
РЕЗЮМЕ ПРОЕКТА

Создание программно-аппаратного комплекса на основе вихревых биореакторов для выращивания стволовых клеток в препаративном количестве



ОГЛАВЛЕНИЕ

- 3** ➤ ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ
- 4** ➤ ПРОБЛЕМА И РЕШЕНИЕ
- 9** ➤ ТЕХНОЛОГИЯ
- 10** ➤ СХЕМА КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ
- 11** ➤ КОНКУРИРУЮЩИЕ РЕШЕНИЯ
- 16** ➤ ПАРАМЕТРЫ РЫНКА
- 17** ➤ КОМАНДА
- 23** ➤ РЕСУРСЫ
- 24** ➤ ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ
- 27** ➤ СВЕДЕНИЯ О ЮРИДИЧЕСКОМ ЛИЦЕ (заявителем по предварительной экспертизе не заполняются)
- 28** ➤ ПРИЛОЖЕНИЕ К ОПИСАНИЮ ТЕХНОЛОГИИ

1. Название проекта

Создание программно-аппаратного комплекса на основе вихревых биореакторов для выращивания стволовых клеток в препаративном количестве

2. Наименование (ФИО) Соискателя (Заявителя по предварительной экспертизе)

ООО "Центр Вихревых Технологий"

3. Направление, к которому относится проект

d. Медицинские технологии в области разработки оборудования, лекарственных средств

4. Краткое резюме проекта (5 предложений) с указанием имеющихся наработок и основных целей развития проекта

Коммерциализация запатентованного вихревого биореактора (РСТ/RU 2011/000612) в области персонифицированной медицины, а именно для препаративной наработки собственных стволовых клеток определенного пациента. В настоящее время располагаем действующим прототипом, в котором были успешно суспензионно выращены эмбрионидные тельца из эмбриональных стволовых клеток человека линии hESM03 и на носителях выращена моноклеарная фракция клеток костного мозга донора.

5. Контактное лицо по проекту (лицо, заполнявшее анкету)

a. ФИО	Рамазанов Станислав Юрьевич
b. Телефон	+79851800807
c. E-mail	ramazanovst@mail.ru

6. Опишите проблему, на решение которой направлен проект

а. Описание проблемы

Одним из наиболее перспективных направлений в медицине на сегодняшний день представляется применение недифференцированных стволовых клеток человека для лечения различных заболеваний, при трансплантации, тканевой инженерии, а также в косметологии. Ускоренное развитие исследований, направленных на создание новых лекарственных препаратов с использованием стволовых клеток определяет необходимость создания новых, эффективных аппаратов, обеспечивающих оптимальные условия культивирования чувствительных культур клеток.

Стволовые клетки человека отличаются весьма высокой чувствительностью к любым внешним воздействиям. Этим обуславливается особая сложность решения задачи создания условий, обеспечивающих возможность их выращивания. Существующие способы наработки вышеуказанных клеток трудоемки, сложны, дороги, при этом количество получаемых клеток весьма незначительно. Принципиальным моментом также является то, что препараты на основе клеток в основной массе являются пациент-специфическими, поэтому для персонализированной наработки клеточной биомассы должны быть созданы устройства небольшого объема, но позволяющие строго воспроизводить технологический процесс в соответствии с требованиями GMP.

Огромная потребность в стволовых клетках для лечебных, научно-исследовательских, косметологических и других целей и обуславливает необходимость решения задачи создания эффективных аппаратных комплексов, обеспечивающих их стандартную масштабную наработку. Создание аппаратов для сравнительно недорогой наработки стволовых клеток человека стандартными методами в количествах, достаточных для практического использования, является одной из наиболее актуальных проблем для этого направления медицины.

б. Приведите ссылки на исследования и материалы, подтверждающие актуальность заявленной проблемы

1	
Коментарий	В статье «Полученные из жировой ткани стволовых клеток для регенеративной медицины» группы американских ученых приводится краткий обзор существующих методов получения стволовых клеток. Однако многие важные научные и медицинские вопросы остаются нерешенными. Так в статье затрагивается вопрос развития крупномасштабных производственных методов с соответствующим обеспечением качества и контроля качества для создания клеток. Стволовые клетки могут быть применимы для лечения широкого спектра заболеваний. С течением времени и появлением новых ресурсов, вероятно поставленная цель (масштабирование технологии выращивания стволовых клеток) будет достигнута.
Ссылка	http://circres.ahajournals.org/content/100/9/1249.full

2	
Коментарий	Виды биореакторов и средства управления для промышленного процесса культивирования клеток, автор Джон Харбор (Доктор наук, консультант и руководитель направления создания лекарственных препаратов на основе стволовых клеток в The Cell Therapy Group)
Ссылка	http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00180/BPI_A_121006AR03_O_180097a.pdf
3	
Коментарий	Gerecht-Nir S, Cohen S, Itskovitz Eldor J. Культивирование в биореакторе повышает эффективность формирования и дифференциации эмбрионидных телец человека.
Ссылка	http://www.lbtek.com/lbscience/board/upload/technical/up_technical_5_0.pdf
4	
Коментарий	King JA, Miller WM Разработка биореакторов для культивирования стволовых клеток и контролируемой дифференциации.
Ссылка	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2038982/
5	
Коментарий	Массив микробиореакторов для контроля состояния клеточной среды: принципы построения для культивирования эмбриональных стволовых клеток человека.
Ссылка	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744042/
6	
Коментарий	Трехмерные клеточные культуры на основе чипа в перфузионных микробиореакторах
Ссылка	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583022/
7	
Коментарий	Биореакторы в тканевой инженерии
Ссылка	http://www oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol2/abstracts/korossis_0102.pdf
8	
Коментарий	Бессывороточное выращивание человеческих нейронных клеток-предшественников в биореакторе сохраняет нейрогенетический потенциал
Ссылка	http://neurosurgery.medicine.dal.ca/files/Behie_(2010)_-Biotechnol_Bioeng_(hNPC_Expansion).pdf

7. Как проект решает описанную проблему, и в чем заключается инновационность подхода

Программно-аппаратный комплекс с вихревыми биореакторами способен обеспечить экономически эффективное решение актуальной на сегодняшний день проблемы масштабной стандартизированной наработки стволовых и других аутологических клеток человека.

Инновационность подхода определяется уникальностью принципа перемешивания, заложенного в основу вихревого биореактора, который и обуславливает конкурентные преимущества аппарата:

1. В вихревом биореакторе перемешивание осуществляется воздушным вихрем, без "мешалки", помещенной в жидкость, что позволяет успешно культивировать практически любые типы клеток (в т.ч. гибридные, эмбриональные и т.д.) и микроорганизмы. При этом сведены к минимуму любые воздействия, губительно сказывающиеся на процессе роста и развития особо чувствительных аутологических (в т.ч. стволовых) клеток человека:

3D перемешивание мягкое, но эффективное, обеспечена высокая скорость межфазного массообмена

При перемешивании не образуется высоко турбулентных и застойных зон, исключена возможность гидроударов и эффекта кавитации

2. Процесс вихревого перемешивания решает проблему образования зон локального перегрева – микрозон с повышенной температурой.

В биореакторах с механической мешалкой переход части механической энергии в тепловую происходит в крайних точках лопастей мешалки, где образуются как напряжения среза так и зоны локальных перегревов, губительно сказывающихся на жизнеспособности чувствительных культур клеток.

3. В отличие от традиционных аппаратов механического смешивания и эрлифтных ферментеров, «вихревое» перемешивание обеспечивает:

Высокую скорость массообмена по газовой фазе через границу раздела фаз при отсутствии проблемы повреждения клеток пузырьками воздуха

Перемешивание без образования пены: образующийся газовый вихрь является эффективным пеногасителем

Увеличенный выход целевого продукта посредством создания оптимальных условий для наработки клеток

4. Технологическое решение позволяет биореактору стабильно и эффективно работать при его заполнении в пределах от 10 до 90%.

Гидродинамика биореактора практически не зависит от уровня жидкости в нем, биореактор легко масштабируется.

5. Предлагаемый вихревой биореактор обеспечивает полную воспроизводимость (масштабируемость) результатов лабораторных процессов при внедрении разработок.

8. Опишите основные технологические и рыночные тренды в рассматриваемой отрасли

а. Описание трендов

Современные мировые тенденции развития отрасли банкирования и использования стволовых клеток:

ПРОБЛЕМА И РЕШЕНИЕ

На основании анализа данных организации Bone Marrow Donors Worldwide, среднегеометрический годовой темп прироста числа образцов пуповинной крови в публичных банках в мире за период 1998-2009 г. составил порядка 30%.

В настоящее время клинические испытания проходят порядка 150 препаратов на основе СК, которые направлены на лечение ишемии головного мозга, сердца и нижних конечностей, лечение нейро-дегенеративных заболеваний, лечение цирроза печени и сахарного диабета.

Наиболее коммерчески привлекательными и, следовательно, наиболее разработанными направлениями являются следующие технологии, фактически уже вошедшие в клиническую практику:

1. аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток (костного мозга, пуповинной и мобилизованной периферической крови) в онкогематологии;
2. аутогенная трансплантация хондроцитов при посттравматических повреждениях хряща крупных суставов;
3. трансплантация (аллогенная или ксеногенная) островковых клеток поджелудочной железы при сахарном диабете;
4. трансплантация аутогенных и аллогенных фибробластов для лечения косметических дефектов кожи, трофических язв и ожогов;
5. банкирование стволовых клеток пуповинной крови для аллогенной и аутогенной трансплантации (пока только в онкогематологии, но в перспективе не исключено применение и для терапии негематологических заболеваний).

Персонализированная медицина: клеточная и тканевая терапия:

Отличительной чертой современной медицины становится ее «биологизация», широкое применение подходов, базирующихся на методах молекулярной и клеточной биологии. Клеточные технологии, в том числе клеточная и тканевая инженерия, представляют собой базу регенеративной медицины, предполагающую использование продуктов на основе выращенных вне организма или модифицированных клеток человека. Имеются обоснованные прогнозы о том, что достижения молекулярной медицины смогут полноценно сформировать базис персонализированной медицины будущего, основанной на прогностическом и профилактическом принципах, что позволит раскрыть потенциальные и адаптационные возможности организма и увеличить продолжительность активной жизни населения.

Наработка клеточного материала:

В ближайшем будущем могут потребоваться уникальные аппаратные решения для наработки различных типов клеток.

В особенности это актуально для работы со взрослыми клетками, которые могут потребовать трехмерной (3D) архитектуры, имитирующей ткани и даже целые органы. Специальные конструкции биореакторов могут быть необходимы для ускорения размножения клеток, и дифференциации стволовых клеток в зрелые клетки необходимого типа. Аппаратные решения для наработки различных типов клеток должны быть хорошо адаптированы к персонализированному (мелкомасштабному) культивированию клеток и масштабированию культивирования при необходимости использования аллогенного клеточного материала.

в. Приведите ссылки на соответствующие исследования и материалы

Медицина 4П - http://www.cra.org/ccc/docs/init/P4_Medicine.pdf

http://www.rosminzdrav.ru/health/62/Strategiya_razvitiya_meditsinskoj_nauki.pdf

<http://www.visiongain.com/>

с. Приведите ссылки на наиболее близкие к заявленной Исследовательской деятельности российские и (или) зарубежные патенты, обладателем которых являются третьи лица.

вращательные (ротаторные) системы культивирования клеток (ВСКК), патенты США №№ 5,763,279 и 5,437,998.

9. Приведите описание базовой технологии

Концепция вихревого биореактора – создание структурированного и организованного особым образом воздушного потока для организации интенсивного, но мягкого перемешивания различных жидкостей, в том числе и особо вязких.

Перемешивание культуральной среды в биореакторе осуществляется путем создания в жидкой среде трехмерного движения типа “вращающегося вихревого кольца” (квазистационарный поток с осевым противотоком). Движение генерируется аэрирующим газовым вихрем за счет перепада давления над поверхностью и силы трения воздушного потока о поверхность суспензии. Аэрирующий газовый вихрь формируется установленным над поверхностью среды центробежным активатором, и при помощи специального устройства проецируется в жидкую фазу, обеспечивая мягкое перемешивание суспензии без застойных и турбулентных зон, при высокой скорости межфазного массообмена.

При этом движение суспензии клеток осуществляется без контакта с перемешивающим устройством биореактора в условиях постоянного перемешивания среды, без формирования в ней пузырьков воздуха, с контролируемой диффузией растворенных газов.

В вихревом биореакторе можно выращивать стволовые и другие аутологические клетки человека как суспензионно, так и на носителях в течение длительного времени без смены или со сменой среды.

10. Укажите, при наличии, имеющие непосредственное отношение к проекту российские и (или) зарубежные научные публикации, патенты и (или) заявки на выдачу патента, обладателем (заявителем по которым) является Соискатель, а также разработанные алгоритмы, протоколы, программы для ЭВМ и (или) базы данных, исключительные права на которые принадлежат Вам, или, если они реализованы в рамках открытого кода GPL, то публичные ссылки на них

1	
Номер	РСТ/RU2011/000612
Название	Вихревой биореактор
Ссылка	ссылка будет опубликована по прошествии 18 месяцев со дня подачи (15.08.11)

***.Приложение к описанию технологии**

[СМ. ПРИЛОЖЕНИЕ](#)

11. Опишите предполагаемые основные направления коммерциализации Вашего проекта (в ближайшей перспективе и (или) в будущем)

#	Название	Коментарий
1	Продажа программно-аппаратных комплексов (ПАК)	Компания предполагает самостоятельно вести реализацию ПАК на территории России и ближайшего зарубежья (территория бывшего Советского Союза).
2	Продажа лицензий	Компания будет продавать исключительные и не исключительные лицензии на производство и продажу ПАК в дальнее зарубежье

12. Перечислите наиболее близкие аналоги Вашего решения и опишите, в чем заключается Ваше преимущество

1	
Название	<p>Класс аппаратов с механической мешалкой, погруженной в среду культивирования Примеры: 1. Линейка аппаратов Sartorius Group, особенно BIOSTAT® CultiBag RM 20 optical DH-020LORM-2 http://www.sartorius.com/en/products/bioprocess/bioreactors-fermentors/ 2. Линейка аппаратов CelliGen® BLU от производителя New Brunswick Scientific http://www.nbsc.com/single-use_bioreactor_CelliGen_BLU.aspx 3. Линейка аппаратов FlexFactory XDR от производителя Xcellerex http://www.xcellerex.com/platform-xdr-single-use-bioreactors.htm 4. Optimizer Sys, 500 mL от производителя WHEATON http://wheaton.com/biopharmaceutical/equipment/bioreactors/where/capacity-vol/500/equipment-category/bioreactors/type/cell-optimizer-system.html</p>
Описание	<p>В рамках данного класса присутствует множество производителей с единым способом перемешивания (механическая мешалка в жидкости). Основным принципиальным отличием и преимуществом вихревых биореакторов по отношению к традиционным аппаратам (стальным или одноразовым) является отсутствие недостатков (травмирующего воздействия напряжений среза, зон локальных перегревов, возникающих на концах лопаток перемешивающего устройства, низкого поверхностного массообмена и т.д.), порождаемых присутствием механической мешалки в жидкости. 1. В вихревых биореакторах сведено к минимуму внешнее травмирующее воздействие, губительно сказывающееся на процессе роста и развития особо чувствительных аутологических (в т.ч. стволовых) клеток человека: # Перемешивание мягкое, но эффективное, обеспечена высокая скорость поверхностного межфазного массообмена # Перемешивание производится равномерно, без образования высоко турбулентных и застойных зон # При перемешивании исключена возможность гидроударов и эффекта кавитации 2. Процесс вихревого перемешивания решает проблему образования зон локального перегрева – микронзон с повышенной температурой. В биореакторах с механической мешалкой переход механической энергии в тепловую происходит в крайних точках перемешивающего устройства, здесь же возникают напряжения среза. Суммарное воздействие обоих факторов в этих зонах губительно сказывается на жизнеспособности чувствительных культур клеток . В вихревых биореакторах эта проблема отсутствует.</p>

	<p>3. Низкие энергозатраты на перемешивание жидкости: 0,3 Вт на 1 литр, что в 5-6 раз меньше, чем у биореакторов с механической мешалкой. 4. Технологическое решение позволяет биореактору стабильно и эффективно работать при его заполнении в пределах от 10 до 90%. Гидродинамика биореактора практически не зависит от уровня жидкости в нем, биореактор легко масштабируется.</p>
характеристики рынка (объем, динамика, ссылки на исследования)	Нет информации, на основе которой можно было бы сделать оценку рынка того или иного решения. Рынок только развивается. Общие оценки рынка представлены в п. 19.
2	
Название	Класс аппаратов на основе качения (качалки, волновые реакторы) Примеры: 1. the CELL-tainer от производителя CELLution Biotech http://www.celltainer.com/home.html 2. The AppliFlex Single Use Bioreactor от производителя Applikon Biotechnology http://www.applikon-bio.com/index.php?option=com_content&view=article&id=127&Itemid=225 3. WAVE Bioreactor Systems и Cellbag Bioreactors от производителя General Electric (GE) http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/ru/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure_16875/
Описание	Проблемы этих типов аппаратов, в том , что перемешивание в них , а следовательно и массообмен по как по жидкой так и по газовой фазе происходит хаотично, поэтому невозможно добиться поддержания оптимальных условий для выращивания стволовых клеток. В волновом реакторе при наклоне платформы с емкостью, в конце ее в жидкости происходит образование большого количества газовых пузырьков. В обеспечении такого способа газообмена и массообмена и лежит принцип работы этого типа аппарата. Для культивирования чувствительных и тем болеее стволовых клеток он не пригоден, так как образующиеся пузырьки травмируют чувствительные клетки.
характеристики рынка (объем, динамика, ссылки на исследования)	Нет информации, на основе которой можно было бы сделать оценку рынка того или иного решения. Рынок только развивается. Общие оценки рынка представлены в п. 19.
3	
Название	Класс роторных аппаратов Примеры: 1. The Rotary Cell Culture System (RCCS/ВСКК) от производителя Synthecon, США http://www.synthecon.com/rotary-cell-culture-systems.html
Описание	ВСКК это горизонтально вращающиеся, наполненные жидкостью сосуды, оборудованные мембранно-диффузионной системой обмена газов. Культивирование осуществляется

КОНКУРИРУЮЩИЕ РЕШЕНИЯ

	<p>путем горизонтального вращения биореактора вокруг продольной оси со скоростью 10-20 об/мин в микрогравитационном окружении силой 0.1G Объемы данных аппаратов всего 10мл - 55 мл., что не позволяет говорить о возможности их использования для наработки значительных количеств клеток. Кроме этого при высокой концентрации высева в 1x10⁶ клеток/мл клетки агрегируют в большие сгустки.</p>
характеристики рынка (объем, динамика, ссылки на исследования)	Нет информации, на основе которой можно было бы сделать оценку рынка того или иного решения. Рынок только развивается. Общие оценки рынка представлены в п. 19.
4	
Название	Класс автоматизированных (TAP) систем Пример: 1. CompactSelect, CellBase CT, Cellmate, Ambr от производителя TAP (The Automation Partnership), США http://www.tapbiosystems.com/tap/products/index.htm 2. Cell Culture System от производителя Hamilton http://www.hamiltonrobotics.com/applications/cellomics/?tx_bgmprodbfrontend_pi1%5Brid%5D=116&cHash=f4e8950734&L=6
Описание	Серьезным недостатками систем этого типа является то, что они не могут производить стандартизованные клетки. При реализованном в этих системах роботизированном планшетном (флаконном) способе выращивания стволовых клеток остались все основные его проблемы и недостатки. 1 Практически невозможно создать во всех планшетах (флаконах) идентичные условия культивирования по pH, концентрации клеток, газообмену. 2 Стволовые клетки, контактирующие со стенками флакона, развиваются и дифференцируются иначе, чем в середине флакона и получается набор не стандартизированных клеток разного типа. Преимущества вихревого биореактора 1. В вихревом биореакторе создаются идентичные оптимальные условия по pH, массо,газообмену для всех выращиваемых клеток.
характеристики рынка (объем, динамика, ссылки на исследования)	Нет информации, на основе которой можно было бы сделать оценку рынка того или иного решения. Рынок только развивается. Общие оценки рынка представлены в п. 19.
5	
Название	Класс аэрлифтных аппаратов
Описание	Проблема аэрлифтных аппаратов в том , что пузырьки газовой смеси, используемые для перемешивания жидкости являются травмирующим фактором для чувствительных клеток Пенообразование не позволяет использовать весь объем аппарата, В аэрлифтных биореакторах невозможно

	использовать вязкие культуральные жидкости. Вихревого биореактор лишен этих недостатков аэрлифтного биореактора.
характеристики рынка (объем, динамика, ссылки на исследования)	Нет информации, на основе которой можно было бы сделать оценку рынка того или иного решения. Рынок только развивается. Общие оценки рынка представлены в п. 19.
6	
Название	Класс микрожидкостных аппаратов Пример: 1. ONIX microfluidic perfusion system от производителя CellASCIS, США http://www.cellasic.com/ONIX_Perfusion_sys.html
Описание	Основным элементом микрожидкостных аппаратов для выращивания клеток являются микротрубки, помещенные в стерильную емкость с заданной газовой средой по которым циркулирует культуральная жидкость и на поверхности которых монослоем растут клетки. Есть варианты с обратным подходом, когда внутри трубок растут монослоем клетки. Есть трехмерные матриксы, помещенные в стерильный объем через которые с определенной скоростью продавливается культуральная жидкость, а клетки растут внутри его. Основные проблемы различного типа микрожидкостных аппаратов(трубчатых, матричных и т.д.) в их сложности, сравнительно низкой производительности и высокой цене получаемого продукта. Вихревой биореактор по простоте решения, возможностям, производительности и планируемой цене получаемого продукта значительно превосходит данный тип аппаратов для выращивания клеток.
характеристики рынка (объем, динамика, ссылки на исследования)	Нет информации, на основе которой можно было бы сделать оценку рынка того или иного решения. Рынок только развивается. Общие оценки рынка представлены в п. 19.

13. Перечислите научные группы, институты, компании, ведущие аналогичные или близкие разработки и опишите, в чем заключается Ваше преимущество

Компании ведущие разработки в области создания биореакторов для выращивания стволовых клеток это «Hamilton», «The Automation Partnership» и другие, перечисленные выше в описании аналогов.

Данные компании пытаются решить вопрос создания аппаратов для культивирования стволовых клеток человека путем приспособления (усложнения) традиционных технологических решений (аппараты с механической мешалкой, аппараты качения, планшетные роботизированные TAP системы и т.д.).

Наша группа исследователей кардинально иначе смотрит на процесс создания биореакторов для культивирования стволовых клеток и идет путем упрощения.

1. Основным преимуществом нашей группы исследователей является понимание гидродинамики закрученных потоков жидкости, что позволяет нам создавать аппараты, лишенные недостатков существующих систем, а также со свойствами отсутствующими у других аппаратов.

КОНКУРИРУЮЩИЕ РЕШЕНИЯ

2. Наша группа имеет значительный опыт внедрения аппаратов с вихревым способом перемешивания в различные биотехнологические процессы, как лабораторного, так и промышленного масштабов.
3. Внедрение вихревых биореакторов в различные биотехнологические процессы позволило нам сформировать сеть компетентных партнеров для решения различных задач культивирования.

14. Укажите рынки, на которых потенциально может быть реализован проект (перечислите страны, регионы, укажите основных потребителей, оцените примерный объем рынка, его динамику, ваше будущее позиционирование на нем)

Продукт проекта может быть отнесен к рынку клеточных технологий.

При этом стоит отметить, что данный рынок подразделяется на два мультисегментарных направления. К первому из них относится непосредственно продукт проекта:

А. Рынок получения клеточного материала: методы, технологические (аппаратные) решения и услуги, связанные с наработкой стволовых и др. типов клеток.

Б. Рынок применения клеточных материалов:

1. тестирование лекарств на токсичность и эффективность
2. производство инновационных препаратов на основе стволовых клеток и терапия
3. технологии применения аутологичного (и аллогенного) клеточного материала (например, собственных фибробластов в эстетической медицине, стоматологии);
4. тканевая инженерия

Клеточные технологии в данном случае относятся к разделу регенеративной медицины и предполагают использование клеток (как стволовых, так и дифференцированных) для восстановления утраченных функций организма.

Основные потребители продукта проекта:

Потребителями предлагаемых аппаратных комплексов могут являться компании и организации из следующих сфер:

1. Научные исследования
2. Медицина: клеточная терапия, трансплантация СК, регенеративная медицина
3. Фармацевтика: разработка новых видов препаратов с применением СК
4. Фармацевтика: тестирование новых препаратов на СК

Оценка объема и динамики рынка:

Мировой рынок стволовых клеток (СК) по прогнозу Axis Research Mind достигнет к 2015 году объема в \$ 63,8 млрд. (в 2010г. он оценивался \$ 21,5 млрд.). По данным агентства MarketsandMarkets, объем мирового рынка стволовых клеток к 2014 году составит порядка \$88,3 млрд.

Основными рынками для продукции проекта будут страны и регионы, в которых наиболее активно развиваются клеточные технологии. В области клеточных технологий, (включая их применение для эстетической медицины) лидером являются США, в Европе – Германия, Англия, Италия и Франция, в Азии - Япония, Китай, Сингапур, Корея и Австралия.

15. Приведите ссылки на соответствующие исследования рынков (на русском или английском языках)

<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/stem-cells-market.asp>

http://www.prweb.com/releases/stem_cells_research/adult_embryonic/prweb8137916.htm

<http://www.bccresearch.com/report/stem-cells-global-markets-bio035d.html>

http://www.pipelinerreview.com/store/toc/sample_pages_vg0193.pdf

<http://www.scimitarequity.com/blog/2010/04/20/the-global-stem-cell-market-88-billion-by-2014/>

http://www.prweb.com/releases/stem_cells_research/adult_embryonic/prweb8137916.htm

<http://hsci.ru/home>

16. Ключевые члены команды проекта

1	
а. ФИО	Киселёв Сергей Львович
б. Роль в проекте (должность в компании)	Ученый-Исследователь
с. Описание функций, задач, работ, которые будет выполнять данный член команды проекта в рамках проекта	Разработка техзадания на изготовление ПАК, разработка технологии культивирования стволовых и аутологических клеток в экспериментальных образцах.
д. Сфера деятельности и профессиональные достижения	Научные исследования в области клеточной и молекулярной биологии, преподавание, коммерциализация разработок. Лауреат премии Правительства РФ
е. Ключевой опыт, имеющий отношение к области данного проекта	Культивирование клеток млекопитающих, получение плюрипотентных клеток человека
ф. Образование (ВУЗ, специальность и т.д.), ученая степень, звание	Московский инженерно-физический институт, доктор биологических наук, профессор
г. Места работы, должности за последние 5 лет	Институт общей генетики им. Вавилова РАН- зав. Лабораторией, НИЦ «Курчатовский институт» - руководитель отделения
h. Научные публикации	Amps K et al., Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome20 minimal amplicon conferring growth advantage, Nat Biotechnol. 2011 Nov 27. doi: 10.1038/nbt.2051 Philonenko ES, Shutova MV, Chestkov IV, Lagarkova MA, Kiselev SL., Current progress and potential practical application for human pluripotent stem cells. Intl. Rev. Cell and Mol. Biol., 2011;292:153-96 Shutova M, Chestkov I, Bogomazova A, Lagarkova M, Kiselev S.L., Generation of iPS cells from human umbilical vein endothelial cells by lentiviral transduction, and their differentiation to neuronal lineage. In: Kaiming Ye and Sha Jin (eds.), Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Lineage-Specific Differentiation Protocols, Springer Protocols Handbooks, DOI 10.1007/978-1-61779-267-0_11, © Springer Science+Business Media, LLC 2011 Bogomazova AN, Lagarkova MA, Tskhovrebova LV, Shutova MV, Kiselev SL., Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2. Aging (Albany NY). 2011 Jun;3(6):584-96.
i. Цитируемость (индекс цитируемости, индекс Хирша и тому подобное), доклады	H=15

на международных научных конференциях	
j. При наличии, сведения об объектах интеллектуальной собственности в области выбранного Направления деятельности, включая изобретения, полезные модели, промышленные образцы, алгоритмы и протоколы, программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем, автором (соавтором) которых является член команды	патент № RU2399667 «Способ получения плюрипотентных клеток» патент № RU 2008110210 «Способ получения специализированных клеток из эмбриональных стволовых клеток человека»
2	
а. ФИО	Лагарькова Мария Андреевна
б. Роль в проекте (должность в компании)	Ученый-Исследователь
с. Описание функций, задач, работ, которые будет выполнять данный член команды проекта в рамках проекта	Разработка техзадания на изготовление ПАК, разработка технологии культивирования стволовых и аутологических клеток в экспериментальных образцах.
д. Сфера деятельности и профессиональные достижения	Научные исследования в области клеточной и молекулярной биологии, преподавание.
е. Ключевой опыт, имеющий отношение к области данного проекта	Культивирование клеток млекопитающих, человека, получение плюрипотентных клеток человека
ф. Образование (ВУЗ, специальность и т.д.), ученая степень, звание	Биофак МГУ, доктор биологических наук,
г. Места работы, должности за последние 5 лет	Институт общей генетики им. Вавилова РАН- зав. Лабораторией,
h. Научные публикации	Amps K et al., Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome20 minimal amplicon conferring growth advantage, Nat Biotechnol. 2011 Nov 27. doi: 10.1038/nbt.2051 Philonenko ES, Shutova MV, Chestkov IV, Lagarkova MA, Kiselev SL., Current progress and potential practical application for human pluripotent stem cells. Intl. Rev. Cell and Mol.

	<p>Biol., 2011;292:153-96 Shutova M, Chestkov I, Bogomazova A, Lagarkova M, Kiselev S.L., Generation of iPS cells from human umbilical vein endothelial cells by lentiviral transduction, and their differentiation to neuronal lineage. In: Kaiming Ye and Sha Jin (eds.), Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Lineage-Specific Differentiation Protocols, Springer Protocols Handbooks, DOI 10.1007/978-1-61779-267-0_11, © Springer Science+Business Media, LLC 2011 Bogomazova AN, Lagarkova MA, Tskhovrebova LV, Shutova MV, Kiselev SL., Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2. Aging (Albany NY). 2011 Jun;3(6):584-96.</p>
i. Цитируемость (индекс цитируемости, индекс Хирша и тому подобное), доклады на международных научных конференциях	H=12
j. При наличии, сведения об объектах интеллектуальной собственности в области выбранного Направления деятельности, включая изобретения, полезные модели, промышленные образцы, алгоритмы и протоколы, программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем, автором (соавтором) которых является член команды	патент № RU2399667 «Способ получения плюрипотентных клеток» патент № RU 2008110210 «Способ получения специализированных клеток из эмбриональных стволовых клеток человека»
3	
a. ФИО	Рамазанов Юрий Ахметович
b. Роль в проекте (должность в компании)	Руководитель проекта
c. Описание функций, задач, работ, которые будет выполнять данный член команды проекта в рамках проекта	Руководство проектом, Разработка конструкции вихревого биореактора для выращивания стволовых и аутологических клеток. Коммерциализация.
d. Сфера деятельности и профессиональные достижения	Биотехнология, член правления НП «БИОМАК». 1. Диплом победителя и приз «Надежда» Конкурса русских инноваций, 2004. 2. 1-ое место в Сибирском Федеральном Округе по программе "Старт", Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-

	<p>технической сфере за проект по ферментативному гидролизу, 2004. 3. Золотая медаль в номинации «Оборудование» международной специализированной выставки «Мир биотехнологии», 2005. 4. Диплом и серебряная медаль в номинации «Медицинское оборудование» международной специализированной выставки «Мир биотехнологии», 2006. 5. Диплом и Большая золотая медаль Сибирской Ярмарки «Сибполитех» за создание принципиально нового универсального биотехнологического оборудования, 2006. 6. Диплом и Золотая медаль в номинации «Оборудование» международной специализированной выставки «Мир биотехнологии» за создание пилотной ферментационной установки, 2007. 7. Диплом и Золотая медаль международной специализированной выставки «Мир биотехнологии» за создание вихревого биореактора нового поколения, 2012. 8. Диплом и Золотая медаль 40-й Международной выставки изобретений «INVENTIONS GENEVA» PALEXPO, за вихревой биореактор нового поколения, 2012. 9. Диплом и специальная Золотая медаль "Лучшее изобретение", 40-й Международной выставки изобретений «INVENTIONS GENEVA» PALEXPO, за вихревой биореактор нового поколения, 2012.</p>
<p>е. Ключевой опыт, имеющий отношение к области данного проекта</p>	<p>Автор более 10 патентов в области создания вихревых биореакторов для различных процессов и технологий. Опыт работы по внедрению инновационных разработок составляет более 17 лет. Внедрил вихревые биореакторы и технологии в микробиологическую и биотехнологическую промышленность в России и за рубежом.</p>
<p>ф. Образование (ВУЗ, специальность и т.д.), ученая степень, звание</p>	<p>Сибирский университет потребительской кооперации, инженер</p>
<p>г. Места работы, должности за последние 5 лет</p>	<p>Директор по науке ЗАО «Саяны», директор ООО «Центр Вихревых Технологий»</p>
<p>h. Научные публикации</p>	<p>Журнал «Биотехнология.» - 2000г. – № 4. – С. 72–79. «Вихревой биореактор «БИОК». Опыт культивирования штамма E-coli BL 21(DE3) pZZSA, продуцирующего рекомбинантный ангиогенин человека» Авторы: Кислых В.И., Рамазанов Ю.А., Майстренко В.Ф., Мертвецов Н.П. Журнал «Биотехнология.» - 2001г. – № 3. – С. 85–92. «Наработка препаративных количеств рекомбинантной ДНК, обладающей ангиогенным эффектом, в вихревом биореакторе «БИОК». Авторы: Мертвецов Н.П., Тарантул В.З., Рамазанов Ю.А., Дударев А.Н. и др. Монография «Газовихревые биореакторы «БИОК». Использование в современной биотехнологии». // Новосибирск: Наука, 2002г. – 117 с. Авторы: Мертвецов Н.П, Рамазанов Ю.А., Репков А.П., Дударев А.Н., Кислых В.И. Биотехнология. Учебное пособие</p>

	<p>под ред. академика РАСХН Е.С.Воронина. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2005г. – Безградиентные газо-вихревые биореакторы. Использование в современной биотехнологии. Журнал «New Aspects of Biotechnology and Medicine» Editors: Alexei M. Egorov (M.V. Lomonosov Moscow State Univ., Russia) and Gennady E. Zaikov (Russian Academy of Sciences, Russia) Pub. Date: 2007r ISBN: 1-60021-465-7 «Industrial production of vaccines using embryonic cells in gas-vortex gradientless bioreactors»; pp. 87-91 (Yu. A. Ramazanov, V.I. Kislykh, I.P. Kosyuk, N.V. Bakuleva, V.V. Shchurikhina) Журнал «Наука в России» издательство РАН -2007 №2 «Рожденные...в газовом вихре» стр. 15-19</p>
i. Цитируемость (индекс цитируемости, индекс Хирша и тому подобное), доклады на международных научных конференциях	<p>Доклады на 2,3,4 съездах Общества биотехнологов России, 3,4 Московских международных конгрессах "Биотехнология: состояние и перспективы развития.", 2-й международном конгрессе "Eurasiabio"</p>
j. При наличии, сведения об объектах интеллектуальной собственности в области выбранного направления деятельности, включая изобретения, полезные модели, промышленные образцы, алгоритмы и протоколы, программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем, автором (соавтором) которых является член команды	<p>Патент №2099413 «Аппарат для суспензионного культивирования клеток тканей или микроорганизмов», патент №2299903 «Биореактор», патент №2355751 «Вихревой реактор для проведения биотехнологических процессов в условиях микрогравитации», РСТ/RUNо2008/000683 «Биореактор и способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов с его использованием», РСТ/RU №2011/000612 «Вихревой биореактор».</p>
4	
a. ФИО	Репков Андрей Петрович
b. Роль в проекте (должность в компании)	Главный конструктор
c. Описание функций, задач, работ, которые будет выполнять данный член команды проекта в рамках проекта	<p>Разработка конструкции и технических чертежей вихревого биореактора для выращивания стволовых и аутологических клеток. Размещение заказа на изготовление, технический контроль за исполнением, подготовка документации на сертификацию.</p>
d. Сфера деятельности и профессиональные достижения	<p>Разработка и конструирование аппаратов с вихревым способом перемешивания, награжден знаком «Изобретатель СССР»</p>

е. Ключевой опыт, имеющий отношение к области данного проекта	Опыт конструкторской работы с различными модификациями вихревых аппаратов более 20 лет, автор более 10 патентов в области создания вихревых аппаратов для различных процессов и технологий.
ф. Образование (ВУЗ, специальность и т.д.), ученая степень, звание	Новосибирский государственный технический университет, инженер
г. Места работы, должности за последние 5 лет	Гл. конструктор ЗАО «Саяны», гл конструктор ООО «Центр Вихревых Технологий».
h. Научные публикации	Монография «Газовихревые биореакторы «БИОК». Использование в современной биотехнологии». // Новосибирск: Наука, 2002г. – 117 с. Авторы: Мертвецов Н.П., Рамазанов Ю.А., Репков А.П., Дударев А.Н., Кислых В.И.
і. Цитируемость (индекс цитируемости, индекс Хирша и тому подобное), доклады на международных научных конференциях	нет
ј. При наличии, сведения об объектах интеллектуальной собственности в области выбранного Направления деятельности, включая изобретения, полезные модели, промышленные образцы, алгоритмы и протоколы, программы для ЭВМ, базы данных, топологии интегральных микросхем, автором (соавтором) которых является член команды	Патент №2099413 «Аппарат для суспензионного культивирования клеток тканей или микроорганизмов», патент №2299903 «Биореактор», патент №2355751 «Вихревой реактор для проведения биотехнологических процессов в условиях микрогравитации», PCT/RUNo2008/000683 «Биореактор и способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов с его использованием», PCT/RU №2011/000612 «Вихревой биореактор».

17. История и динамика развития проекта

Специалисты ООО «ЦВТ» являются авторами создания вихревого способа перемешивания и вихревых биореакторов различных конструкций и модификаций для различных биотехнологических процессов. Эти аппараты отмечены золотыми и серебряными медалями международных биотехнологических выставок.

Одно из основных успешно реализованных направлений-это создание вихревых биореакторов для выращивания клеток и микроорганизмов. В вихревых биореакторах выращиваются различные чувствительные клетки для производства вакцин.

Понимание особенностей процесса культивирования особо чувствительных клеток и создания необходимых условий для этого позволили заявителям создать прототип вихревого биореактора для культивирования стволовых клеток.

Первая попытка вырастить чувствительные клетки в прототипе вихревого биореактора увенчалась успехом: команда разработчиков осознала принципиальную возможность реализации задуманного. Было принято решение о начале активной работы по данному направлению.

В России одна из самых продвинутых в «клеточном» вопросе научных команд - команда руководителя лаборатории генетических основ клеточных технологий Института общей генетики РАН Сергея Киселева и Марии Лагарьковой. В нашем аппарате эта команда успешно провела культивирование эмбриональных стволовых клеток человека линии hESM03

Были выращены эмбрионидные тельца, в которых содержатся разные типы клеток, включая плюрипотентные . Кроме того, была выращена на носителях моноклеарная фракция клеток человека, выделенных из костного мозга донора

18. Получали ли Вы и (или) члены команды проекта гранты на данную или схожую тематику? (даты, суммы, характер проектов, полученные результаты)

нет

19. Привлекалось ли венчурное и (или) иное финансирование? (инвесторы, суммы, результаты)

нет

20. Участвует ли проект в программах других институтов развития (если да, то указать название института развития. К институтам развития, например, относятся Роснано, РВК, Внешэкономбанк, ММВБ, Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, Агентство стратегических инициатив, Российская ассоциация прямого и венчурного инвестирования, Росмолодежь, ММВБ, «ОПОРА России»)

нет

21. Укажите текущий статус проекта (какие результаты уже достигнуты и чем они подтверждены)

1. Проведены теоретические и экспериментальные работы по исследованию гидродинамики и процессов тепло-массопереноса при вихревых движениях жидкостей. Результат – создан способ суспензионного культивирования клеток и микроорганизмов и вихревой биореактор для его реализации.
2. Успешно внедрены лабораторные и промышленные вихревые биореакторы первого поколения: Московский Государственный Университет, Институт особо чистых биологических препаратов РАН, ГОУ ВПО "Вятский Государственный Университет", Волжский Политехнический Институт, Научно-исследовательский сельскохозяйственный институт (Казахстан), НИИ «Коллекция культур микроорганизмов», Марийский Государственный технический Университет, Астраханский Государственный Университет, Томский Государственный Университет, ФГУП «Армавирская биофабрика», УП "Витебская биофабрика", НПО «Вирион», НПО «Медбиофарм» и др.
3. Накоплен опыт культивирования различных культур клеток в вихревых биореакторах в том числе и наиболее чувствительных. В опытном варианте (объемом 1л) модификации вихревого биореактора "личный доктор" успешно выращены эмбрионидные тельца из эмбриональных стволовых клеток человека линии hESM03, а также выращена на носителях моноклеарная фракция клеток человека, выделенных из костного мозга.
4. Экспериментально подтверждена техническая возможность успешного культивирования эмбриональных, стволовых клеток человека в вихревом биореакторе.

Вихревой биореактор награжден золотой медалью X Международной выставки «Мир Биотехнологии 2012».

На 40-й Международной выставке изобретений «INVENTIONS GENEVA» PALEXPO, г.Женева вихревой биореактор был отмечен двумя золотыми медалями, в том числе специальной золотой медалью "Best invention award".

22. Опишите ключевые цели проекта (не более 3-х) и ориентировочный срок их достижения

#	Цель и сроки
1	Разработка программно-аппаратного комплекса для масштабной наработки стволовых и аутологичных клеток на основе вихревого принципа перемешивания к 2015 году
2	Отработать протокол культивирования стволовых клеток к 2015 году
3	Продажа лицензий на производство в 2015

в. Обобщенный план последующего развития (до достижения коммерческого результата)

Компания предполагает приступить к коммерческой продаже комплексов и лицензий на их изготовление после отработки протокола культивирования стволовых клеток в конце 2014 начале 2015 годов.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

ДОРОЖНАЯ КАРТА	2013			
	I квартал	II квартал	III квартал	IV квартал
Исследования и разработки	Разработка технического задания			
Создание продукта		Подготовка конструкторской документации на изготовление	Изготовление опытного образца	Изготовление опытного образца Экспериментальные работы по подбору носителей для культивирования стволовых клеток
Общее организационное развитие и план по найму				
Защита интеллектуальной собственности и лицензирование				
Маркетинг, внедрение, продвижение				
Привлечение инвестиций и продажи				

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

ДОРОЖНАЯ КАРТА	2014			
	I квартал	II квартал	III квартал	IV квартал
Исследования и разработки			Отработка технологии культивирования стволовых клеток в программно-аппаратном комплексе	
Создание продукта	Рабочие испытания	Рабочие испытания		
Общее организационное развитие и план по найму				
Защита интеллектуальной собственности и лицензирование		Сертификация		
Маркетинг, внедрение, продвижение				
Привлечение инвестиций и продажи				

СВЕДЕНИЯ О ЮРИДИЧЕСКОМ ЛИЦЕ (заявителем по предварительной экспертизе не заполняются)

24. Название юридического лица

ООО "Центр Вихревых Технологий"

25. Контактный телефон

+ 7(383) 2145285

26. Почтовый адрес

630559, НСО, Новосибирский район наукоград Кольцово, ул. Технопарковая, д.1

27. Web-сайт

<http://vortexreactor.com/>

28. Основной государственный регистрационный номер (ОГРН) юридического лица

1085475003041

29. Индивидуальный номер налогоплательщика (ИНН) юридического лица

5433173482

***.Приложение к описанию технологии**

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И БИОФИЗИКИ

ГАЗО-ВИХРЕВЫЕ БИОРЕАКТОРЫ "БИОК".
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СОВРЕМЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ

Н.П. Мертвцов, Ю.А. Рамазанов, А.П. Репков, А.Н. Дударев, В.И. Кислых

Оглавление

1	Введение.....	2
2	Биореакторы в современной микробиологии и биотехнологии (сравнительный аспект).....	2
3	Газовихревые биореакторы "БИОК". Теория и практика, теоретическое обоснование процесса ферментации и практическая реализация установки.....	7
3.1	Теоретические предпосылки использования вращающихся потоков при суспензионном культивировании.....	7
3.2	Расход энергии на перемешивание.....	11
3.3	Способ и устройство для суспензионного культивирования клеток при газо-вихревом перемешивании.....	12
3.4	Инженерное решение привода биореактора с газо-вихревым перемешиванием.....	13
4	Использование газо-вихревых биореакторов "БИОК" в клеточной биологии:.....	15
4.1	Культивирование клеток млекопитающих.....	15

1 Введение.

Бурное развитие биотехнологии, направленной на промышленное получение биологически активных веществ путем микробиологического синтеза, диктует необходимость создания новых, более эффективных аппаратов микробиологического синтеза – биореакторов нового поколения. Одним из перспективных направлений является разработка биореакторов на основе газо-вихревой технологии. Преимуществами таких аппаратов являются их высокая экономичность, щадящие (мягкие) условия культивирования клеток и микроорганизмов, оптимальные условия аэрации и высокая продуктивность культивирования, относительная простота стерилизации и эксплуатации аппаратов.

Газо-вихревой биореактор полнофункционален: он позволяет работать с бактериальными штаммами-продуцентами биологически активных пептидов, нарабатывать препаративные количества рекомбинантных ДНК, содержащих клонированные гены млекопитающих и человека, получать культуры клеток млекопитающих и растений в препаративных количествах. Особенно ценной является возможность конструирования на основе таких биореакторов линий биотехнологического минибиопроизводства, обладающих экономичностью и высокой эффективностью. Ниже излагаются примеры функционирования газо-вихревых биореакторов, представлены результаты биотехнологических экспериментов и обсуждаются перспективы производственного использования аппаратов «БИОК».

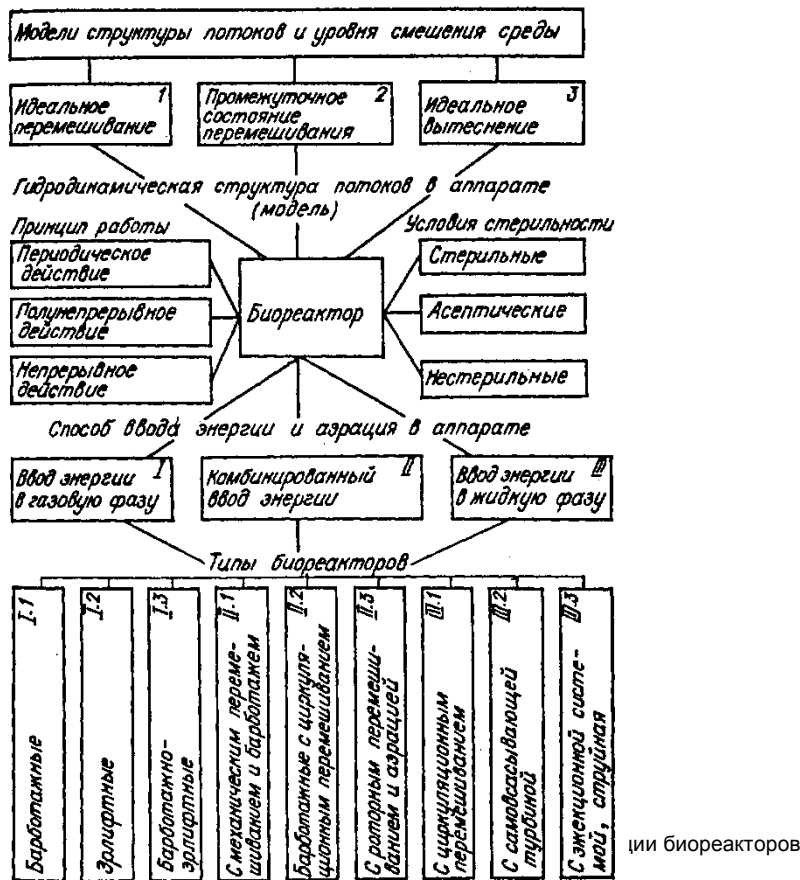
2 Биореакторы в современной микробиологии и биотехнологии (сравнительный аспект).

Назначением биореактора в биотехнологическом процессе, вне зависимости от конструкции и вместимости, является - обеспечить жёстко контролируемые условия, в которых ведётся наращивание биомассы или идёт биохимическая трансформация. Микробные клетки могут выдерживать энергичное перемешивание и аэрацию. Животные и растительные клетки более хрупки и чувствительны к механическим воздействиям, вне зависимости от способа культивирования: суспензионного или в иммобилизованном состоянии.

В биореакторе находится гетерогенная система компонентов, состоящая из суспензии клеток и газа. В такой системе должны быть обеспечены способы переноса тепла и массы между фазами с целью создания оптимальных условий для роста клеток и биосинтеза целевого продукта, при соблюдении условий стерильности и экономичности процесса. Особую сложность представляет поддержание асептических условий в ферментере. Наличие механических перемешивающих устройств с сальниковыми или торцевыми уплотнениями затрудняет решение этой задачи

Другим специфичным для процессов микробиологического синтеза вопросом является интенсивное пенообразование сопровождающее процесс ферментации. Разработаны различные пути решения этого вопроса, в том числе: применение химических пеногасителей; применение механического пеногашения; комбинированные способы и технологические приемы. В ферментационных установках наиболее предпочтительно использовать принцип механического пеногашения, что позволяет не изменять физико-химические свойства ферментационной среды, а следовательно, не влиять на кинетические и диффузионные процессы в ферментере и последующую технологию выделения целевого продукта

С увеличением мощностей предприятий микробиологической промышленности, а также с расширением ассортимента получаемых микробиологическим синтезом веществ большое разнообразие имеют конструктивное оформление и принцип работы промышленных биореакторов. Применяемые на практике для крупнотоннажных производств биореакторы характеризуются большим геометрическим объемом, что связано с относительно невысокой удельной производительностью процессов ферментации по целевому продукту при больших мощностях предприятия в целом. В этих условиях характерно проявление неидеальных по объему аппарата условий перемешивания среды, различие массообменных характеристик по зонам аппарата, тепловая и диффузионная неравномерность. Как правило, в аппаратах такого объема не удается достичь равномерного распределения вкладываемой энергии, что приводит к повышенным энергозатратам на получение целевого продукта. С другой стороны, наличие слабоперемешиваемых застойных зон отрицательно сказывается на протекании микробиологического процесса, приводит к инфицированию культуры, снижению активности микробных клеток. Этими причинами объясняется большое разнообразие рекомендуемых промышленных биореакторов, отличающихся как конструктивно, так и по принципу работы.



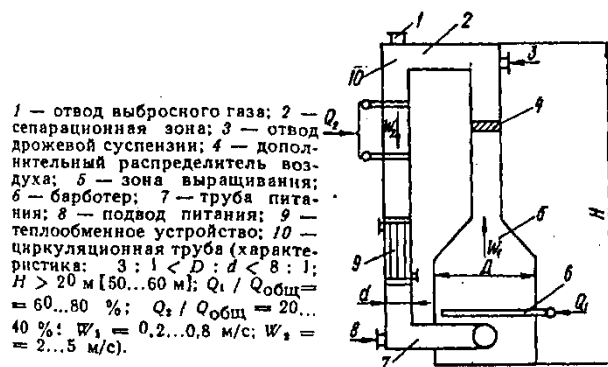
Примерная схема классификации многочисленных типов биореакторов представлена на рис. 1.

Как следует из рис. 1, конструктивные различия биореакторов определяются в основном способом ввода энергии и аэрирующей среды.

К 1-ой группе относятся широко распространенные в микробиологической промышленности барботажные и эрлифтные ферментеры. Перемешивание и аэрация среды в них происходит за счет хорошо организованной эрлифтной циркуляции жидкости. Примерами ферментеров, работающих по такому принципу, является трубчатый аппарат конструкции Гипробьосинтеза ГПИ, а также широко рекламируемый за рубежом ферментер фирмы Ай-Си-Ай (рис. 2).

Принцип работы аппарата заключается в непрерывной циркуляции ферментационной среды, содержащей субстрат и микроорганизмы, за счет разности плотностей

Рис. 2. Эрлифтный биореактор фирмы Ай-Си-Ай с выносным циркуляционным контуром



азрированной и дегазированной жидкостей. Высота проектируемых промышленных аппаратов данной конструкции составляет 30...60 м. Эрлифтная система газоснабжения и перемешивания использована в конструкции промышленных биореакторов фирмы «Ликвихимика». Принцип

«высокого эрлифта» в колонном биореакторе использован также фирмой «Хекст» для процесса получения бактериальной биомассы из метанола (рис.3).

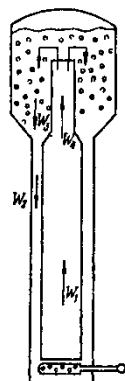


Рис. 3
Эрлифтный биореактор с встроенным циркуляционным контуром ($W_3=0.1...0.2$ м/с;
 $W_4=2...2.5$ м/с)

К преимуществу данных аппаратов относится простота конструкции (полая колонна) и малые удельные энергозатраты. Однако, использование этих биореакторов в процессах ферментации на малорастворимых субстратах, видимо, неэффективно вследствие низкой турбулизации среды и условий массоотдачи в системе газ-жидкость-клетка.

К высокоэффективным биореакторам относятся аппараты группы II и III (рис.1). В аппаратах с механическими перемешивающими устройствами различного вида достигается высокая скорость процессов массопередачи кислорода ($K_L=1000...2000$ ч⁻¹) и близкая к идеальному перемешиванию структура потоков.

Объем промышленных биореакторов с одним механическим перемешивающим устройством достигает 300 м³. Для равномерного перемешивания среды аппарат снабжается многоярусной турбинной мешалкой, обеспечивающей создание мелкодисперсной смеси жидкости и газа. Однако, они имеют высокие энергозатраты на перемешивание.

Внутренний стакан диффузора, ограничивающий зону наиболее интенсивного перемешивания, а также способствующий организации направленной циркуляции в аппарате, применяется во многих современных конструкциях биореакторов с механическими перемешивающими устройствами.

Интересна оригинальная конструкция шарового биореактора с аэрационной турбиной, обеспечивающей циркуляционное перемешивание ферментационной среды и диспергирование в ней газовой фазы. Схема аппарата объемом 1000 м³, разработанного фирмой РЕС-«Хемап» приведена на рис.4.

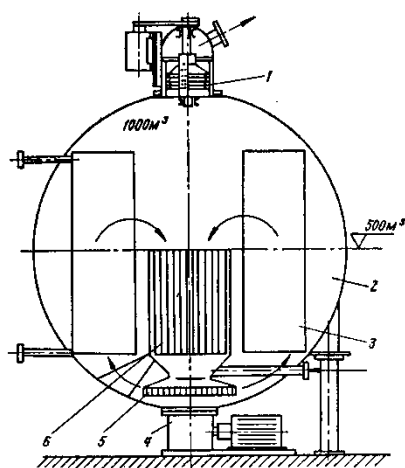


Рис. 4. Шаровой биореактор объем 1000 м³ фирмы РЕС-«Хемап»

1 — механический пеногаситель; 2 — шаровой корпус аппарата;
3 — теплообменные пластины; 4 — гидравлический привод;
5 — аэрационная турбина; 6 — центральный диффузор.

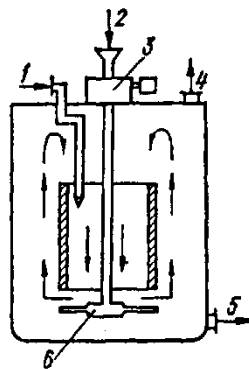
Ограничительные перегородки, расположенные радиально в аппарате, выполнены в виде пластинчатых теплообменников. В данном биореакторе эффективно проведение процессов

культивирования микроорганизмов под избыточным давлением. Однако удельная вкладываемая на перемешивание мощность велика и составляет примерно 5 кВт/ м^3

К аппаратам с вводом энергии в жидкую фазу относятся биореакторы с самовсасывающей аэрационной мешалкой. Принцип работы наглядно виден из схемы, приведенной на рис.5, где изображен биореактор системы Вальдгофа.

Рис. 5. Биореактор с самовсасывающей аэрационной мешалкой системы Вальдгофа

1 — ввод питательной среды; 2 — подача воздуха; 3 — привод мешалки; 4 — выход газа; 5 — отбор суспензии; 6 — самовсасывающая мешалка.



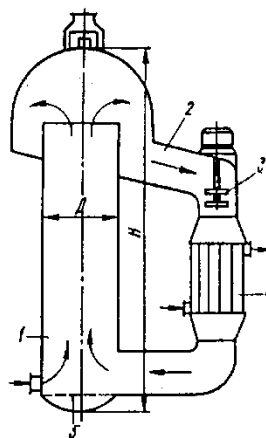
Аэрация среды решается без установки воздушных нагнетателей, за счет подсоса вращающейся турбиной воздуха из окружающей среды; интенсивное циркуляционное перемешивание обеспечивается без циркуляционных насосов за счет насосного эффекта мешалки.

Рассмотренный принцип перемешивания и аэрации реализован на промышленных биореакторах типа Б-50 АДР-76, установленных на биохимических заводах по производству белковой биомассы из n-парафинов нефти. Аппараты имеют объем 800... 900 м³ и выполнены в виде горизонтального тора, по окружности которого равномерно размещены 12 самовсасывающих турбинных мешалок.

К аппаратам с комбинированным принципом ввода энергии (через газовую и жидкие фазы) относятся биореакторы с принудительной циркуляцией среды. Так, в биореакторе японской фирмы «Канегафучи» суспензия микроорганизмов из верхней зоны аппарата поступает во внешний циркуляционный контур, где за счет расположенной вдоль осевой линии мешалки подается в нижнюю зону аппарата, куда также поступает аэрирующий газ. Схеме аппарата приведена на рис.6.

Рис. 6. Биореактор с внешним циркуляционным (принудительным) контуром фирмы «Канегафучи» (Япония).

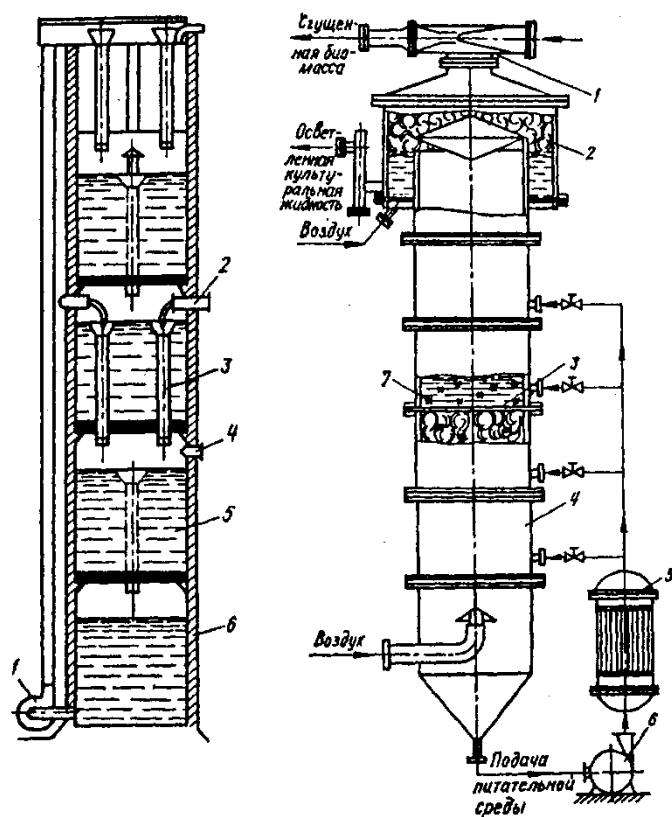
1 — колонная емкость; 2 — циркуляционная труба; 3 — винтовое перемешивающее устройство; 4 — теплообменник; 5 — аэратор.



Близок к рассмотренному по принципу действия горизонтальный циркуляционный биореактор конструкции ЛенНИИхиммаша. Необходимая скорость газожидкостной среды в аппарате обеспечивается осевыми винтами, а аэрирующий газ подается под небольшим избыточным давлением непосредственно в турбулентный поток.

Циркуляционное перемешивание среды широко применяется также в биореакторах колонного типа. При этом в зависимости от интенсивности циркуляции в аппаратах может быть реализован режим, близкий к полному перемешиванию или близкий к режиму вытеснения. Так, в биореакторе, разработанном в институте микробиологии АН ЛатвССР им.А.Кирхенштейна за счет

интенсивной внешней принудительной циркуляции обеспечивается практически полное перемешивание среды и выравнивание концентрации компонентов по высоте колонны. Интересна конструкция секционированного струйного биореактора (Германия) (рис.7).



1 — устройство для отвода сгущенной биомассы; 2 — флотационная часть; 3 — перфорированные тарелки; 4 — корпус колонны; 5 — теплообменник; 6 — циркуляционный насос; 7 — плавающая насадка.

Рис. 7. Секционированный струйный биореактор (Германия)

В основном корпусе 6 колонны одна над другой расположены секции 5, соединенные между собой одной или несколькими сливными трубами 3. Жидкость высокопроизводительными насосами подается в верхнюю секцию колонны, из которой по системе сливных труб стекает вниз, при этом струя жидкости захватывает воздух через газо-вводную трубу 2. Засасываемый извне воздух вместе со стекающей жидкостью поступает в нижнюю секцию. Нижние концы сливных труб находятся над поверхностью жидкости нижележащей секции. В центре сливной трубы находится газоводная труба 2, обеспечивающая поступление свежего воздуха. Их патрубков 4 избыточное количество воздуха выбрасывается в атмосферу. Интенсивное перемешивание среды в биореакторе осуществляется путем использования внешнего циркуляционного контура с насосом 1.

Колонные секционированные биореакторы, представляющие собой тарельчатые аппараты, различаются в основном конструкцией тарелок, а также организацией потоков в них. Широко используются конструкции сетчатых тарелок с переливными устройствами и провальные перфорированные тарелки. Они отличаются отсутствием вращающихся механических частей, высокой надежностью и простотой обслуживания, возможностью организации стерильного процесса, малой установочной площадью и возможностью создания аппаратов большой единичной мощности, возможностью организации многостадийного процесса ферментации. Но также обладают относительно высокими энергозатратами.

Освоение новых биотехнологических процессов вызывает необходимость разработки и производство новых видов специализированного культурального оборудования и приборов.

Нами разработан новый газовихревой способ суспензионного культивирования клеток тканей, и микроорганизмов и биореактор для его реализации. Разработка защищена российским патентом. В национальные фазы переведено патентование в США, Японии. Европе.

Новый способ и устройство обеспечивают мягкие условия перемешивания суспензии клеток при высокой скорости аэрирования, позволяет вести процесс наращивания биомассы в проточной культуре. Новый биореактор позволяет начинать культивирование с малой посевной дозы клеток при минимальном заполнении средой (до 10%) и путём непрерывного добавления среды в процессе культивирования, завершить его при максимальном заполнении. Эти технологические свойства нового биореактора позволяют автоматизировать процесс наращивания биомассы, уменьшить капиталовложения в основные средства и эксплуатационные расходы производства, стабилизировать биологические свойства продуцентов.

3 Газовихревые биореакторы "БИОК". Теория и практика, теоретическое обоснование процесса ферментации и практическая реализация установки.

3.1 Теоретические предпосылки использования вращающихся потоков при суспензионном культивировании.

Культивирование различных типов клеток тканей и микроорганизмов требует интенсивной аэрации для обеспечения растущей популяции кислородом. Поэтому регулирование скорости переноса кислорода из газовой фазы к клетке является одним из важнейших способов интенсификации биосинтеза. Для интенсификации массообмена используют традиционные способы, основанные на повышении объёмного коэффициента массопередачи за счёт применения скорости перемешивания и изменения парциального давления кислорода. Суспензионные культуры клеток животных и растений могут расти в эрлифтных ферментаторах и биореакторах с механическим перемешивающим устройством. Главное преимущество эрлифтных ферментаторов перед обычными с мешалками - отсутствие в их конструкции движущихся частей в объёме суспензии клеток, а также более предпочтительные характеристики по гидродинамике и массопереносу, особенно при масштабном переходе. Несмотря на определённые достижения, суспензионное культивирование в эрлифтных ферментаторах и ёмкостях с механическим перемешиванием, имеет ряд ограничений, к которым относятся низкая плотность клеток (не более $1-2 \times 10^6 / \text{см}^3$), высокая стоимость технологического оснащения. В связи с этим в настоящее время получают развитие различные методы иммобилизации ГД клонов к субстрату, обеспечивающие высокую плотность клеток и получение концентрата антител.

Другим путём развития технологии суспензионного культивирования клеток животных является гидродинамическое совершенствование биореакторов. Одним из направлений такого совершенствования является использование для культивирования клеток закрученных потоков жидкости и газов. Закрученный поток в осесимметричном сосуде относится к группе пространственных течений в поле центробежных массовых сил. Он характеризуется соизмеримым отношением трёх составляющих (осевой, тангенциальной, радиальной) скорости, наличием поперечного и продольного градиентов давления, значительными турбулентными пульсациями.

При местной закрутке жидкости благодаря силам вязкости происходит непрерывное изменение структуры потока по объёму сосуда вплоть до полного вырождения вращательного движения на стенках сосуда. Это обстоятельство является причиной усложнения механизмов протекающих в закрученном потоке процессов и трудностей выявления управляющих этими процессами закономерностей. Центробежные силы, возникающие во вращающейся жидкости, оттесняют поток к стенке сосуда, что приводит к изменениям в распределении осевой скорости: в периферийной зоне эта скорость увеличивается, а в приосевой - уменьшается.

Перестройка профиля осевой скорости по длине сосуда вследствие уменьшения закрутки и геометрических особенностей формы сосуда приводит к появлению радиальной составляющей скорости, которая в некоторых случаях соизмерима с осевой и тангенциальной компонентами скорости.

Характерной особенностью закрученных потоков является радиальный градиент статического давления. Закрученное движение жидкости в осесимметричных сосудах характеризуется ещё одной ванной особенностью. Поскольку поток движется вдоль стенок по винтовой линии, то в пристенной области имеет место течение аналогичное обтеканию "вогнутой" поверхности. Радиус ее "кривизны" не является постоянным, а определяется интенсивностью затухания тангенциальной компоненты скорости. Около вогнутой поверхности, как известно /4/, обменные процессы усиливаются, так как в непосредственной близости к стенке возникают вихри

Тейлора - Гёртлера. Вихри имеют чередующиеся левое и правое вращение, а их оси совпадают с вектором суммарной скорости. Эта особенность приводит к более высокому уровню процессов тепло - и массообмена по сравнению с движением незакрученного потока.

Рассмотренные выше физические особенности закрученных течений широко используются в энергетических установках и других технических устройствах для организации и интенсификации различных процессов. Закрутка потока является эффективным средством стабилизации пламени в камерах сгорания авиационных двигателей, используется для интенсификации тепло - и массообмена в ядерной энергетике, химической, нефтяной, газовой и других отраслях промышленности.

Развитие биотехнологии требует изучения локальных, интегральных и турбулентных свойств вращающихся потоков в специфических условиях, в частности обусловленных свойствами биообъектов.

В установившемся криволинейном потоке (вязкой несжимаемой жидкости) любой элемент жидкости находится в равновесии, если центробежная сила, действующая на этот элемент, уравновешивается центростремительным градиентом давления. (1.1.)

$$\frac{1}{\rho} \frac{v^2}{r} = \frac{\partial p}{\partial r}$$

На сместившийся из своего слоя вследствие турбулентного движения элемент действует "некоторая центробежная результирующая сила" (аналог Архимедовой силы), равная разности центробежной силы, действующей на переместившийся элемент жидкости и на элементы, расположенные в этом новом слое.(1.2.)

$$\frac{\rho (\bar{v} + v')^2}{r} - \frac{\rho \bar{v}^2}{r} \approx \frac{2 \rho \bar{v} v'}{r}$$

При положительном значении этой разности результирующая центробежная сила способствует дальнейшему движению сместившегося элемента (область активного воздействия на поток центробежной силы, турбулентность потока возрастает), при отрицательном, наоборот, препятствует его перемещению (область стабилизирующего воздействия, турбулентность потока затухает).

Если угловая скорость V/r жидкости возрастает с увеличением радиуса (область стабилизирующего воздействия центробежной силы), то любое радиальное перемещение турбулентных элементов жидкости связано с совершением работы против результирующей центробежной силы. Действительно, элементы, получившие перемещение во внутренние (внешние) слои, тот час же отбрасываются обратно, так как центробежная сила, действующая на них в новом слое, больше (меньше) уравновешивающего градиента давления - результирующая сила направлена в сторону увеличения (уменьшения) радиуса.

Противоположная картина наблюдается при уменьшении угловой скорости жидкости с ростом радиуса. В этом случае центробежные силы способствуют турбулентным перемещениям частиц жидкости, которые получают дополнительную энергию за счёт их работы.

Таким образом, аналогично тому, как это имеет место при температурной стратификации (жидкости) в поле сил тяжести /4/, турбулентная энергия частиц жидкости в поле центробежных сил может переходить в потенциальную энергию "динамической стратификации" в области стабилизирующего воздействия центробежных сил и, наоборот, потенциальная энергия динамически стратифицированной жидкости - в кинетическую энергию пульсационного движения в области их активного воздействия. Под "динамической стратификацией" здесь понимается расслоение однородной жидкости, движущейся в поле центробежных сил, на области стабилизирующего и активного воздействия результирующей центробежной силы на турбулентность потока.

При культивировании биообъекта в биореакторе сопротивление массопереносу возникают в виде межфазного сопротивления и при перемешивании массы в объёме биореакторов.

В теории процессов и аппаратов химической технологии /5/ предложен эволюционный подход к выявлению характерных времён и расщепление их по временным иерархическим уровням.

Используя эти представления в /6/, время перемешивания (гомогенизации) в биореакторе расщепляют на время крупномасштабного перемешивания и время микроперемешивания /5/. Первое на них характеризует сопротивление распределению массы компонента в объеме и полностью определяется гидродинамикой в биореакторе, второе - связано с явлениями на уровне межфазных переходов и зависит как от интенсивности перемешивания в области высоких волновых чисел (микроперемешивание), так и от специфики межфазных переходов.

Энергия необходимая для перемешивания в объеме биореактора вводится с помощью специальных перемешивающих устройств. Эта энергия распределяется в объеме биореактора не равномерно. Это связано с тем, что она трансформируется в энергию турбулентных возмущений (вихрей) различного масштаба, обладающих различными свойствами (временем жизни).

Для реализации межфазного переноса необходимы вихри малого масштаба (с высокими волновыми числами), создающие большие касательные напряжения и способные воздействовать на поверхность массопереноса. Вихри крупного масштаба (с низкими волновыми числами) не обладают такими свойствами, и казалось бы, не нужны для интенсификации процессов переноса.

В биореакторах с механическим перемешиванием, быстро вращающаяся мешалка небольшого масштаба, генерирует в основном микровихри, которые обладают малой дальностью распространения и диссипируют в непосредственной близости от места ввода энергии, образуя зону микроперемешивания (зоны мешалки). Связь зоны микроперемешивания с окружающей (периферийной) зоной осуществляется за счёт крупномасштабного перемешивания вихрями большого масштаба, дальность распространения которых соизмерима с размерами аппарата.

Указанное выше активное и стабилизирующее влияние центробежной силы закрученных потоков на турбулентность, позволяет, в первом приближении, сформулировать требования к биореактору с "идеальной" гидродинамикой.

1. Зона микроперемешивания (зона мешалки) равномерно распределена по всему объёму культивирования биообъекта.
2. Интенсивность микроперемешивания (концентрация вихрей малого масштаба) в процессе культивирования управляется концентрацией лимитирующего компонента в метаболизме биообъекта.

Авторами разработки проведено измерение полей скорости и коэффициента объемного массообмена в биореакторе с газовихревым перемешиванием. Некоторые результаты приведены ниже

Поля средней и пульсационной скоростей в вихревом биореакторе.

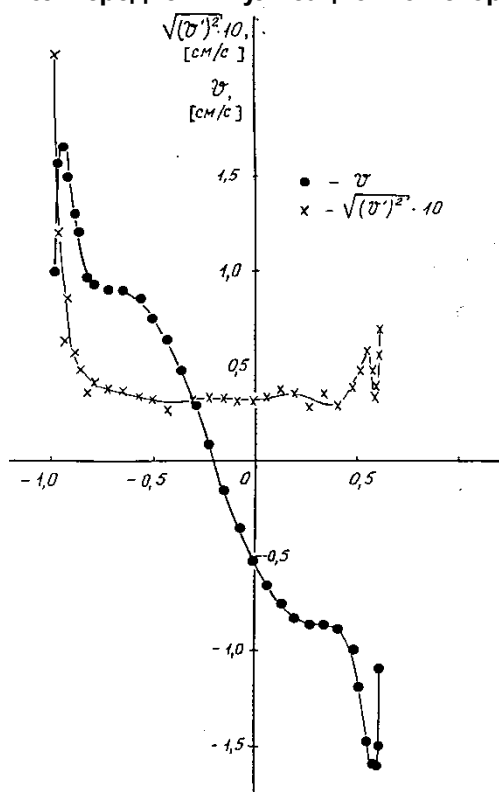


Рис. 2.2. Сечение на 20 мм ниже поверхности жидкости. Объем жидкости в реакторе 4 л.

Одновременно вследствие трения газа о свободную поверхность жидкой среды возникает вращательное движение суспензии. В процессе культивирования клеток азрирующий газ взаимодействует с культуральной средой через ее свободную поверхность, не смешиваясь с жидкостью. В суспензии отсутствует образование пузырьков газа, что исключает травмирование клеток и образование пены.

Вместе с тем, указанное вихревое перемешивание суспензии представляет собой: квазистационарный процесс, обеспечивающий культивирование без застойных зон. Данный способ наиболее эффективен при культивировании клеток животных, человека и вирусов т.к. последние наиболее травмируемы и наиболее требовательны к поддержанию стабильности условий культивирования.

Измерения тангенциальной и осевой составляющей скорости жидкости (рис.2.2), выполненные лазерно-доплеровским измерителем скорости показали, что в жидкости образуется ядро постоянной завихренности, возникает восходящее течение в окрестности оси вращения жидкости и нисходящее течение у стенок биореактора. Пульсации скорости по мере удаления от свободной поверхности выявляются незначительно.

Интенсивный газовый вихрь над поверхностью жидкости создает избыточное давление у стенки биореактора и разряжение в окрестности оси. Такое распределение статического давления в газовой среде обеспечивает мягкое перемешивание суспензии клеток без застойных зон, снижает механическое травмирование клеток, полностью устраняет пенообразование.

На рис.2.3 приведена зависимость коэффициента объемного массообмена в зависимости от числа оборотов активатора вихревого движения газа, расположенного над поверхностью жидкости. Можно видеть, что с увеличением скорости вращения активатора

Зависимости коэффициента объемного массообмена K (1/час) от скорости вращения активатора (об/мин)

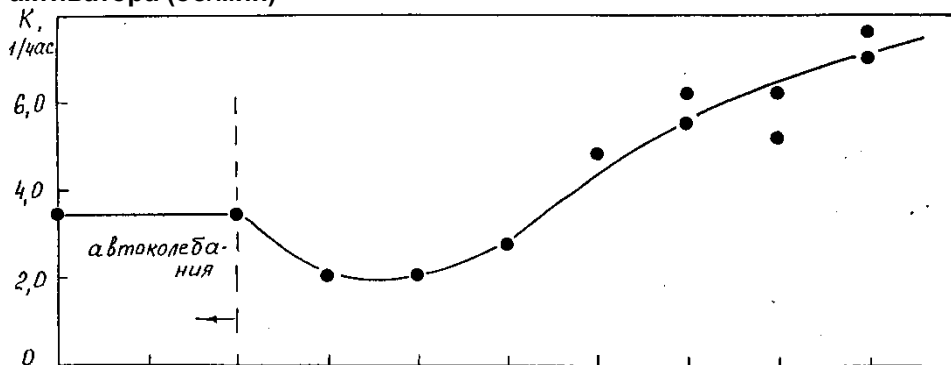


Рис.2.3. Объем жидкости 4400 см³, расход воздуха на азрирование 30 м³/с

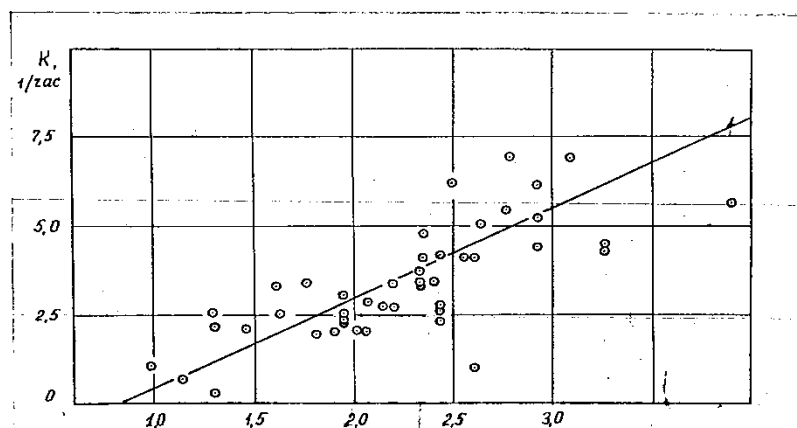


Рис 2.4. Зависимость коэффициента объемного массообмена K (1/час) от модифицированного интегрального параметра закрутки. Расход воздуха на азрирование - 30 м³/с, перемешивание без автоколебаний.

Коэффициент объемного массопереноса K (1/час) растет не монотонно. Экстремальный характер кривой можно объяснить тем, что в биореакторе возникает автоколебательный режим вращения жидкости. Этот режим внешне характеризуется появлением на свободной поверхности жидкости волны, бегущей по окружности стенки со скоростью 2 об/мин и амплитудой до 40 мм. Причем свободная поверхность искривляется, и жидкость колеблется как единое целое. При увеличении числа оборотов активатора автоколебательный режим затухает. В режиме автоколебательного перемешивания коэффициент массообмена возрастает на 50-100%.

Следует отметить, что возникновение автоколебательного режима и его характеристики (частота и амплитуда) зависят от степени заполнения реактора жидкостью, свойств жидкости, геометрии и скорости вращения активатора.

Из данных, приведенных на рис.2.4., следует, что межфазный массообмен в биореакторе с газовым перемешиванием в 2 - 6 раз интенсивнее, чем в биореакторе с мешалкой.

3.2 Расход энергии на перемешивание.

Одним из основных параметров характеризующих процесс перемешивания является расход энергии необходимый для достижения заданной эффективности. Удельная мощность, затрачиваемая на перемешивание,- интегральный параметр характеризующий в неявном виде гидродинамическую обстановку в аппаратах. Как отмечалось рядом исследователей, удельная мощность на перемешивание пока остается основным параметром масштабирования массообменных аппаратов с мешалками.

Следует подчеркнуть, что по своей гидродинамической схеме биореактор с газовихревым перемешиванием сложнее аппаратов с незакрученным потоком жидкости. Отсутствие однозначной зависимости между градиентами давления и скоростей, пространственный характер движения потока культуральной среды затрудняют использование теории для создания инженерных методов расчета аппарата. Авторами настоящей работы проведены измерения удельной мощности расходуемой электродвигателем на перемешивание в биореакторе «БИОК». Методика измерений.

Цилиндрическая емкость диаметром 400 мм и физическим объемом 75 литров заполнялась на 87% водой. Для визуализации структуры потока , создаваемого газо-вихревым перемешиванием жидкости, в воду добавляли частицы с плотностью 1,05 г/см.куб. На внутренней поверхности крышки емкости монтировали вентиляторное колесо в подшипниках и диск с центральным отверстием. На внешней поверхности крышки емкости монтировали электродвигатель. Вентиляторное колесо приводилось во вращение электродвигателем через муфту. В цепь электропитания двигателя включили цифровой вольтамперметр класса 1.

Для измерения мощности на мини-ЭВМ устанавливалось число оборотов электродвигателя и после экспозиции в 10 минут проводились измерения тока потребляемого двигателем и напряжения на его клеммах.

Качество перемешивания определялось визуально по движению частиц примеси. Перемешивания нет (-), слабое перемешивание -(+), сильное перемешивание с образованием у оси емкости вращающегося столба частиц примеси -(++). Результаты измерений приведены в таблице 1.

Таблица № 1.

Скорость вращения двигателя (об/мин)	Ток (А)	Напряжение (в)	Мощность (вт)	Удельная мощность (вт/литр)	Перемешивание
1000	0,56	13,4	7,48	0,12	-
1200	0,66	15,9	10,49	0,17	-
1400	0,81	18,4	14,90	0,23	+
1600	0,96	21,15	20,30	0,31	++
1800	1,14	24,05	27,42	0,42	++

Заключение.

Из результатов измерения величины удельной мощности затрачиваемой на перемешивание, приведенных в таблице № 1, следует, что в биореакторе «БИОК» с газо-вихревым перемешиванием жидкости удельная мощность на перемешивание в 12-16 раз ниже, чем в биореакторах с мешалкой фирмы «Хемап».(Виестур и др. «Системы ферментации», Рига, 1986, стр.388).

3.3 Способ и устройство для суспензионного культивирования клеток при газо-вихревом перемешивании

Рассмотренные выше особенности гидродинамики закрученных потоков вязкой несжимаемой жидкости, позволяют предложить новый способ и устройство для культивирования клеток животных в суспензии.

Предлагаемый способ может быть использован при культивировании клеток животных и человека в суспензии или на микроносителях и реализован в медицинской и микробиологической промышленности, а также в сельскохозяйственном производстве.

Известен способ культивирования, включающий введение под давлением струи аэрирующего газа в культуральную жидкость тангенциально стенкам ферментатора и поступательно вдоль его оси для создания устойчивого вихревого движения культуральной жидкости по спирали с одновременной ее циркуляцией в виде восходящих и нисходящих потоков.

К недостаткам способа следует отнести невозможность его использования для культивирования легко травмируемых клеток тканей животных и человека.

В процессе культивирования указанным способом в суспензии образуется множество пузырьков газа, при разрушении которых гибнут клетки и идет интенсивное пенообразование.

Другой способ суспензионного культивирования клеток животных, включает диффундирование аэрирующего газа через силиконовую трубчатую мембрану в питательную среду и циркуляцию питательной среды при помощи механических средств перемешивания. Газообмен между питательной средой и потоком газовой смеси через полупроницаемую трубчатую мембрану позволяет устранить пенообразование.

Недостатком указанного способа является механическое травмирование клеток в процессе перемешивания и характерная для этого способа перемешивания неравномерность распределения клеток в объеме ферментатора.

Известен способ использующий перемешивание суспензии клеток за счет введения в приосевую зону пузырьков аэрирующего газа (барботаж). Скорость циркуляции суспензии под действием газового потока между приосевой и периферийной зонами, разделенными непроницаемой стенкой, поддерживается на уровне, достаточном для предотвращения оседания клеток из суспензии.

Недостатком такого способа- является низкая скорость межфазного массообмена, а также имеет место интенсивное пенообразование.

Целью предлагаемого технического решения является интенсификация процесса культивирования клеток за счет увеличения скорости межфазного массообмена, снижение травмируемости клеток и устранение пенообразования культуральной среды.

Указанная цель достигается тем, что над поверхностью суспензии клеток формируют вихрь аэрирующего газа, путем подачи аэрирующего газа в газовую полость биореактора тангенциально его цилиндрическим стенкам и выведении этого газа из приосевой зоны в центре торцевой крышки.

За счет трения на границе газовой и жидкой фаз и разницы статического давления между периферией и центром газового вихря, обеспечивается движение культуральной среды в виде вихревого кольца, вращающегося относительно оси биореактора, с одновременным нисходящим движением жидкости у стенок биореактора и восходящим в приосевой зоне. Аэрирующий газ взаимодействует с культуральной средой только через свободную поверхность последней, не смешиваясь с ней.

В результате этого обеспечивается интенсификация массообмена за счет высокой разницы скорости аэрирующего газа и жидкости и равномерное перемешивание суспензии без застойных зон, снижение травмируемости клеток за счет исключения из объема жидкости областей с высоким уровнем турбулентности и отсутствия пенообразования.

Для реализации способа культивирования разработана конструкция газовихревого биореактора, схема которого приведена на рис.2.1.

Биореактор представляет собой термостатированную емкость, в которой газовая полость и культуральная среда разделяются свободно поверхностью культуральной среды. Объем заполнения может изменяться от 10 до 90% физического объема биореактора, в зависимости от технологических требований.

В газовой полости биореактора, над поверхностью культуральной среды создается интенсивный вихрь воздуха. Воздух вовлекает во вращательное движение культуральную среду, в которой формируется поле скорости с осевой компонентной.

Вследствие существенного изменения тангенциальной компоненты скорости в вихре имеет место разница статических давлений между периферией I (повышенное) и центром II (пониженное). Разница давлений в газе через свободную поверхность культуральной жидкости генерирует в

последней осевое движение: нисходящее в периферийной зоне (III) биореактора и восходящее в приосевой его зоне (IV)

Закрученные течения однофазных и многофазных сред широко используют в различных отраслях современной техники. Закручивание потока связано, как правило, с необходимостью интенсификации процессов тепло-массообмена в энергетических установках или аппаратах химических технологий. В закрученном потоке интенсификация процессов переноса импульса, теплоты и массы вызвана в основном двумя причинами: изменением величины и направления скорости (влияние через средние характеристики течения); влиянием массовых сил на течение у твердых ограничивающих поверхностей

В биореакторе перемешивание суспензии клеток осуществляют путем создания в ней квазистационарного вращательного движения, генерируемого азерирующим газом, который подают в емкость над поверхностью суспензии клеток с одновременным его закручиванием в поток с полем скорости потенциального вихря на периферии емкости (зона 1) и осевым противотоком в приосевой зоне; (зона 2) при этом перепад давления в потоке азерирующего газа между периферией и центром вихря поддерживают в пределах 10—2000 Па.

Благодаря такому закручиванию азерирующего газа за счет трения на границе раздела фаз и разницы давления между периферией и центром газового вихря обеспечивается движение суспензии клеток в виде вихревого кольца, вращающегося относительно оси емкости с одновременным нисходящим движением жидкости на периферии емкости (зона III) и восходящим в приосевой зоне (зона IV). Азерирующий газ взаимодействует с суспензией клеток только через свободную поверхность последней, не смешиваясь с ней. В результате этого обеспечивается интенсификация межфазного массообмена за счет увеличения скорости движения азерирующего газа и равномерного перемешивания суспензии без застойных зон, снижение травмируемости клеток за счет исключения при перемешивании зон с высоким уровнем турбулентности и стабилизация пенообразования вследствие разрушающего действия газового вихря на пену. Энергия, необходимая для перемешивания суспензии клеток, подводится по всей поверхности жидкости, что позволяет реализовать режимы суспензионного культивирования любых клеточных культур, в том числе наиболее чувствительных к механическому воздействию [4-6].

Как показали наши эксперименты, опубликованные в [7], величина сульфитного числа в вихревом биореакторе зависит от объема заполнения, расхода воздуха над свободной поверхностью жидкой фазы и интенсивности газового вихря. При объеме заполнения биореактора 4,8 л, расходе воздуха 0,1 л/мин и оборотах активатора, генерирующего вихревое движение воздуха, 600 об/мин - сульфитное число равно 8,1 (1/4). Сравнение величины сульфитного числа, полученного в наших экспериментах [7], с величиной сульфитного числа в биореакторе с механическим перемешивающим устройством при поверхностном азиривании и подобных геометрических размерах показало, что сульфитное число в вихревом биореакторе в 3—6 раз выше.

Введение воздуха через пористое днище вихревого биореактора приводит к резкому (более чем в 10 раз) увеличению сульфитного числа.

3.4 Инженерное решение привода биореактора с газо-вихревым перемешиванием.

Существенной проблемой при культивировании клеток тканей и микроорганизмов является поддержание асептических условий и надежной работы оборудования, так как процесс культивирования длится от 1-2 недель до нескольких месяцев. В связи с этим проведение различных операций по ходу технологического процесса требует оснащения соответствующими устройствами.

Как следует из практики суспензионного культивирования, недостаточно надежным узлом биореактора с газо-вихревым перемешиванием является система передачи механической энергии от электродвигателя к активатору вихревого движения. Это приводит к частой контаминации культуры клеток при длительном культивировании.

Одной из технических преград для развития высокоэффективных герметичных приводов являются традиционные способы уплотнения линии вала перемешивающих устройств.

Применение сальниковых и торцевых уплотнений связано с трением и загрязнением суспензии клеток материалом узла трения.

Наибольшей компактностью и надежностью обладает привод с экранированной муфтой - на постоянных магнитах из ферритов и редкоземельных элементов. Прессованные магниты этого типа обладают рядом преимуществ, что позволяет предположить перспективность их использования при серийном производстве магнитных муфт.

Принципиальная схема передачи механической энергии через магнитный экран с помощью муфты на постоянных магнитах представлена на рис.2.1.

Из схемы видно, что магнитный привод состоит из ведущей и ведомой полумуфт и экрана. Ведущей называется полумуфта жестко связанная с электродвигателем, ведомой полумуфта, связанная с рабочим механизмом. Полумуфты отделены друг от друга равномерным воздушным зазором, в котором помещается неподвижный экран. В переменн- полюсных ЭПМ на рабочих поверхностях полумуфт (обращенных друг к другу) располагаются постоянные магниты чередующейся по окружности полярности.

Магниты на обеих полумуфтах закреплены (обычно приклеены) на магнитомягкой арматуре, образующей магнитопровод.

Приведение во вращательное движение ведущей полумуфты приводным двигателем вызывает смещение магнитов ведущей полумуфты относительно соответствующих магнитов ведомой полумуфты. Возникают электромагнитные силы, стремящиеся совместить оси обеих полумуфт. Благодаря этим тангенциальным силам электромагнитного взаимодействия магнитных систем полумуфт, ведомая преодолевает момент сопротивления рабочего органа, и увлекается за ведущей полумуфтой.

При неизменном моменте сопротивления смещение полумуфт относительно друг друга постоянно, полумуфты вращаются синхронно. Увеличение или уменьшение момента сопротивления вызывает соответствующее изменение угла сдвига магнитных систем полумуфт относительно друг друга.

Как и в любой синхронной электрической машине, при относительном смещении полумуфт на угол, превышающий 90 электрических градусов, синхронная связь полумуфт нарушается. Для исключения этого явления в рабочем диапазоне изменения нагрузок магнитная муфта должна обладать достаточным запасом статической устойчивости, поэтому обычно принимается, что максимальный расчетный момент муфты в 1,5 - 2 раза больше номинального момента сопротивления рабочего механизма. Такой запас по статическому моменту благоприятно сказывается и на динамической устойчивости муфты, так как в этом случае муфта работает на линейной части угловой характеристики.

Для повышения динамической устойчивости муфты и успокоения возможных колебаний в переходных режимах, возникающих во всех случаях неравенства моментов вращающего и тормозного, она снабжается демпферной обмоткой. Демпферная обмотка в виде короткозамкнутых медных стержней укладывается между магнитами одной из полумуфт, обычно на полумуфте, находящейся вне герметичного объема. При любом относительном перемещении полумуфт в демпферной обмотке возникают токи, создающие электромагнитные силы, синхронизирующие движение полумуфт.

Неподвижный экран, разделяющий полумуфты, позволяет надежно герметизировать рабочий объем аппарата, чего нельзя достигнуть другими средствами (уплотнителями) без значительных потерь. В идеале экран должен быть абсолютно немагнитным, неэлектропроводным и обладать повышенной прочностью. Реальные материалы, применяемые для изготовления экранов (аустенитные стали и сплавы титана), не идеальны в этих отношениях, поэтому при передаче энергии через экран возникают потери. Токи, наводимые в экран при движении многополюсной системы постоянных магнитов обеих полумуфт, нагревают экран и связывают электромагнитные силы, тормозящие движение полумуфт. Однако эти потери в реальных конструкциях составляют не более 1-2% от передаваемой энергии.

Эксплуатация изготовленного магнитного привода показала:

1. Обеспечение абсолютной герметичности рабочего объема реактора
2. Отсутствие необходимости в профилактических осмотрах и ремонтах герметизирующего узла привода реактора, в специальном обслуживании и уходе.
3. Высокую надежность и долговечность эксплуатации.
4. Упрощение схемы обвязки и обслуживания аппарата.
5. Более полное использование мощности приводного двигателя т.к. нет потерь на трение в герметизирующем узле.

Список использованных источников

1. Лапина Г.О., Украинцев А.Д., Шепель Л.М. Крупномасштабное получение моноклональных антител: Обзорн.информ. - М.: ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР, 1989.- Вып.3 - 60 с.
2. Genetic. Engineering News - 1987. - Vol. - 7. - N6. - p.142.
3. Маркина Л.С. Микробиологическая промышленность за рубежом. Экономика, рынок, конъюнктура. Обзор: - Новосибирск, НПО "Вектор", 1989.- 33 с.

4. Щукин В.К., Халатов А.А. Теплообмен, массообмен и гидродинамика закрученных потоков в осесимметричных каналах. М.: Машиностроение, 1982.- 200 с.
5. Pohorecki R., Balduga J. New model of micromixing in chemical reactors. Ind.Eng.Chem.Fundam. 1983. Vol.22, N4, p.398-405.
6. Лобода П.П., Карлаш Ю.В. Особенности массопереноса в биореакторах при интенсификации и масштабировании процессов микробиологического синтеза. Гидродинамика и процессы переноса в биореакторах: Сб./под ред. Р.С.Горелика; ин-т теплофизики - Новосибирск, 1989. - 190 с.
7. А.С. № 1331888 СССР: МКИ с 12М 1/04, опубл. 1987 г.
8. Пат. № 2940446, ФРГ: МКИ с 13 5/00, опубл. 1982.
9. пат. № 4259449, США: МКИ с 12 5/02, опубл. 1981.
10. Кафаров В.В., Винаров А.Ю., Гордеев Л.С. Моделирование биохимических реакторов. М: Лесная промышленность, 1979, 344 с.
11. Виестур У.Э., Кристансонс, Былинкина Е.С. Культивирование микроорганизмов - М.: Пищевая промышленность, 1980, 230 с.
12. Тяготин Ю.В., Коробицын Л.П., Милютин И.В., Воробьев А.А. Гибридная технология: сущность, проблемы и перспективы, рынок (по зарубежным данным) обзорная информация: М. 1984 г. 40 с.

4 Использование газо-вихревых биореакторов "БИОК" в клеточной биологии:

4.1 Культивирование клеток млекопитающих.

В ряду фундаментальных достижений современной биологии важное место занимают методы гибридизации соматических клеток животных. Развитие этих методов в практически новую ветвь биотехнологии (гибридную биотехнологию), возникло благодаря открытию возможности получения соматических гибридов иммунных клеток продуцирующих моноклональные антитела (МКАТ). Показателем этого в капиталистических странах является то, что моноклональные антитела очень быстро стали товаром. В настоящее время рынок моноклональных антител является высоко перспективным. Совсем недавно созданная гибридная промышленность за рубежом производит сотни вариантов моноклональных антител. Растущий спрос на них вызывает постоянный рост капиталовложений в эту сферу биотехнологии. Огромный коммерческий потенциал препаратов моноклональных антител означает, что технологические разработки в этой области становятся производственными секретами или патентуются. Гибридную биотехнологию можно привести в качестве такого рода деятельности, когда между первыми фундаментальными научными разработками и производством гибридных антител на общественные нужды в промышленно развитых странах прошло около 2-3 лет.

Крупномасштабное производство человеческих МКАТ *in vitro*, как и МКАТ грызунов, осуществляется с использованием двух основных принципов культивирования ГД в суспензионном или иммобилизованном виде. Главным достоинством таких методов является возможность увеличения емкостей для культивирования до необходимых размеров и использование бессывороточных сред, что делает получение антител более экономичным в отношении трудозатрат и капиталовложений.

При надежном инженерном обеспечении процесс антителообразования высоко воспроизводим, сохраняет стерильность на протяжении всего цикла и даёт возможность периодического контроля за набором параметров, необходимых для обеспечения жизнеспособности культуры. Критически важным является постоянное обновление культуральной среды и достаточное снабжение кислородом

Биосинтез эукариотических белков в прокариотических клетках в препаративных количествах имеет практическое значение при создании на их основе медицинских препаратов нового поколения. При наработке препаративных количеств целевого продукта условия культивирования и, следовательно, выход целевого продукта в значительной мере определяются инженерным обеспечением процесса биосинтеза, т.е. конструкцией биореактора, создающего оптимальные условия для роста и накопления целевого продукта. Условия культивирования должны обеспечивать эффективную экспрессию клонированного гена: реализацию генетических и фенотипических свойств популяции рекомбинантных клеток (стабильность плазмиды, определенную частоту ее элиминации из клеток, состояние ферментативной системы самих клеток-реципиентов и т.д.).

Культуры клеток, используемые для культивирования в вихревом биореакторе, размножались в монослое и обладали потенциальной возможностью к росту в суспензии. Поэтому

первым этапом являлась адаптация клеток к культивированию в суспензии. Выращенные в монослое клетки снимались с помощью раствора трипсина (0,1%) и версена (0,01)%. Полученная суспензия клеток, разбавлялась питательной средой до концентрации 5×10^5 кл/см³ и инкубировалось при минимальном перемешивании и необходимой температуре. Каждые три дня проводился пересев клеток. После двух пассажей накапливалось необходимое количество клеток для заправки биореактора.

Суспензионное культивирование клеток животных, гибридом в вихревом биореакторе проводилось в следующей последовательности:

1. Мойка и сушка всех деталей биореактора в соответствии с инструкцией;
2. Сборка биореактора, обвязка арматурой и испытание на герметичность давлением 0,5 ат. в течение 1 часа;
3. Автоклавирование всей системы в сборе при давлении 1,4 ат. и температуре 126°C в течение 45-60 мин.
4. Заполнение биореактора культуральной средой и клетками в стерильном боксе;
5. Соединение биореактора с электродвигателем на рабочем месте и включение активатора вихревого движения воздуха над поверхностью культуральной жидкости;
6. Включение системы термостатирования в биореактора;
7. Взятие начальной пробы при достижении температуры культуральной жидкости равной 37°C с фиксацией в журнале следующих параметров (рН, рО₂, дыхательная активность, концентрация клеток, процент живых клеток).
8. Приведение значения рН к необходимому значению путём продувки углекислым газом или воздухом.

Культивирование, как правило, в течение первых суток велось без подачи воздуха в биореактор. В течение вторых суток подавалась смесь воздуха (95%) и углекислого газа (5%) в течение суток, а далее подавался воздух, расход которого увеличивался по мере закисления культуральной жидкости.

Экспериментальная проверка способа культивирования осуществлена на клетках сирийского хомячка (ВНК-21) и клетках капустной совки (I Z Д МВ-0503). Результаты культивирования приведены в таблице № 1.

Табл. 1 РЕЗУЛЬТАТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Способ	Линия клеток	Т, часы	Концентрация клеток (млн/см ³)		Живых клеток %	Концентрация компонентов среды в конце культивирования (мг/л)			
			В нач	В конце		Пролин	Лизин	Метионин	Аланин
С мех мешалкой	ВНК-21	72	0.3 - 0.5	1.7 - 2.8	95-97	0	0.5	23.4	128
С вихревой мешалкой	ВНК-21	60	0.46	2.9	98	31.43	9.42	14.43	28.8
С вихревой мешалкой	Капустная совка I Д МВ-0503	72	0.4	2.2	96	-	-	-	-

Примечание:

* концентрация остальных компонентов среды различаются незначительно

** измерение концентрации компонентов среды в конце культивирования не проводилось

При культивировании клеток ВНК-21 на стандартной питательной среде в вихревом биореакторе коэффициент массообмена соответствовал коэффициенту массообмена ферментёра с мешалкой т.е. $K_{La} \approx 1$. Т.к. вихревой биореактор обеспечивает $K_{La} \approx 6$, то при соответствующем запасе питательной среды, можно ожидать значительного увеличения концентрации клеток в конце культивирования

При культивировании клеток капустной совки решалась задача создания условия мягкого перемешивания суспензии клеток, т.к. клетки капустной совки более крупные и легко разрушаются при механическом перемешивании. Из таблицы №1 можно видеть, что максимум концентрации клеток в вихревом биореакторе наблюдался раньше (20%), чем в биореакторе с механическим перемешиванием. Концентрация отдельных компонентов культуральной среды в конце культивирования также различаются. Эти качественные изменения культуральных характеристик

процесса, могут указывать на изменения метаболизма клеток при их культивировании в вихревом биореакторе.

Табл. 2 Результаты культивирования

№	Линия клеток	Длительность культивиров. Час.	Концентрация клеток Млн.		Индекс пролиферации	Интенсивность дыхания клеток 10^{-13} моль*O ₂
			начальная	конечная		
1.	- 1 / 1- 4-1	48	1,2	5,6	4,6	1,2-1,6
2.	- 1 / 1- 4-1	48	0,35	1,8	5,0	4,5-7,0
3.	- 1 / 1- 4-1	41	1,2	4,2	3,9	1,4-1,6
4.	- 1 / 1- 4-1	42	0,6	2,5	4,1	1,1-2,5
5.	- 1 / 1- 4-1	53	0,25	1,65	7,0	1,0-4,0
6.	- 1 / 1- 4-1	72	1,0	5,5	5,5	0,9-2,0
7.	- 1 / 1- 4-1	112	0,38	3,1	8,0	2,0-2,5
8.	- 1 / 1- 4-1	72	0,46	1,6	4,0	2,5-3,2
9.	-210/0 - 14 P ₃	72	1,0	4,56	4,5	-
10.	-210/0 - 14 P ₃	43	0,93	2,8	3,0	0,9-2,4
11.	-210/0 - 14 P ₃	72	0,65	1,5	2,7	1,2-2,5
12.	A4C5	36	0,5	1,4	2,8	1,4-1,7
13.	A4	72	0,57	1,2	2,5	1,6-4,5

Примечание: Эксперименты 1-2; 3-5;6-8 велись непрерывно отъёмно-доливным способом.

для отработки режимов культивирования в качестве модельных тест - клеточных культур были взяты также две миеломы мыши SP 210 - Ag 14P₃; NS -1/1 -Ag 4 -1 и гибридная клетка A₄C₅, представляющая собой гибрид между СПЭВ (почки свиньи) и лимфоцитами свиньи.

При культивировании клеток A₄C₅, на начальном этапе процесса были выполнены дополнительные работы:

1. Подбор партии эмбриональной сыворотки, пригодной для культивирования клеток в суспензии.
2. Подбор среды для культивирования гибридной клетки. Эксперименты по подбору среды показали, что на среде ПС-4 с эмбриональной сывороткой (10%) гибридная клетка не росла даже при посевой концентрации 10^6 клеток/ см³.

Основные результаты культивирования клеток миеломы и гибридной клетки приведены в таблице № 2. Из таблицы № 2 можно видеть, что интенсивность дыхания клеток в ходе культивирования высока. Это указывает на высокую эффективность аэробного энергообеспечения клеток, которую обеспечивает газо-вихревой способ перемешивания суспензии клеток, при мягком перемешивании клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мертвецов Н.П. // Изв. АН, серия химическая. — 1996. — № 12. -- С. 2837 - 2845.
2. Мертвецов Н. П. Ангиогенин и механизм ангиогенеза. — М.: Наука, 1997. — С. 122.
3. Мертвецов Н.П. Регуляция экспрессии генов стероидными гормонами. — М.: Наука, 1990. — С. 140.
4. Baibakov, B.S., Vorob'ov, I.D., Kislikh, V.I. et al. The production of cell in air-vortex stirred bioreactors. International Conference on Medical Biotechnology, Immunization and AIDS. June 12—18, 1991, Leningrad, USSR. --Leningrad, 1991.
5. Кислых В. И., Репков А. П., Рамазанов Ю. А., Воробьев И.Д. Аппарат для суспензионного культивирования клеток тканей или микроорганизмов. — Патент России № 2099413. Опубликовано 20.04.1997.
6. Зеленьяк Т.Н., Кельман Н.Э., Кислых В.И., Проворова О. Г. К вопросу о моделировании течений в вихревой камере. Материалы международной конференции. Математические модели и методы их исследования (задачи механики сплошной среды, экологии, технологических процессов). — Красноярск, Россия, 25—30 августа 1997. — Красноярск, 1997.
7. Воробьев И.Д., Кислых В. И., Харченко В. А. Массообмен в клеточном культиваторе "Биоколь". Гидродинамика и процессы переноса в биореакторах. — Новосибирск, 1989. — С. 35-40.

ЛИТЕРАТУРА

1. Щукин В.К. Халатов А. А.. Теплообмен, массообмен и гидродинамика закрученных потоков в осесимметричных каналах. — М.: Машиностроение, 1982. — 200 с.
2. Мертвецов Н.Н., Норкина О.В., Майстренко В.Ф. и др. Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в векторной системе р ET-g-l a-d (+) // Биоорганическая химия. — 1999. — в печати.
3. Мертвецов Н. П. // Известия Академии наук, сер. хим. — 1996. — № 12. — С. 2837—2846.
4. Кислых В.И., Репков А.Я., Рамазанов Ю.А., Воробьев И.Д. Аппарат для суспензионного культивирования клеток тканей или микроорганизмов. — Патент России № 2099413, 20.04.1997.
5. Воробьев И. Д., Кислых В. И., Харченко В. А. Массообмен в клеточном культиваторе "Биоколь": Гидродинамика и процессы переноса в биореакторах. — Новосибирск, 1989. — С. 35—40.
6. Кислых В.И., Рамазанов Ю. А., Майстренко В. Ф., Мертвецов Н.П. // Биотехнология. — 2000. — № 4. — С. 72—79.
7. Мертвецов Н.П., Стефанович Л.Е. Ангиогенин и механизм ангиогенеза. (Монография). — М.: Наука, 1997.—122с.
8. Незнанов Я.С., Макарова И, В., Крамерова И. А. и др. // Молекулярная биология. — 1990. —Т. 24. — Вып. 3. С. 709— 713.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. — М.: Мир, 1984. — 101 с.
11. Виестур У.Э., Кристиансонс Н.Ж., Былинкина Е.С. Культивирование микроорганизмов. — М.: Пищевая промышленность, 1980. — С. 231.