственные препараты, существует острая необходимость поиска других ис-

точников таксола. Альтернативным возобновляемым сырьём для получения таксоидов может служить культура растительных клеток.

Многочисленные исследования культур клеток тиса, проводимые в разных лабораториях мира, показали, что этот объект является одним из наиболее сложных для введения в культуру, оптимизации роста клеток и образования ими таксоидов [8].

В ИФР РАН получен ряд культур клеток разных видов *Taxus* [9], но систематических исследований на предмет содержания таксоидов проведено не было. Также, основываясь на данных анализа ростовых характеристик некоторых линий суспензионной культуры *Taxus baccata*, было сделано заключение о возможности выращивания некоторых из них в биореакторе малого объёма. Однако экспериментально этот вывод проверен не был.

Таким образом, **целью** данной работы явилось проведение сравнительного анализа характера роста и биосинтетических характеристик (накопление таксоидов) суспензионной культуры *Taxus baccata* при выращивании в различных экспериментальных системах (колбы, барботажный биореактор).

**Условия эксперимента.** В качестве объектов исследования использовали штамм суспензионной культуры клеток *Taxus baccata*. Исходная каллусная культура *T. baccata* была получена научными сотрудниками лаборатории физиологии культивируемых клеток ИФР РАН Е. Б. Глобой и Е. В. Демидовой в 2008 году из отрезков побегов (2–4 см) женского растения *T. baccata*, произрастающего в Ботаническом саду Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова. Используемая в работе линия суспензионной культуры клеток была получена научными сотрудниками лаборатории физиологии культивируемых клеток ИФР РАН Е. Б. Глобой и Н. Д. Черняк в 2009 году из каллусных культур клеток *T. baccata* [9].

В работе использовали линию 107ПВП, которую выращивали на среде с минеральной основой по Гамборгу (B5) [10], витаминами по Стаба, 500 мг/л гидролизата казеина, 80 мг/л инозита, 1 г/л поливинилпирролидона (ПВП, молекулярная масса 4000), 30 г/л сахарозы, 2 мг/л пиклорама и 0,3 мг/л БАП.

*Условия выращивания культуры.* Для выращивания суспензионной культуры клеток в колбах на круговой качалке использовали колбы объёмом 100 мл (20–25 мл суспензии в колбе). При пересеве на 1 объём инокулюма вносили 3 части свежей среды (на 15 мл среды 5 мл культуры). Продолжительность цикла субкультивирования составляла 3–4 недели. Культивирование проводили в темноте при температуре 26–27°C, влажности 70–75 % и частоте оборотов качалки 80–100 об/мин.

Для аппаратного выращивания использовали барботажный конический биореактор (разработка Отдела биологии клетки и биотехнологии РАН); общий объём 2,0 л; рабочий объём 1,5 л; точечное аэрирующее устройство.

Аппаратное культивирование проводили в полупроточном режиме объёмно-доливным способом при начальной плотности инокулята около 2,0 г/л по сухой биомассе клеток. При этом в фазу максимального накопления биомассы клеток в единице объёма суспензии (по сухому весу) производили отлив суспензии и добавляли свежую питательную среду.

В зависимости от фазы ростового цикла расход воздуха на барботаж составлял 0,1–1,0 л/л/мин. Концентрацию растворённого кислорода  $pO_2$  поддерживали на уровне 10–40 % от насыщения. Температуру суспензии в аппарате поддерживали на уровне  $26 \pm 0,5^\circ C$ .

*Анализ ростовых характеристик культур клеток* проводили по общепринятым методикам [11]. Определяли жизнеспособность клеток, содержание сухой и сырой биомассы в литре среды и концентрацию клеток в среде. Индекс роста (I),

удельную скорость роста в экспоненциальной фазе ( $\mu$ ), время удвоения ( $\tau$ ) и продуктивность культуры по сухой биомассе рассчитывали согласно общепринятым методикам [11].

На графиках и таблицах представлены средние арифметические значения ростовых параметров из 3–4 биологических повторностей (3–4 колбы) для каждого срока, цикла выращивания и варианта. Если не отражено на графике, то стандартные отклонения не превышали 10 % от величин средних значений.

*Экстракция и подготовка проб для ВЭЖХ-анализа таксоидов.* Пробы сухой биомассы экстрагировали 96 % этанолом (соотношение биомасса : экстрагент – 1:10) под действием ультразвука в (УЗВ «Сапфир», Россия), в течение 20 минут. Затем экстракты упаривали под вакуумом. Полученный сухой экстракт растворяли в 10 мл дистиллированной воды и наносили (по 5 мл) на патрон для твердофазной экстракции Superclean ENVI – 18 SPE (США). Патрон промывали 2 мл воды, аналиты смывали 2 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом, растворяли в 1 мл метанола и центрифугировали (11000 об/мин, 10 минут). Супернатант фильтровали с помощью тefлоновых микрофильтров ACRODISC PALL (США) с порами 0,2 мкм и использовали для ВЭЖХ-анализа.

*Условия ВЭЖХ-анализа таксоидов.* Разделение таксоидов проводили на приборе «Adgilent» серии 1200 (США), оснащённом диодноматричным детектором и колонкой Lichrosorb RP-18 (4,6x250 мм, 5 мкм). В качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил (А) и деионизированную воду (Б), полученную с помощью установки Water Pro PS (США). Элюирование осуществляли в градиентном режиме (% А): 0–7 мин. – 40 %, 7–17 мин. – 40–45 %, 45–50 мин. – 45 %. Скорость потока 0,5 мл/мин, температура колонки 25°C. Детектирование проводили при длине волны 227 нм. Спектры снима-

лись в диапазоне 190–450 нм. В качестве стандартов использовали баккатин III и паклитаксел фирмы Merck (Германия).

**Результаты и обсуждение.** В начале исследования была проведена цитологическая характеристика культуры клеток *Taxus baccata* линии 107ПВП, в результате которой было установлено, что изучаемая культура представляет собой мелкоагрегированную суспензию клеток светло-жёлтого цвета. Агрегаты состоят из меристемоподобных и паренхимоподобных клеток, преимущественно округлой формы, количеством от 10 до 50 клеток. Клетки оводнённые.

Следующим этапом работы явилось изучение ростовых характеристик *T. baccata* линии 107ПВП при культивировании в колбах на качалке в стандартных условиях, исследовали особенности динамики накопления биомассы клеток. Полученные результаты представлены на рис. 1 и 2 (А) в виде соответствующих графиков

в линейной и полулогарифмической системах координат. Кроме того, были рассчитаны индекс роста (I), удельная скорость роста ( $\mu$ ), продуктивность по биомассе клеток, представленные в табл. 1.

Как следует из представленных результатов, жизнеспособность клеток сохранялась на уровне 93–95 % в начале цикла культивирования и несколько снижалась к концу выращивания (до 82–83 %). Максимальное накопление биомассы клеток по сухому весу наблюдали на 24–27 сутки – 8,3 г/л.

Для исследуемой линии следует отметить наличие «ступеньки» в период 9–11-х суток (рис. 1 и 2(А)). Возможно, это связано с наличием двух субпопуляций клеток в культуре, либо с особенностью утилизации сахарозы – её расщеплением в среде с дальнейшим последовательным потреблением глюкозы и фруктозы. Аналогичный факт был описан для культуры клеток женьшеня [12].

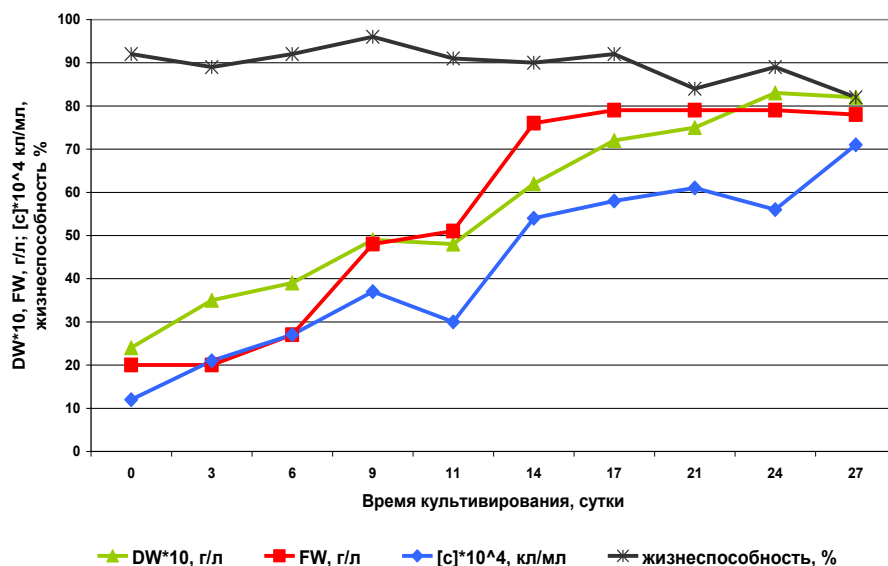


Рис 1. Динамика изменения ростовых характеристик и уровня жизнеспособности суспензионной культуры клеток *T. baccata* линия 107ПВП при выращивании в колбах (где DW – масса сухих клеток, г/л; FW – масса сырых клеток, г/л, с – число клеток)

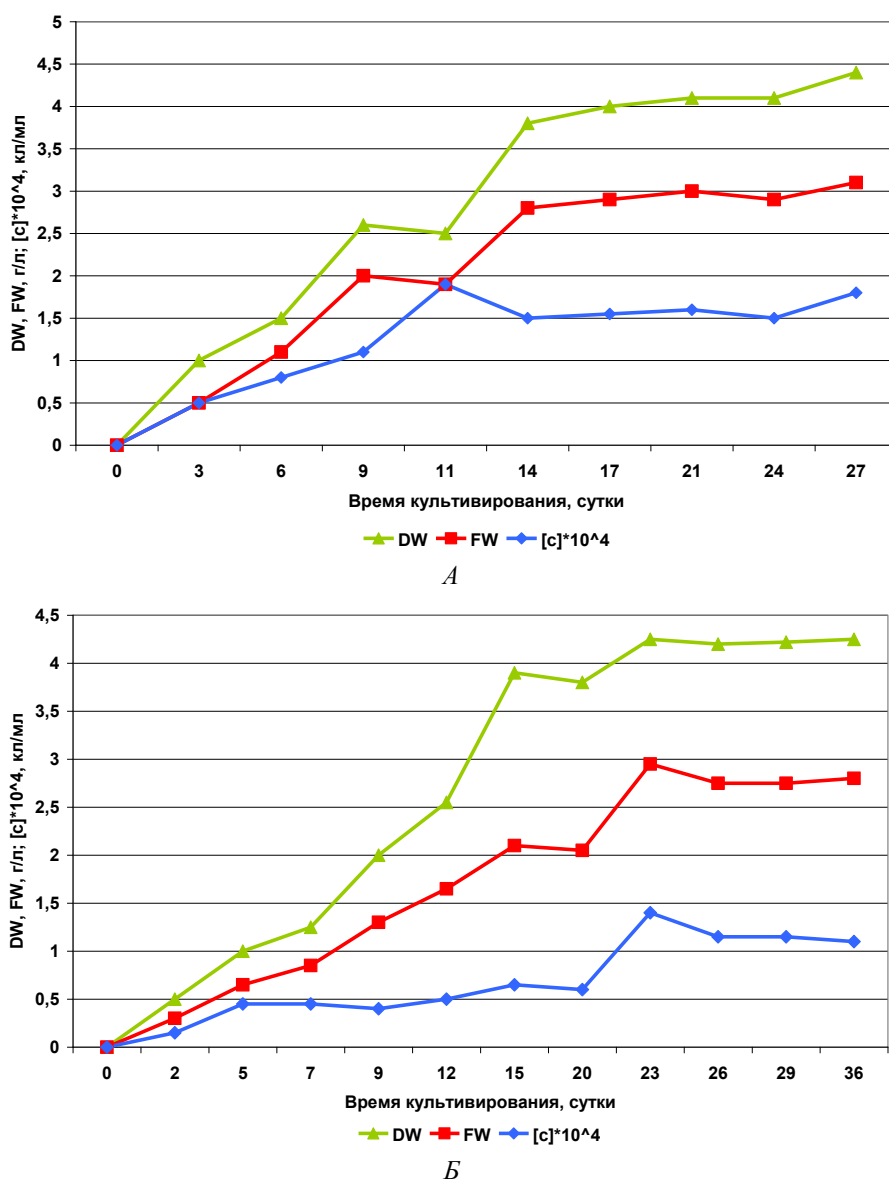


Рис. 2. Динамика изменения числа клеток и биомассы суспензионной культуры клеток *T. baccata* линия 107ПВП при выращивании в колбах (А) и биореакторе (Б), в полулогарифмической системе координат

Как следует из результатов, представленных в табл. 1, исследуемая культура клеток имеет удовлетворительные ростовые характеристики, из особенностей которых можно отметить от-

сутствие значительных различий удельной скорости роста, рассчитанной по разным критериям, что может свидетельствовать о сбалансированности роста культуры.

Таблица 1

**Характеристики роста культуры *T. baccata* линия 107ПВП при выращивании в колбах**

Критерий роста	<i>I</i>	$\mu$	$\tau$	<i>Y</i>	<i>P</i>
Сухая масса клеток	3,53	0,08	8,70	0,20	0,22
Сырая масса клеток	4,02	0,09	7,35		
Число клеток	5,87	0,09	7,48		

**Примечание:** *I* – индекс роста;  $\mu$  – удельная скорость роста, сут<sup>-1</sup>;  $\tau$  – время удвоения, сут.; *Y* – экономический коэффициент; *P* – продуктивность по биомассе клеток, г/л в сутки

Для оценки возможности аппаратного культивирования проводили полупроточное выращивание суспензионной культуры *Taxus baccata* линии 107ПВП в коническом барботажном биореакторе. Кривая роста первого цикла субкультивирования в логарифмической системе координат представлена на рис. 2(Б).

При анализе полученных результатов можно отметить отсутствие лаг-фазы по всем трём исследуемым параметрам, наличие «ступеньки» не наблюдали. Фаза деградации не наступала даже после 36-и суток культивирования.

Для исследуемой линии было проведено пять циклов аппаратного выращивания в режиме полупроточного культивирования, продолжительность циклов субкультивирования варьировала в пре-

делах 14 – 36 суток, общая продолжительность выращивания составила 109 суток. Процесс «отлива суспензии – долива среды» проводили при достижении плотности суспензии, соответствующей началу фазы замедления роста. Разбавление средой в каждом цикле субкультивирования проводили до концентрации биомассы, исключающей появление лаг-фазы.

Полученные кривые роста представлены на рис. 3, основные ростовые характеристики – в сводной табл. 2.

Жизнеспособность клеток в течение всего периода выращивания сохранялась на уровне 80–93 %, максимальное накопление биомассы клеток по сухому весу в конце каждого из циклов субкультивирования достигало 12–16 г/л.

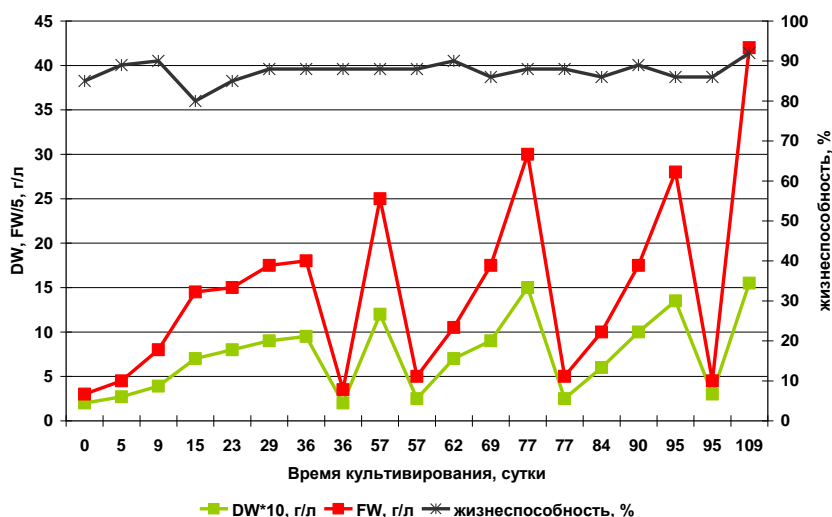


Рис 3. Динамика изменения ростовых характеристик и уровня жизнеспособности суспензионной культуры *T. baccata* линия 107ПВП при выращивании в биореакторе

Таблица 2

**Характеристики роста культуры *T. baccata* линия 107ПВП при полупроточном способе культивирования**

Цикл культивирования	I		μ		τ		Y	P
	DW	FW	DW	FW	DW	FW		
1	3,50	4,47	0,09	0,09	7,76	8,15	0,24	0,20
2	5,67	5,91	0,09	0,09	7,67	7,53	0,34	0,49
3	4,91	4,76	0,04	0,07	16,63	10,33	0,41	0,61
4	4,12	3,70	0,09	0,09	7,64	7,64	0,35	0,59
5	4,83	8,07	0,13	0,13	5,51	5,51	0,43	0,93

Примечание: Обозначения см. в табл. 1.

В процессе выращивания не произошло ухудшения ростовых характеристик, наблюдалась адаптация культуры к условиям выращивания в биореакторе.

Показано, что увеличение начальной плотности инокулята до 2,5 г/л по сухой массе клеток может приводить к сокращению продолжительности цикла субкультивирования (почти в два раза), повышению удельной скорости роста и максимального уровня накопления биомассы клеток.

Следует отметить, что при переходе к выращиванию в барботажном биореакторе наблюдали интенсивное пенообразование с образованием «корки» на поверхности суспензии, что, по-видимому, требует проведения дальнейших работ по подбору оптимальных противопенных компонен-

тов, а также по выбору более эффективных аэрирующих устройств.

Из полученных результатов следует, что ростовые показатели исследуемого штамма при аппаратном культивировании соответствуют показателям, полученным ранее при периодическом выращивании в колбах.

Для оценки содержания таксоидов был проведён ВЭЖХ-анализ спиртовых экстрактов из биомассы культуры клеток *T. baccata*, выращенной в колбах и биореакторе, для чего были подобраны условия разделения основных таксоидов (баккатин III и паклитаксел). Профиль элюции смеси стандартов баккатина III и паклитаксела в разработанном режиме ВЭЖХ представлен на рис. 4(А).

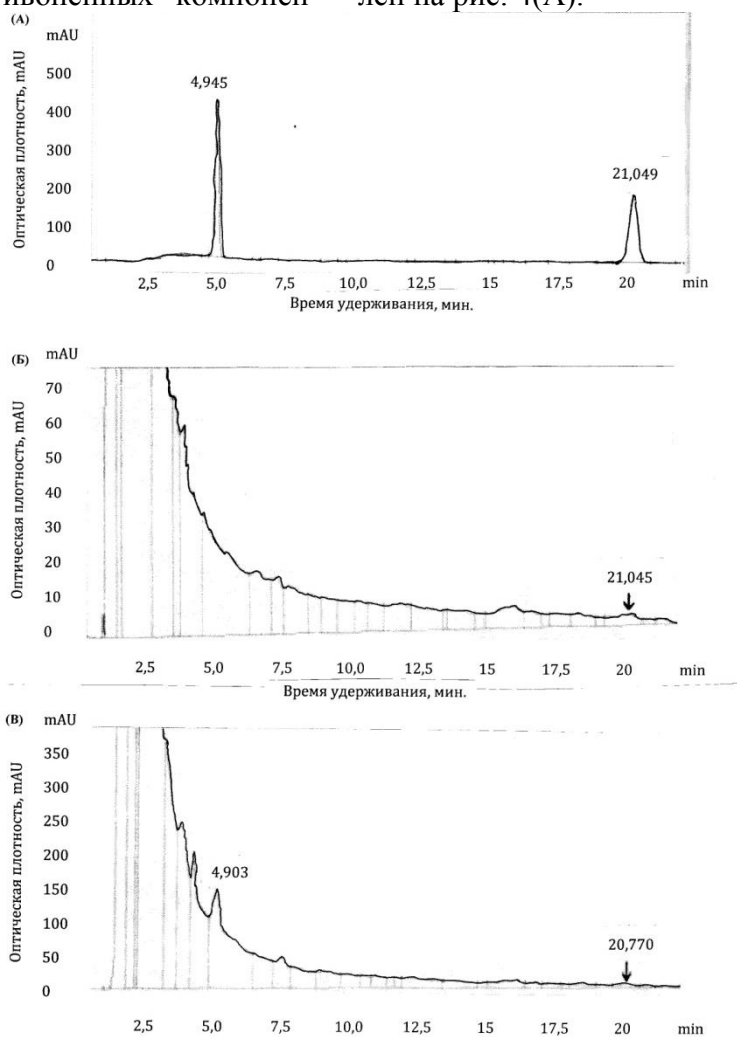


Рис 4. ВЭЖХ-хроматограмма смеси стандартов баккатина III и паклитаксела (А), также экстракта биомассы суспензионной культуры клеток *T. baccata* линия 107 ПВП, выращенной в колбах (Б) и биореакторе (В)

Результаты ВЭЖХ-анализа экстрактов представлены на рис. 4 (Б)–4 (В). Как следует из представленных хроматограмм, анализ показал наличие пика, соответствующего по времени удерживания стандарту паклитаксела: в экстракте из биомассы культуры клеток *T. baccata*, выращенной в колбах, – 21,045 мин.; в биомассе этой культуры, выращенной в биореакторе, – 20,770 мин. Вещество, соответствующее по времени удерживания стандарту баккатина III, было обнаружено только на хроматограмме экстракта культуры клеток *T. baccata*, выращенной в биореакторе (рис. 4 (В), время удержива-

ния 4,903 мин.). Результаты хроматографической идентификации обнаруженных соединений были подтверждены данными УФ-спектров соответствующих им хроматографических пиков. На рис. 5 представлены спектры соединения со временем удерживания 20,770 мин., обнаруженного в биомассе культуры клеток *T. baccata* из биореактора, и стандарта паклитаксела. Совпадение спектров с высокой степенью достоверности свидетельствует об идентичности данных соединений, однако для полного доказательства идентичности необходимы дополнительные исследования (снятие масс- и ЯМР-спектров).

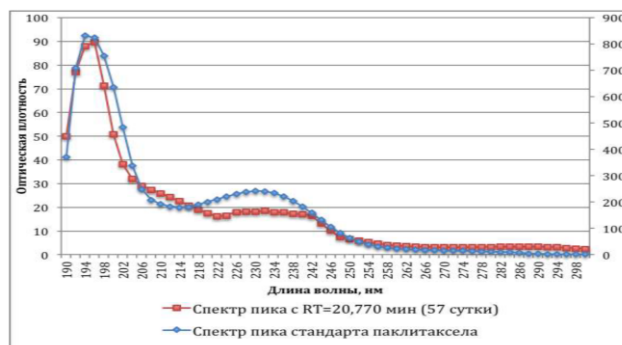


Рис. 5. Спектр поглощения паклитаксела и вещества (близкого к нему по времени удерживания) из биомассы культуры клеток *T. baccata*, выращенной в биореакторе

**Вывод.** Результаты фитохимического анализа свидетельствуют, что суспензионная культура клеток тиса ягодного содержит таксоиды (баккатин III и паклитаксел). Важно, что синтез таксоидов сохраняется при переходе к аппаратному выращиванию данной культуры клеток с использованием барботажного биореактора. Развитие данных работ (масштабирование выращивания, оптимизаций условий образования таксоидов клетками *in vitro*) позволит создать отечественную биотехнологию получения ценных противоопухолевых природных соединений – таксоидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках реализации Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» (государственные контракты № 16.М04.12.0003 и 14.М04.12.0002) и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» (государственный контракт № 16.552.11.7089 от 12 июля 2012 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».

#### Список литературы

1. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // *Phytochem. Rev.* – 2002. – Vol. 1. – Pp. 13–25.
2. Nosov, A.M. Application of Cell Technologies for Production of Plant-Derived Bioactive Substances of Plant Origin / A.M. Nosov // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2012. – Vol. 48, № 7. – Pp. 609–624.
3. Некора, С.В. Способность к каллусогенезу у эксплантов хвои пяти видов рода *Taxus* L. / С.В. Некора, В.П. Комов // *Растительные ресурсы.* – 2001. – Т. 37, Вып. 4. – С. 100–107.
4. Zhong, J.J. Plant cell culture for production of



Paclitaxel and other taxanes / J.J. Zhong // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2002. – Vol. 94, № 6. – Pp. 591-599.

5. Yuangang, Z. Rapid separation of four main taxoids in *Taxus* species by a combined LLP-SPE-HPLC (PAD) procedure / Z. Yuangang, F. Yujie, L. Shuangming // Journal of separation science. – 2006. – Vol. 29. – Pp. 1237-1244.

6. Zhang, B. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model / B. Zhang, A. Maiti, S. Shively // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2005. – Vol. 102. – Pp. 227–31.

7. Malik, S. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures / S. Malik, M. Rosa, B. Cusido // Process Biochemistry. – 2011. – Vol. 46. – Pp. 23–34.

8. Mihaljevi, S. Callus Growth of *Taxus baccata* L. / S. Mihaljevi // Food Technology and Biotechnol-

ogy. – 2002. – Vol. 40 (4). – Pp. 299–303.

9. Глоба, Е.Б. Каллусогенез и получение суспензионных культур клеток четырех видов тиса: *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata* и *T. media*. / Е.Б. Глоба, Е.В. Демидова, В.В. Туркин, С.С. Макарова, А.М. Носов // Биотехнология. – 2009. – Т. 3. – С. 54–59.

10. Бутенко, Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Бутенко Раиса Георгиевна. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

11. Носов, А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений / А.М. Носов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: БИОНОМ, 2011. – С. 386–403.

12. Zhong, J.J. Effects of plant growth regulators on cell-growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium* / J.J. Zhong, Y. Bai, S. J. Wang // Journal of Biotechnology. – 1996. – Vol. 45. – 3. – Pp. 227-234.

Статья поступила в редакцию 28.05.14.

**Ссылка на статью:** Орлова Л. В., Глоба Е. Б., Черняк Н. Д., Демидова Е. В., Титова М. В., Соловченко А. Е., Сергеев Р. В., А. М. Носов. Рост и биосинтетические характеристики суспензионной культуры *Taxus baccata* при выращивании в колбах и биореакторе // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2014. – № 3 (23). – С. 86-97.

#### Информация об авторах

**ОРЛОВА Любовь Васильевна** – студентка, Казанский (Приволжский) Федеральный университет. Область научных интересов – физиология растений, биотехнология. Автор трёх публикаций. E-mail: love@orloffv.ru

**ГЛОБА Елена Борисовна** – научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – физиология растений, биотехнология. Автор 10 публикаций. E-mail: el\_globo@mail.ru

**ЧЕРНЯК Наталья Даниловна** – старший научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – физиология растений, биотехнология. Автор 30 публикаций

**ДЕМИДОВА Елена Викторовна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – физиология растений, биотехнология. Автор 12 публикаций. E-mail: donzdonz@qip.ru

**ТИТОВА Мария Владимировна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – физиология растений, биотехнология. Автор 25 публикаций. E-mail: titomirez@mail.ru

**СОЛОВЧЕНКО Алексей Евгеньевич** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии биологического факультета, МГУ имени М.В. Ломоносова. Область научных интересов – биоинженерия, биотехнология. Автор более 100 научных публикаций. E-mail: wundy@mail.ru

**СЕРГЕЕВ Роман Владимирович** – кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – биотехнология. Автор более 20 публикаций. E-mail: sergeyevrv@volgatech.net

*НОСОВ Александр Михайлович* – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии растений, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова; зав. отделом биологии клетки и биотехнологии, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – биотехнология. Автор более 100 публикаций. E-mail: amn@ippras.ru

## GROWTH AND BIOARTIFICIAL CHARACTERISTICS OF *TAXUS BACCATA* SUSPENSION CULTURE (CULTIVATION IN FLASKS AND BIOREACTOR)

*L.V. Orlova*<sup>1</sup>, *E.B. Globa*<sup>2</sup>, *N.D. Chernyak*<sup>2</sup>, *E.V. Demidova*<sup>2</sup>, *M.V. Titova*<sup>2</sup>,  
*A.E. Solovchenko*<sup>3</sup>, *R.V. Sergeev*<sup>4</sup>, *A.M. Nosov*<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga region) Federal University,  
18, Kremlevskaya st., 420008, Russian Federation

E-mail: love@orloffv.ru

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev,  
35, Botanicheskaya st., Moscow, 127276, Russian Federation

E-mail: amn@ippras.ru

<sup>3</sup>Moscow State University named after M. V. Lomonosov,  
1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

E-mail: wundy@mail.ru

<sup>4</sup>Volga State University of Technology,  
3, Lenin sq., Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation

E-mail: sergeyevrv@volgatech.net

**Key words:** *plant cell culture in vitro; HPLC; taxol; baccatin III; Taxus baccata.*

*One of the most promising trends of modern phytobiotechnology is the usage of cultures of tissues and cells of higher plants for production of biologically active substances. The plants of Taxus kind are of considerable interest for the researchers as they are a source of anticancer agents. The goal of the research was to carry out a comparative analysis of growth and biosynthetic characteristics of Taxus baccata suspension culture. A strain of suspension cell culture of Taxus baccata was used as the object of research. Initial T. baccata callus culture was obtained in the Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences out from the segments of the female plant shoots of T. baccata. A line of suspension culture cells was obtained in the Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences out from callus cultures of cells of T. baccata. The cycle time of subculturing was 3-4 weeks. A bubble conical bioreactor (2.0 total volume) was used for hardware cultivation. Growth index, specific growth rate, productivity of cells biomass were calculated for the studied cultures. **Results.** It was revealed that the viability of cells was maintained at 93-95 % at the beginning of cultivation cycle and decreased slightly by the end of cultivation (up to 82-83 %). The maximum accumulation of biomass in dry cell weight was observed in 24-27 days (8.3 g / l). The studied line is characterized by a "step" on the 9 – 11th days, which is associated with the presence of two subpopulations of cells in culture or with peculiarities of utilization. No lag phase was found in all the three investigated parameters. Phase degradation did not occur even after the 36th day of cultivation. To assess the content of taxoids, a HPLC analysis of alcohol extracts of biomass cell culture of T. baccata, grown in flasks and bioreactor, which showed a peak corresponding to the retention time of paclitaxel standard, was conducted. The results of the chromatographic identification of the detected compounds were confirmed by the data of UV spectra of the corresponding to them chromatographic peaks. **Conclusion.** Phytochemical analysis results indicate that suspension culture of cells of yew contains the taxoids (paclitaxel and baccatin III). Synthesis of taxoids is remained in terms of passage to the hardware growing of this cell culture using a bubble bioreactor.*

The research was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within realization of Intergovernmental targeted program EvrAzES "Innovative Biotechnologies" (state contracts №16.M04.12.0003 and 14.M04.12.0002) and Federal Targeted Program "Researches and Elaborations in Priority Branches of Development of Research-Technological Complex of Russia 2007-2013" (state contract № 16.552.11.7089 of July 12, 2012) with the use of equipment of CUC "EBEE" of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education "Volga Tech".

## REFERENCES

1. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the Production of Plant Secondary Metabolites. *Phytochem. Rev.* 2002. Vol. 1. Pp. 13–25.
2. Nosov A.M. Application of Cell Technologies for Production of Plant Derived Bioactive Substances of Plant Origin. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2012. Vol. 48, № 7. Pp. 609-624.
3. Nekora S.V., Komov V.P. Sposobnost k kallusogenezu u eksplantov khvoi pyati vidov roda Taxus L. [An Ability for Callusogenesis of Needle Explants of Taxus L]. *Rastitelnye resursy* [Plant Resources]. 2001. Vol. 37, Issue 4. Pp. 100-107.
4. Zhong J.J. Plant Cell Culture for Production of Paclitaxel and Other Taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2002. Vol. 94, № 6. Pp. 591-599.
5. Yuangang Z., Yujie F., Shuangming L. Rapid Separation of Four Main Taxoids in Taxus Species by a Combined LLP-SPE-HPLC (PAD) Procedure. *Journal of Separation Science.* 2006. Vol. 29. Pp. 1237-1244.
6. Zhang B., Maiti A., Shively S. Microtubule-binding Drugs Offset Tau Sequestration by Stabilizing Micro-tubules and Reversing Fast Axonal Transport Deficits in a Tauopathy Model. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 2005. Vol. 102. Pp. 227–31
7. Malik S., Rosa M., Cusido B. Production of the Anticancer Drug Taxol in Taxus Baccata Suspension Cultures. *Process Biochemistry.* 2011. Vol. 46. Pp. 23-34.
8. Mihaljevi S. Callus Growth of Taxus baccata L. *Food Technology and Biotechnology.* 2002. Vol. 40 (4). Pp. 299–303.
9. Globa E.B., Demidova E.V., Turkin V.V., Makarova S.S., Nosov A.M. Kallusogenez i poluchenie suspenzionnykh kultur kletok chetyrekh vidov tissa: *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata* i *T. media*. [Callusogenesis and Obtention of Suspension Cell Culture of Four Kinds of Yew-Tree: *Taxus canadensis*, *T. baccata*, *T. cuspidata* and *T. media*]. *Biotehnologiya* [Biotechnology]. 2009. Vol. 3. Pp. 54–59.
10. Butenko R. G. *Kultura izolirovannykh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy* [Culture of Isolated Tissue and Physiology of Plant Morphogenesis]. Moscow: Nauka, 1964. 272 p.
11. Nosov A.M. Metody otsenki i kharakteristiki rosta kultur kletok vysshikh rasteniy. V kn. Molekulyarno-geneticheskie i biokhimicheskie metody v sovremennoy biologii rasteniy [Assessment Methods and Characteristics of Growth Rate of the Higher Plants Cells in the Book Molecular-Genetic and Biochemical Methods of Modern Biology of Plants]. Moscow: BIONOM. 2011. Pp. 386 – 403.
12. Zhong J.J., Bai Y., Wang S. J. Effects of Plant Growth Regulators on Cell-Growth and Ginsenoside Saponin Production by Suspension Cultures of *Panax quinquefolium*. *Journal of Biotechnology.* 1996. Vol. 45. 3. Pp. 227-234.

The article was received 28.05.14.

**Citation for an article:** Orlova L.V., Globa E.B., Chernyak N.D., Demidova E.V., Titova M.V., Solovchenko A.E., Sergeev R.V., Nosov A.M. Growth and bioartificial characteristics of taxus baccata suspension culture (cultivation in flasks and bioreactor). *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest Ecology. Nature Management.* 2014. No 3(23). Pp. 86-97.

## Information about the authors

*ORLOVA Lubov Vasilyevna* – student, Kazan (Volga region) Federal University. Research interests – plant physiology, biotechnology. The author of 3 publications. E-mail: love@orloffv.ru

*GLOBA Elena Borisovna* – Researcher, Laboratory of Physiology of Cultured Cells, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – plant physiology, biotechnology. The author of 10 publications. E-mail: el\_globa@mail.ru

*CHERNYAK Natalia Danilovna* – Senior Researcher, Laboratory of Physiology of Cultured Cells, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – plant physiology, biotechnology. The author of more than 30 publications. E-mail: not available

*DEMIDOVA Elena Victorovna* – Candidate of Biological Sciences (PhD in Biology), Researcher at the Laboratory of Physiology of Cultured Cells, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – plant physiology, biotechnology. The author of 12 publications. E-mail donzdonz@qip.ru

*TITOVA Maria Vladimirovna* – Candidate of Biological Sciences (PhD in Biology), Researcher at the Laboratory of Physiology of Cultured Cells, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – plant physiology, biotechnology. The author of 25 publications. E-mail: titomirez@mail.ru

*SOLOVCHENKO Alexey Evgeniyevich* – Doctor of Biological Sciences (Sc.D in Biology), Lead researcher at the Chair of Bioengineering at the Biological Faculty of Moscow State University named after M. V. Lomonosov. Research interests – bioengineering, biotechnology. The author of more than 100 publications. E-mail: wundy@mail.ru

*SERGEEV Roman Vladimirovich* – Candidate of Agricultural Sciences, Senior Lecturer at the Chair of Wood Selection, Non-Woody Resources and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – biotechnology. The author of more than 20 publications. E-mail: sergeyevrv@volgatech.net.

*NOSOV Alexander Mikhailovich* – Doctor of Biological Sciences, Professor at the Chair of Plant Physiology, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Head at the Department of Cytobiology and Biotechnology, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – biotechnology. The author of more than 100 publications. E-mail: amn@ippras.ru