



Powiększenie skali hodowli korzeni włosnikowatych *Paulownia tomentosa*

Beata Pawłowska¹, Aleksander Chmiel²

¹Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

²Zakład Biosyntezy Środków Lecznicych, Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Scaling up the *Paulownia tomentosa* hairy roots' culture

Summary

Hairy roots, characterized by rapid and stable growth, can be considered as a source of natural plant's metabolites. The commercial utilization of roots is limited because of the difficulties during the culture in scaling up and designing of bioreactors, which could meet the requirements of optimal conditions of culture.

The transformed root cultures of *Paulownia tomentosa* were conducted in shaking flasks of 300 cm³ containing 80 cm³ hormone-free WP medium, with 3% of sucrose.

A mist bioreactor was also designed for transformed roots' cultures. Its glass prototype of 5 dm³ volume was used for optimization of hairy roots of *Paulownia tomentosa*. In the bioreactor containing 1 dm³ of the medium, after 28 days the dry mass harvest was 10.5-20.5 g depending on culture variants. The total amount of the main metabolite – verbascoside in these roots was 860 ÷ 1170 mg in one culture (56 ÷ 72 mg/g of dry mass).

The research performed on the prototype bioreactor enabled the optimization of its construction. It resulted in a new laboratory bioreactor of 10 dm³ volume made of glass and stainless steel.

Key words:

mist bioreactor, hairy root culture, *Paulownia tomentosa*, verbascoside.

Adres do korespondencji

Beata Pawłowska,
Katedra Inżynierii
Bioprosesowej,
Wydział Inżynierii
Procesowej i Ochrony
Środowiska,
Politechnika Łódzka,
ul. Wólczańska 213,
90-005 Łódź;
e-mail:

beatapaw@wipos.p.lodz.pl

biotechnologia

4 (63) 142-153 2003

1. Wprowadzenie

Korzenie włośnikowate można otrzymać w wyniku transformacji całych roślin, ich części lub roślinnych kultur *in vitro* bakteriami *Agrobacterium rhizogenes*. W wyniku zakażenia rośliny, następuje integracja fragmentu T-DNA tego plazmidu z DNA komórki roślinnej (1,2). Korzenie te charakteryzują się szybkim tempem wzrostu i genetyczną stabilnością oraz mogą wytwarzać metabolity wtórne charakterystyczne dla rośliny macierzystej na poziomie do niej porównywalnym (3-6), a nawet wyższym (4,7). Korzenie transformowane mogą też być źródłem nowych związków, innych niż te, które występują w roślinach rosnących naturalnie (4); posiadają też zdolność biotransformacji różnego typu egzogennych prekursorów (8). Korzenie włośnikowate mogą także służyć do regeneracji roślin (9,10).

W badaniach użyte były korzenie transformowane paulowni puszystej (*Paulownia tomentosa* Steudt., rodzina *Scrophulariaceae*). Paulownia jest rośliną od wieków wykorzystywaną w medycynie chińskiej w leczeniu schorzeń wątroby i serca, zawierającą również składniki o właściwościach odkażających i przeciwbakteryjnych. Substancjami biologicznie czynnymi są: glikozydy fenylopropaidowe (m.in. werbaskozyd), glikozydy irydooidowe, glikozydy fenolowe, kwasy fenolowe, lignany, pochodne furanochinonu (11,12)

2. Materiał i metody

2.1. Materiał

W badaniach wykorzystano kultury korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa*, szczep E otrzymane w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Kultury korzeni transformowanych prowadzono w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym.

2.2. Kultury korzeni włośnikowatych

2.2.1. Kultury w kolbach wstrząsanych

Kultury korzeni transformowanych prowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 300 cm³ zawierających po 80 cm³ podłoża WP (13) bez regulatorów wzrostu. W 1 dm³ podłoża znajdowały się: sacharoza – 30 g, KH₂PO₄ – 170 mg, NH₄NO₃ – 400 mg, MgSO₄ – 180,7 mg, CaCl₂ – 72,5 mg, Ca(NO₃)₂ · H₂O – 555 mg, K₂SO₄ – 990 mg; H₃BO₃ – 6,2 mg, MnSO₄ · 4 H₂O – 25 mg, FeSO₄ · 7 H₂O – 37,5 mg,

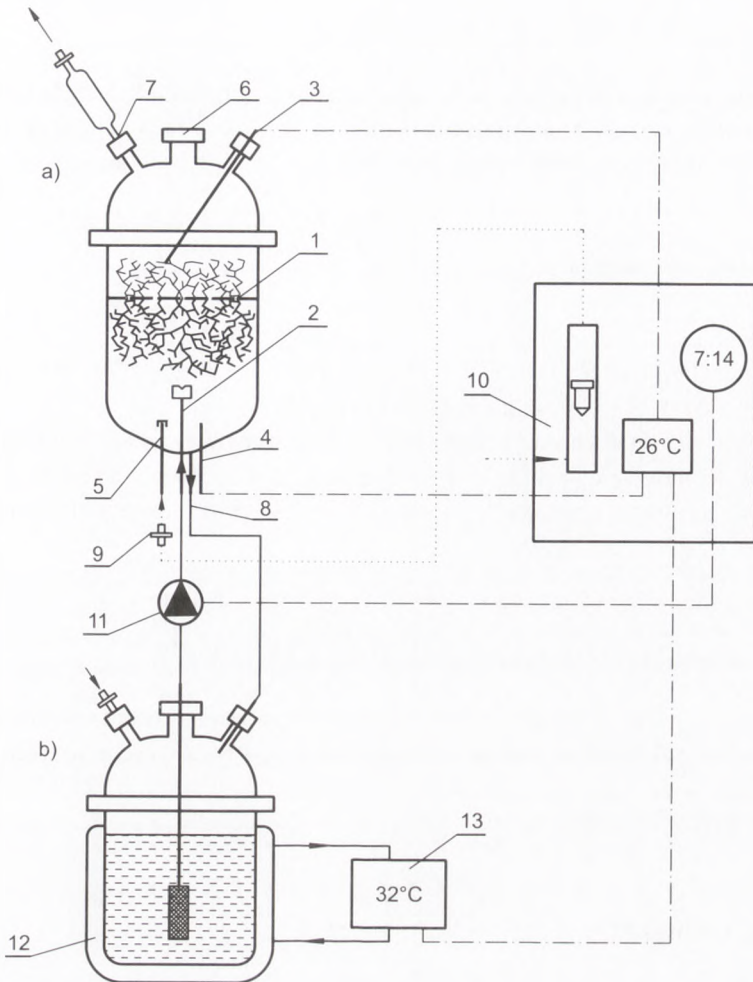
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 8,6 mg, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ – 0,25 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ – 0,25 mg, tiamina – 0,4 mg, pirydoksyna – 0,1 mg, kwas nikotynowy – 0,5 mg, inozytol – 100 mg.

Do kolb wprowadzano fragmenty korzeni w ilości około 0,015 g. Kolby umieszczano na wytrząsarce 100 obr./min w ciemnym fitotronie, w temperaturze 26°C i przy wilgotności 80-90%. W tych warunkach kultury prowadzono przez 55 dni w trzech seriach po 3-5 powtórzeń. Co 5 dni pobierano próby do analiz. Przeprowadzono trzy warianty hodowli; 1) próba odniesienia – kontrolna, 2) próba uzupełniona jonami fosforanowymi w 25 dniu hodowli, 3) próba z całkowitą wymianą podłoża po 45 dniach hodowli.

2.2.2. Kultury korzeni włóśnikowatych w bioreaktorze

Główny, szklany zbiornik (Büchi) zestawu o pojemności całkowitej 5 dm³ ma kształt cylindra z wypukłym dnem i króćcem pozwalającym na całkowity spływ nadmiaru pożywki. W pokrywie znajdują się króćce: inokulacyjny, odprowadzający powietrze oraz pozwalający na wprowadzenie czujnika temperatury. W górnej części wnętrza bioreaktora znajduje się siatka ze stali kwasoodpornej, na której umieszczone są korzenie. Szklany zbiornik pośredniczący (Büchi) zawierający pożywkę ma pojemność 1,5 dm³, wyposażony jest w płaszcz termostatowy i króćce: doprowadzający i wyprowadzający pożywkę, umożliwiający pobranie prób i wprowadzenie elektrod pomiarowych oraz wyrównujący ciśnienie (schemat 1). Pożywka ze zbiornika pośredniczącego jest doprowadzana do zbiornika głównego przy użyciu pompy perystaltycznej typu CMF 10 (Chemap) i rozpylana przez polipropylenową dyszę o przepływie strumieniowo-wirowym. Skraplająca się ciecz spływa na dno zbiornika, a następnie wraca do zbiornika pośredniczącego. Cykl pracy pompy jest regulowany za pomocą zegara sterującego MC 5B (Fael). Konstrukcja bioreaktora zapewnia rozwój korzeni w warunkach aseptycznych, w atmosferze jałowego powietrza przez cały czas pracy bioreaktora. Temperatura pożywki w granicach 25 ÷ 27°C jest utrzymywana przy użyciu termostatu Thermomix (Braun Biotech International).

Zbiornik pośredniczący napełniano 1 dm³ pożywki WP z 3% zawartością sacharozy bez regulatorów wzrostu i w całości sterylizowano w autoklawie. Do bioreaktora wprowadzano inokulat pochodzący z kultur w 300 cm³ kolbach wstrząsanych. Hodowle prowadzono w temperaturze 26°C ± 2°C, regulując ją na bazie pomiaru temperatury w górnej i dolnej części bioreaktora. Bioreaktor zasilany był sterylnym powietrzem w ilości 0,8 cm³/min. Po dwóch tygodniach hodowli do zbiornika pośredniczącego dodawano wariantowo 0,5 dm³: podłoża WP (próba kontrolna), wody destylowanej, wody destylowanej z jonami amonowymi, wody destylowanej z jonami fosforanowymi lub całkowicie wymieniano podłoże WP (1 dm³). Hodowlę prowadzono przez 4 tygodnie. Po zakończeniu każdej hodowli mierzono mokrą i suchą biomasę oraz zawartość głównego metabolitu, tj. werbaskozydu.



Schemat 1. Układ bioreaktora rozpyłowego; a) główny zbiornik, b) zbiornik pomocniczy; 1 – siatka, 2 – dysza rozpyłowa, 3,4 – termometr, 5 – wlot powietrza, 6 – króciec inokulacyjny, 7 – wylot powietrza, 8 – odpływ podłoża, 9 – filtr powietrza, 10 – szafa sterująca, 11 – pompa perystaltyczna, 12 – płaszcz grzewczy, 13 – termostat.

2.3. Oznaczanie świeżej i suchej masy

Po odsączeniu korzeni na bibule ważono świeżą (mokrą) masę i wynik wyrażano w g/kolbę i w g/dm^3 . W celu oznaczenia suchej masy, świeżą biomasę suszono w 100°C przez 60 min, a następnie przez 24 h w 80°C . Obliczano procentową zawartość suchej masy i zawartość suchej masy w g/kolbę i g/dm^3 .

2.4. Oznaczanie konduktancji i pH podłoża

Do oznaczenia konduktancji zastosowano aparat pH/konduktometr CPC-551 firmy „Elmetron” i czujnik konduktometryczny – typ CD-2 firmy „Hydrometr”. Wartość pH mierzono za pomocą elektrody ERH-11.

2.5. Analiza chemiczna składu podłoża

Zawartość sacharozy, glukozy i fruktozy oznaczano za pomocą aparatu HPLC firmy „Waters”, detektor RI 410, wykorzystano kolumnę Shodex SH-1011, jako eluent zastosowano 0,01 N roztwór kwasu siarkowego.

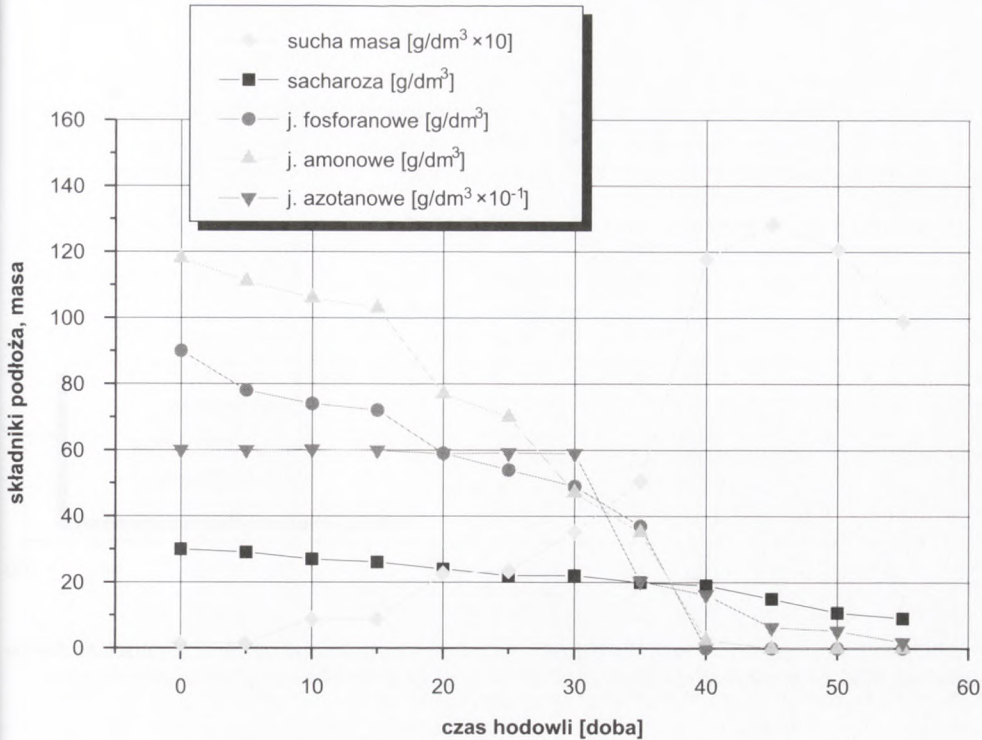
Zawartość ortofosforanów oznaczano według normy PN 89-C 04537/02, zawartość jonów amonowych – metodą salicylanową za pomocą testu Hasch – nr 8155, a zawartość jonów azotanowych – metodą redukcyjną z użyciem kadmu za pomocą testu Hasch – nr 8039.

2.6. Oznaczenie zawartości werbaskozydu w korzeniach

Wysuszone, rozdrobnione korzenie ekstrahowano metanolem i poddawano analizie chromatograficznej na zawartość werbaskozydu przy użyciu aparatu HPLC firmy „Waters”, wykorzystując detektor PDA przy długości fali 322 nm i kolumnę C – 18 – RP (0,39 × 15).

3. Wyniki i wnioski

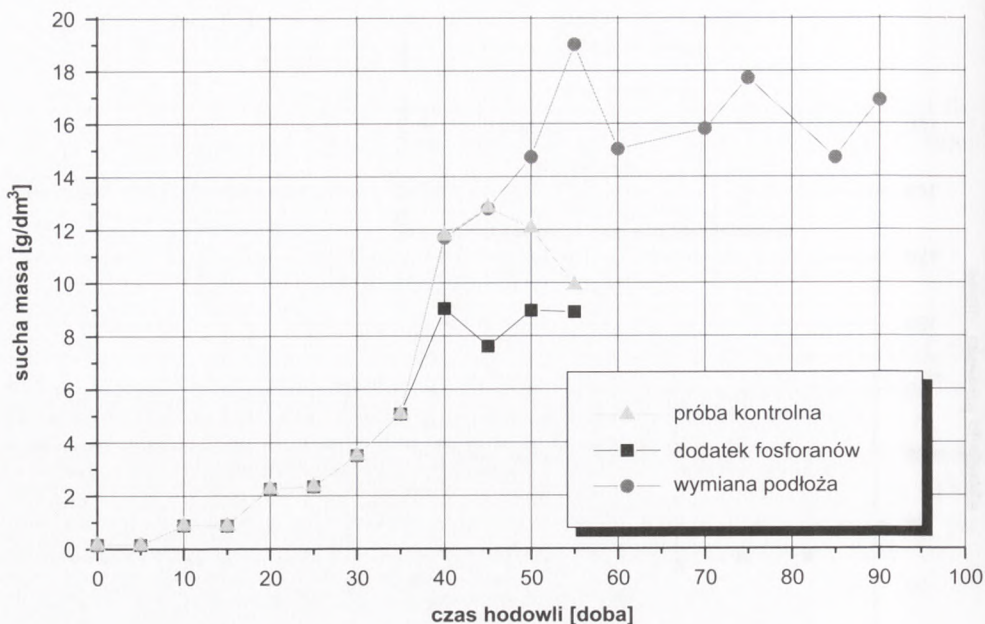
Badania prowadzono z użyciem kultur korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* szczep E w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym. Przeprowadzono trzy rodzaje hodowli korzeni transformowanych w kolbach wstrząsanych: próbę kontrolną w podłożu WP, hodowlę z całkowitą wymianą podłoża w 45 dobie, oraz hodowlę uzupełnioną w 25 dobie roztworem fosforanu potasowego do stężenia 170 mg/dm³. Po zakończeniu hodowli mierzono świeżą i suchą masę korzeni i oznaczano zawartość werbaskozydu w biomacie. W podłożu pochodowlanym oznaczano konduktancję i pH, a także zawartość jonów fosforanowych, amonowych i azotanowych. W próbie kontrolnej do piętnastego dnia przyrost biomasy był nieznaczny (faza adaptacyjna), w tym okresie obserwowano niewielki spadek cukru w podłożu, a także niewielkie zużycie jonów fosforanowych i amonowych, stężenie jonów azotanowych pozostawało na stałym poziomie. Wysoki przyrost biomasy obserwowano od 30 do 45 dnia hodowli, z jednoczesnym szybkim zużyciem sacharozy, jonów fosforanowych i amonowych; stężenie jonów azotano-



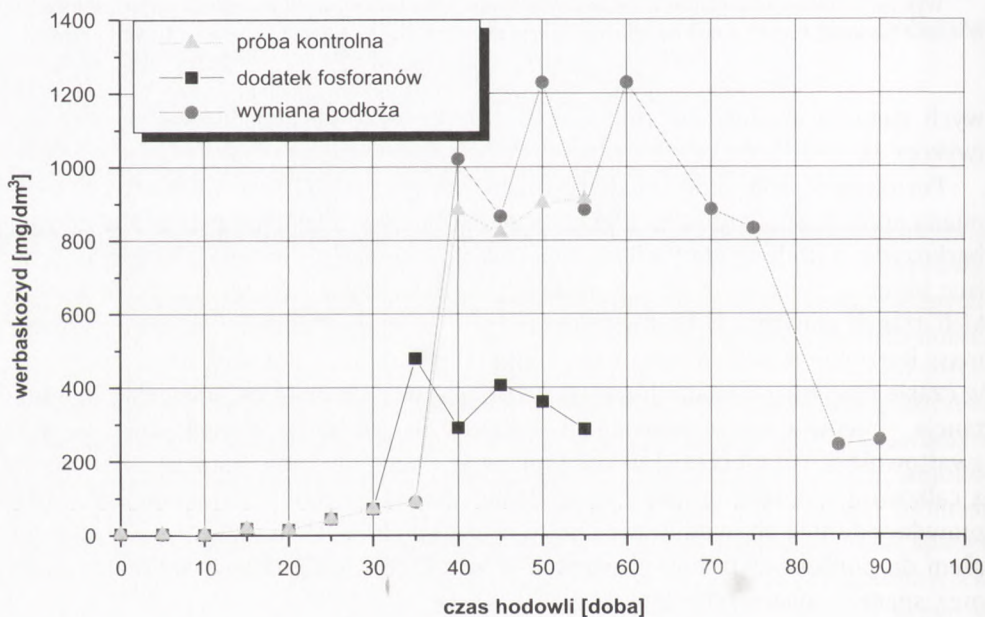
Wykres 1. Zmiany zawartości cukru, jonów fosforanowych, amonowych i azotanowych w podłożu WP w czasie hodowli korzeni włośnikowatych *Paulownia tomentosa*, przyrost biomasy – próba kontrolna.

wych spadało dopiero po prawie całkowitym wykorzystaniu jonów amonowych (wykres 1).

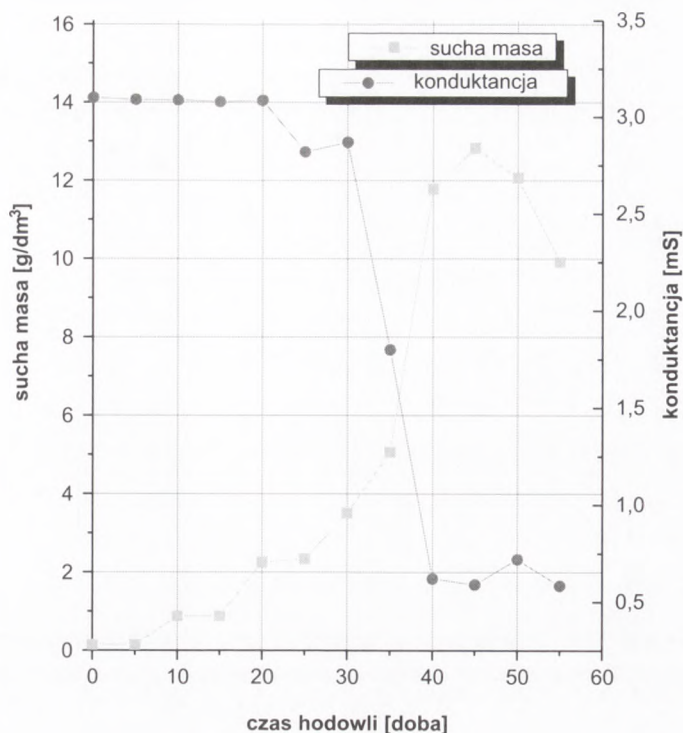
Porównano próbę kontrolną z pozostałymi wariantami hodowli. Całkowita wymiana podłoża spowodowała wyższy przyrost biomasy i zwiększenie produkcji werbaskozydu, a dodanie do podłoża jonów fosforanowych spowodowało niższy przyrost biomasy i w efekcie niższą produkcję werbaskozydu (wykres 2 i 3). We wszystkich trzech wariantach hodowli stwierdzono korelację między wzrostem suchej masy korzeni a spadkiem wartości konduktancji podłoża. We wszystkich kulturach, w czasie pierwszych 30 dni hodowli, gdzie przyrost biomasy był niewielki, konduktancja zmieniała się w niewielkim stopniu. Od 35 doby konduktancja spadała gwałtownie z równoczesnym szybkim przyrostem biomasy korzeni. W hodowli z całkowitą wymianą podłoża stwierdzono, że od 65 dnia konduktancja wzrasta, prawdopodobnie spowodowane jest to niszczeniem (destrukcją) korzeni i uwalnianiem do podłoża związków zawartych w komórce. Od 65 doby stwierdzono również spadek zawartości werbaskozydu.



Wykres 2. Przyrost suchej masy dla różnych wariantów kultur korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* w kolbach wstrząsanych.



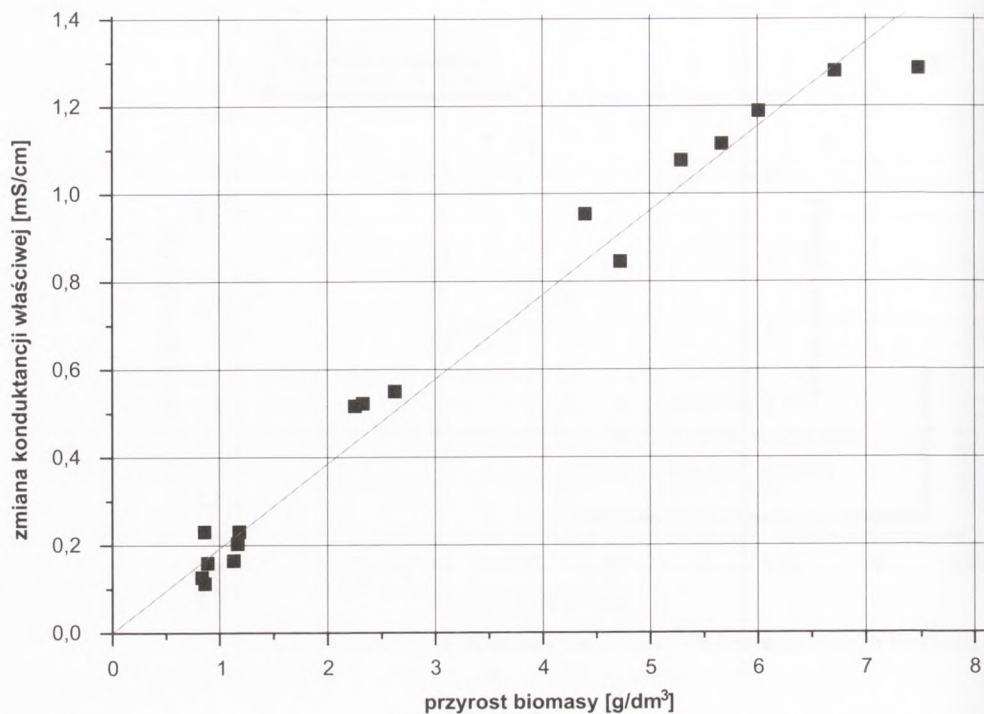
Wykres 3. Wydajność werbaskozydu dla różnych wariantów kultur korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* w kolbach wstrząsanych.



Wykres 4. Przyrost biomasy i zmiany konduktancji w czasie hodowli korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* w kolbach wstrząsanych – próba kontrolna.

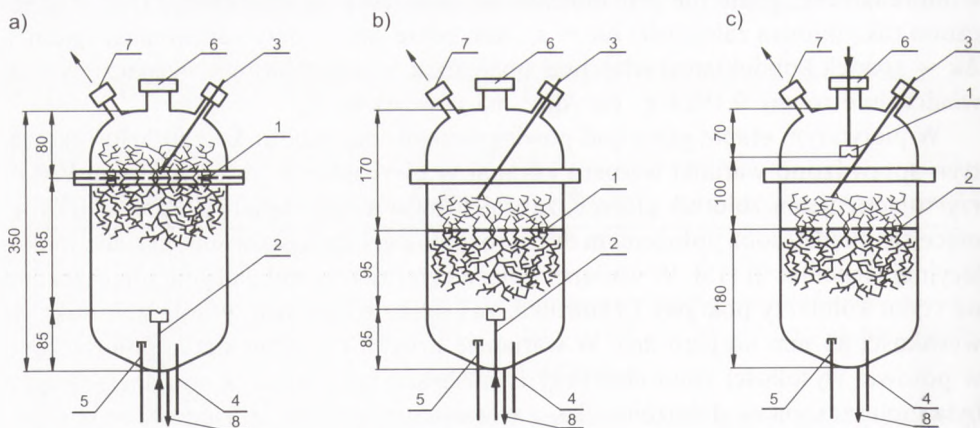
Pomiar konduktancji podłoża był dokonywany w celu znalezienia korelacji pomiędzy zmianą konduktancji i przyrostem biomasy. Wyznaczenie takiej zależności jest przydatne do określenia dynamiki wzrostu biomasy podczas hodowli korzeni w bioreaktorze, gdzie nie jest możliwe bezpośrednie jej oznaczenie (14). Wyznaczono taką liniową zależność: $\Delta\kappa = a \cdot \Delta m$, gdzie Δm – przyrost biomasy (g/dm^3), $\Delta\kappa$ – spadek konduktancji właściwej (mS/cm), a – współczynnik wyznaczony doświadczalnie równy $0,1924 \text{ g} \cdot \text{cm} / \text{dm}^3 \text{ mS}$ (wykres 4 i 5).

W pierwszym etapie pracy nad powiększeniem skali kultur korzeni włośnikowatych sprawdzono warunki wzrostu korzeni w bioreaktorze prototypowym. Wykorzystując ten sam zbiornik główny, zaprojektowano trzy warianty bioreaktora różniące się między sobą położeniem dyszy rozpyłowej i umiejscowieniem siatki inokulacyjnej (schemat 2) (15). W wariantie pierwszym siatkę inokulacyjną umieszczono na styku kołnierzy pokrywy i zbiornika, zaś dyszę rozpyłową w dole zbiornika na wysokości 85 mm od jego dna. W wariantie drugim i trzecim siatkę umieszczono w połowie wysokości zbiornika, przy czym dysza rozpylająca w wariantie drugim była umieszczona na dole zbiornika, a w wariantie trzecim zainstalowano ją w pokrywie zbiornika, w odległości 70 mm od jej powierzchni. Najbardziej optymalny do



Wykres 5. Wykres zależności zmian konduktancji właściwej od przyrostu biomasy.

wzrostu korzeni i wygodny dla użytkownika, jak się okazało, był wariant drugi. W wariantcie pierwszym zbyt wysoko umieszczona siatka, stanowiąca podporę korzeni, ograniczała rozwój korzeni do góry. W wariantcie trzecim, dysza rozpyłowa utrudniała inokulację.



Schemat 2. Warianty pracy bioreaktora.

W bioreaktorze o wybranej konstrukcji przeprowadzono pięć procesów hodowli korzeni włośnikowatych. Zbiornik pośredniczący napełniano 1 dm³ podłoża WP, a po dwóch tygodniach hodowli uzupełniano go wariantowo: 0,5 dm³ podłoża WP (próba kontrolna), wody destylowanej, wody destylowanej z jonami amonowymi, wody destylowanej z jonami fosforanowymi lub całkowicie wymieniano podłoże WP (1 dm³). Po zakończeniu, trwającej 4 tygodnie hodowli oznaczano świeżą i suchą masę korzeni oraz zawartość w nich werbaskozydu (tab., wykres 6). Najwyższy plon biomasy otrzymano w przypadku całkowitej wymiany podłoża (20,5 g suchej masy), najniższy, gdy podłoże uzupełniano wodą (10,5 g suchej masy). Największą produkcję werbaskozydu (1169 mg) uzyskano w hodowli z całkowitą wymianą podłoża WP. Mniejsza produkcja (939 mg) była w korzeniach z hodowli, w której pożywkę uzupełniono roztworem fosforanu potasu. Natomiast w hodowli bez wymiany podłoża (próba kontrolna) oraz z uzupełnianiem roztworem azotanu amonu lub uzupełnianiem wodą, zawartość werbaskozydu była na niższym poziomie (odpowiednio: 853 mg, 859 mg, 836 mg).

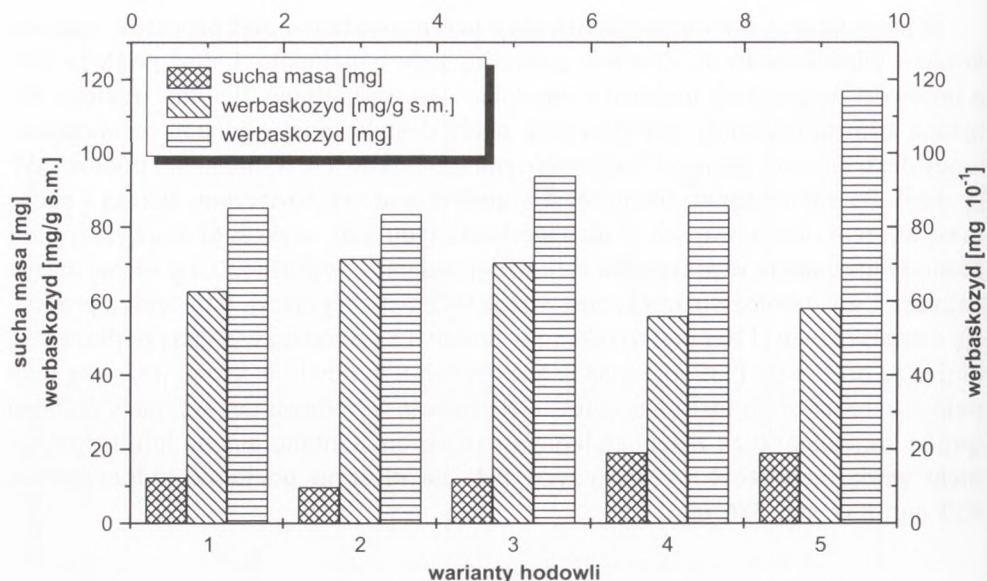
Tabela

Wyniki badań kultur korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* w bioreaktorze rozpyłowym o pojemności 5 dm³

Wariant hodowli	Sucha masa [g]	Werbaskozyd [mg/g s.m.]	Werbaskozyd całkowity [mg]
próba kontrolna	13,6	62,7 ± 6,2	853
dodatek wody	10,5	71,4 ± 2,9	835
dodatek wody z KH ₂ PO ₄	13,4	70,1 ± 2,6	939
dodatek wody z NH ₄ NO ₃	15,3	56,0 ± 2,2	859
wymiana podłoża	20,5	58,0 ± 1,6	1169

Z przeprowadzonych badań wynika, że dostarczenie nowych składników pożywki poprzez całkowitą wymianę podłoża prowadzi zarówno do znacznie większego namnożenia biomasy jak i do większej całkowitej produkcji werbaskozydu. Dodatek tylko jonu fosforanowego, który jest wykorzystywany bardzo szybko, nie powoduje większego przyrostu biomasy, ale przyczynia się do zwiększenia zawartości werbaskozydu. Odmienny był wpływ dodatku azotanu amonowego: obserwowano znaczny przyrost biomasy korzeni (taki, jak przy całkowitej wymianie podłoża), ale malała w niej zawartość werbaskozydu. W efekcie końcowym była ona podobna do zawartości w próbie kontrolnej.

Opisany wyżej bioreaktor posłużył jako model prototypowy bioreaktora laboratoryjnego o pojemności 10 dm³. Bioreaktor laboratoryjny zbudowany został ze stali kwasoodpornej i szkła. Szklany cylinder w dolnej części wyposażony jest w stalową „misę”, w której umieszczone są króćce do recyrkulacji pożywki, elektroda pH



Wykres 6. Przyrost biomasy i zawartość werbaskozydu w różnych wariantach hodowli: 1 – dolanie $\frac{1}{2}$ dm³ podłoża WP; 2 – dolanie $\frac{1}{2}$ dm³ wody destylowanej; 3 – dolanie $\frac{1}{2}$ dm³ wody destylowanej z KH₂PO₄; 4 – dolanie $\frac{1}{2}$ dm³ wody destylowanej z NH₄NO₃; 5 – wymiana podłoża (1 dm³).

i czujnik konduktometryczny. W pokrywie znajdują się 4 króćce inokulacyjne (umożliwia to równomierne rozłożenie inokulatu na siatce), wlot i wylot powietrza, czujniki temperatury. W części środkowej bioreaktora znajduje się siatka, stanowiąca podporę dla korzeni.

Praca finansowana z grantu KBN nr 5P05F05222.

Literatura

- Moriguchi K., Maeda Y., Satou M., Hardayani N. S. N., Kataoka M., Tanaka N., Yoshida K., (2001), *J. Mol. Biol.*, 307, 771-784.
- Nadolska-Orczyk A., (1999), *Biotechnologia*, 1(44), 116-124.
- Giri A., Narasu M. L., (2000), *Biotech. Adv.*, 18, 1-22.
- Wysokińska H., Chmiel A., (1997), *Acta Biotechnologica*, 17(2), 131-159.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., (2001), *Plant Science*, 161, 839-851.
- Flores H. E., Vivanco J. M., Loyola-Vargas V. M., (1999), *Trends in Plant Science*, 4 (6), 220-226.
- Inomata S., Yokoyama M., Gozu Y., Shimizu T., Yanagi M., (1993), *Plant Cell Rep.*, (12), 681-686.
- Ushiyama M., Asada Y., Yoshikawa T., Furuya T., (1989), *Phytochemistry*, 28(7), 1859-1869.
- Christey M. C., Sinclair B. K., Braun R. H., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 587-593.
- Yang D. C., Choi Y. E., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 491-496.

11. Kabziński K. M., Rózga M., Wysokińska H., Skrzypek Z., (1999), *Herba Polonica*, XLIII, 4.
12. Rózga M., Wysokińska H., Świątek L., (1993), *Planta Med.*, 59, 661.
13. Lloyd G., McCown B., (1980), *Int. Plant Prop. Cos.*, 30, 421-427.
14. Taya M., Hegglin M., Prenosil J. E., Bourne J. R., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 170-176.
15. Chmiel A., Ledakowicz S., Pawłowska B., (2001), 28th International Conference of Slivac Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare (SK), 21-25 May, 2002, Proceedings on CD ROM.