

Biotransformacje w kulturach komórek roślinnych.

Część II — Warunki procesów biotransformacji

Aleksander Chmiel¹

Halina Wysokińska²

Samodzielna Pracownia Biosyntezy Środków Leczniczych¹

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej²

Akademia Medyczna

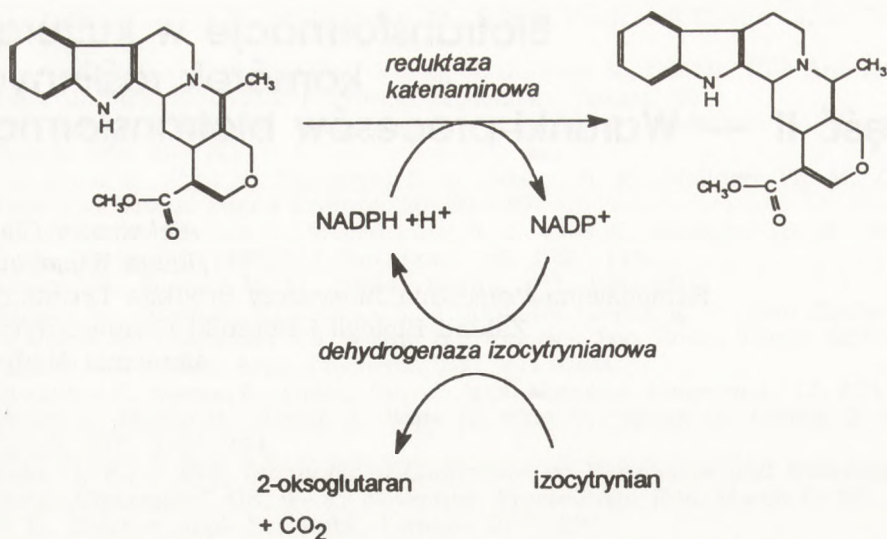
Łódź

W biotechnologii komórek roślinnych podstawowym sposobem prowadzenia procesu jest hodowla zawieszinowa w kolbach wstrząsanych lub bioreaktorach. W odniesieniu jednak do procesów biotransformacji korzystne mogą być również inne rozwiązania: użycie wyizolowanych enzymów, enzymów immobilizowanych, a zwłaszcza immobilizowanych komórek. Sposób prowadzenia procesu determinuje wymagania stawiane bioreaktorom. Wynikają one również z biologicznej natury komórek roślinnych, a zwłaszcza ich wrażliwości na warunki mieszania. Zagadnienia te będą przedmiotem pracy.

1. Biotransformacja z użyciem preparatów enzymatycznych

Komórki roślinne mogą metabolizować wprowadzone substraty w różny sposób, dając w rezultacie mieszaniny nie zawsze pożądanego produktu (1). W tych wypadkach celowe jest zastosowanie wyizolowanych enzymów. Enzymy użyte do biokonwersji muszą spełniać kilka warunków, z których najważniejsze to łatwa izolacja z kultur komórkowych oraz przedłużona stabilność katalityczna. Ponadto muszą być one dokładnie scharakteryzowane, powinna być znana ich specyficzność w odniesieniu do substratów oraz kofaktory. Wyizolowane enzymy mogą być stosowane w roztworze lub po unieruchomieniu w/na różnych nośnikach (2,3). Ta druga metoda pozwala na wielokrotne użytkowanie enzymów oraz zwiększa ich stabilność.

Duża część enzymów wymaga do swojej aktywności różnego typu kosubstratów lub kofaktorów, np. ATP, NAD, NADP, CoA. Użycie ich do procesu biotransformacji napotyka na znacznie większe trudności, aniżeli zastosowanie, np. enzymów hydrolitycznych. Regeneracja kofaktorów może zachodzić w żywych komórkach — w warunkach zapewnionego dostępu źródła energii, ale proponowane są również skojarzone układy enzymowe. Przykładem pierwszego rozwiązania jest przekształcenie katenaminy do ajmalicyny w perme-

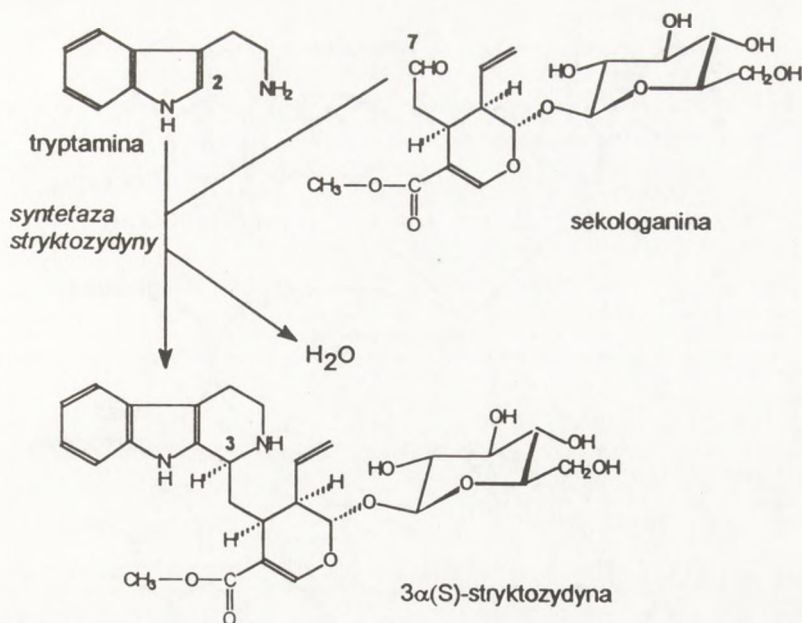


Rys. 1. Biotransformacja katenaminy do ajmalicyny w komórkach *Catharanthus roseus*. Pokazano układ enzymatyczny, w którym zachodzi regeneracja NADPH+H⁺ (4).

abilizowanych komórkach *Catharanthus roseus* (4). Zużywany w reakcji NADPH+H⁺ jest regenerowany przez funkcjonującą w tych samych komórkach dehydrogenazę izocytrynianową (rys. 1). Przykładem drugiego rozwiązania jest prezentowana dimeryzacja alkaloidów indolowych, wymagająca ciągłego dostarczania H₂O₂. Jeżeli wymagana jest regeneracja ATP, proponowane jest m.in. użycie immobilizowanej kinazy octanowej, syntetyzującej ATP kosztem acetylofosforanu (4).

Stosunkowo uboga wiedza o enzymach biorących udział w biogenezie metabolitów wtórnych oraz trudności związane z ich izolacją i oczyszczaniem sprawiły, że dotychczas opublikowano niewiele prac dotyczących biokonwersji z wykorzystaniem preparatów enzymatycznych wyizolowanych z kultur komórkowych. Pfitzner i Zenk (5) opisali metodę izolacji i immobilizacji syntetazy stryktozydyny z kultur komórkowych *Catharanthus roseus*. Enzym ten katalizuje stereospecyficzną reakcję kondensacji tryptaminy i monoterpenu sekologaniny. W wyniku tej reakcji powstaje 3 α (S)-stryktozydyna — bezpośredni prekursor alkaloidów indolowych (rys. 2).

Do szczególnie cennych metabolitów roślinnych należą winblastyna i winkrystyna — dimeryczne alkaloidy występujące w roślinach *Catharanthus roseus*, stosowane w terapii nowotworów. Koszt ich pozyskania z materiału naturalnego wynosi około 5 tys. USD/g, cena rynkowa do 20 tys. USD/g, a globalny rynek na te produkty szacowany jest na 50-75 mln USD (6). Pomimo licznych prób, jak dotąd, nie udało się uzyskać dostatecznie efektywnej biosyntezy tych alkaloidów w kulturach zawieszinowych *in vitro*; niewielkie ilości (ok. 10% w porównaniu do zawartości w liściach *C. roseus*) można uzyskać w kulturach korzeni transformowanych (7). Z uwagi na złożoną strukturę

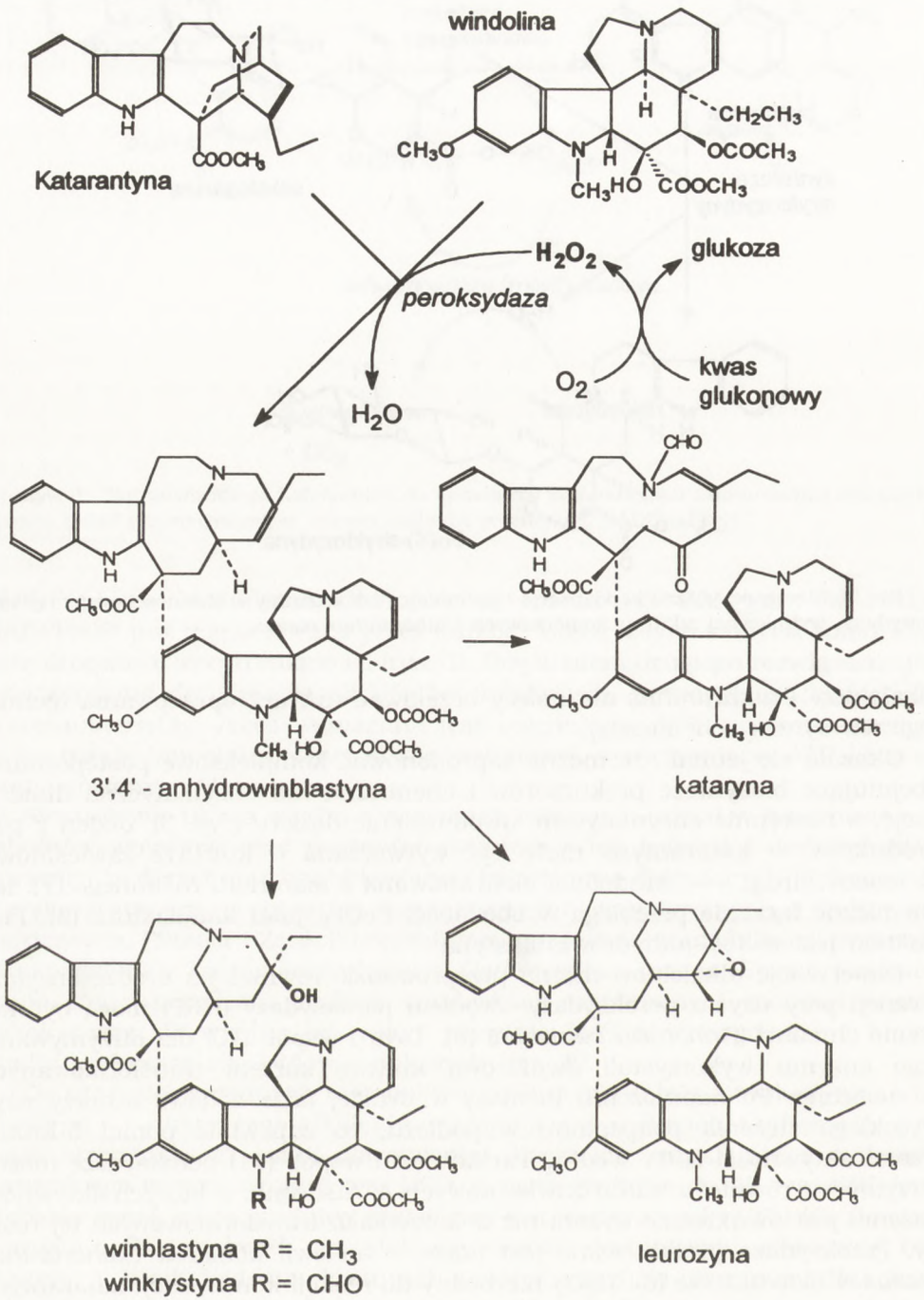


Rys. 2. Stereospecyficzna kondensacja tryptaminy i sekologaniny w obecności syntetazy stryktozydyny, wyizolowanej z kultur komórkowych *Catharanthus roseus*.

alkaloidów *Catharanthus* nie należy oczekiwać również opracowania technologii ich syntezy chemicznej.

Okazało się jednak, że można zaproponować kompleksowe postępowanie, obejmujące biosyntezę prekursorów i chemiczną lub enzymatyczną dimeryzację, a następnie enzymatyczne uwodornienie dimeru (rys. 3). Jeden z półproduktów — katarantyna może być wytwarzana w kulturze zawiesinowej *C. roseus*, drugi — windolina, ekstrahowana z materiału roślinnego (7). Ich chemiczne łączenie przebiega w obecności FeCl₃, jako katalizatora (8). Produktem jest α-3',4'-anhydrowinblastyna.

Dimeryzację alkaloidów można przeprowadzić również na drodze enzymatycznej, przy użyciu peroksydazy. Źródłem peroksydazy (HRP) mogą być korzenie chrzantu (*Armoracia rusticana*) (9). Taya i współ. (10) dla otrzymania tego enzymu wykorzystali dwufazową kulturę korzeni transformowanych *A. rusticana*. Po namnożeniu biomasy w drugiej fazie hodowli autorzy użyli wysokiego stężenia polipeptonu w podłożu, co zapewniło ponad 5-krotny wzrost aktywności HRP. Według Parkinsona i współ. (11) peroksydazę można otrzymywać również z kultur zawiesinowych *A. rusticana*, w których aktywność enzymu jest dwukrotnie wyższa niż w korzeniach transformowanych tej rośliny. Peroksydaza produkowana jest także w hodowli komórek *Catharanthus roseus* w bioreaktorze (6). H₂O₂ niezbędny do reakcji kondensacji katarantyny i windoliny (rys. 3) jest w sposób kontrolowany wytwarzany enzymatycznie w reakcji utleniania glukozy do kwasu glukonowego przy udziale oksydazy glu-



Rys. 3. Biosynteza dimerycznych alkaloidów indolowych o działaniu przeciwnowotworowym.

kozowej (np. z grzyba *Aspergillus niger*). Wydajność procesu dimeryzacji alkaloidów kształtuje się w granicach 25-70% (6,12). Produkt kondensacji jest następnie uwodniony (rys. 3) za pomocą surowej frakcji enzymatycznej z *C. roseus* (13). W podobny sposób otrzymano również inne alkaloidy dimeryczne: leurozynę, katarynę, winamidynę i 3-(R)-hydroksywinamidynę.

Z kultur zawiesinowych *Digitalis lanata* Peterson i współ. (14) wyizolowali i scharakteryzowali 12 β -hydroksylazę odpowiedzialną za reakcję biotransformacji 12 β -metylodigitoksyny do 12 β -metylodigoksyny. Autorzy przedstawili również technikę immobilizacji w żelu alginianowym mikrosomów *D. lanata*, z którymi związana jest 12 β -hydroksylaza. Po immobilizacji aktywność enzymu zachowana była w ok. 70% i utrzymywała się 20 godzin. Opracowano ciągły proces laboratoryjnego wytwarzania β -metylodigoksyny przy użyciu preparatu immobilizowanej 12 β -hydroksylazy.

Z innych enzymów wyizolowanych z kultur komórkowych wymienić należy syntetazę kwasu rozmarynowego z kultur zawiesinowych *Coleus blumei* (15). Z przeprowadzonych przez Papera i Franza badań (16) wynika, że kultury *Nerium oleander* mogą być wykorzystane do izolacji glukozylotransferazy steroidowej. Enzym ten przekształca różne aglikony kardenolidowe w odpowiednie glikozydy. Wcześniej, glukozylotransferaza steroidowa została znaleziona w kulturze komórkowej *Digitalis purpurea* (17). W komórkach tych enzym katalizował reakcje glukozytacji digitoksygeniny i digoksyny do purpureaglukozydu A. Yashikawa i Furuya (17) stwierdzili, że działa on szybciej i z dużo wyższą wydajnością jeżeli substratami są sterole, takie jak stygmasterol lub cholesterol.

2. Biotransformacja z użyciem komórek immobilizowanych

Obecnie coraz częściej w procesach biotransformacji wykorzystuje się komórki immobilizowane, tj. unieruchomione w/na odpowiednim nośniku (tab. 1).

TABELA 1

PRZYKŁADY BIOTRANSFORMACJI PRZY UŻYCIU IMMOBILIZOWANYCH KOMÓREK ROŚLINNYCH (4)

Roślina	Substrat	Produkt	Metoda immobilizacji
<i>Catharanthus roseus</i>	katenaminy	ajmalicyna	żel agarozowy
<i>Digitalis lanata</i>	digitoksyna	digoksyna	żel alginianowy
<i>Daucus carota</i>	digitoksygenina	periplogenina	żel alginianowy
<i>Daucus carota</i>	gitoksygenina	5-hydroksygitoksygenina	żel alginianowy
<i>Mentha spicata</i>	(-)-menton	(+)-neomentol	żel poliakrylamidowy
<i>Mucuna pruriens</i>	L-tyrozyna	DOPA	żel alginianowy
<i>Papaver somniferum</i>	kodeinon	kodeina	pianka poliuretanowa
<i>Papaver somniferum</i>	estry octoetanowe	3-hydroksymaślany	żel alginianowy
<i>Nicotiana tabacum</i>	ketoestry	hydroksyestry	żel alginianowy

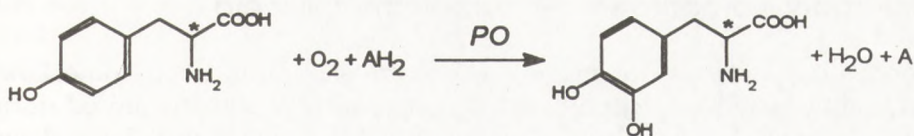
Metody stosowane do immobilizacji komórek roślinnych są w zasadzie podobne do technik wykorzystywanych dla mikroorganizmów. Najczęściej stosuje się unieruchamianie komórek w matrycach żelowych, takich jak alginian wapnia czy κ -karagenan. Immobilizacja komórek przez związanie ich z odpowiednim nośnikiem zapewnia pracę z wyższymi, aniżeli w zawieszynie, gęstościami komórek, co w końcowym efekcie umożliwia uzyskanie znacznie wyższego stężenia produktu. Dalszymi zaletami immobilizacji są: łatwiejsze wydzielanie produktu, możliwość wielokrotnego użycia komórek lub opracowania ciągłego procesu, ochrona komórek przed mechanicznym uszkodzeniem w bioreaktorze (zestawienie 1). W komórkach immobilizowanych reakcje biokonwersji przebiegają często z wyższą wydajnością niż w kulturach zawieszinowych. Pogląd ten został poparty wynikami badań z kulturą *Papaver somniferum*. W komórkach maku lekarskiego, immobilizowanych w alginianie wapnia, wydajność biokonwersji kodeinonu do kodeiny wynosiła 70,8% i była wyższa niż w kulturze zawieszinowej (60,8%) (18,19). Korzystne jest również znaczne przedłużenie (do sześciu miesięcy) aktywności enzymatycznej immobilizowanych komórek *P. somniferum*. Dalszy postęp w wytwarzaniu kodeiny przyniosły badania Corchete i Yeomana (20). Wykazali oni, że komórki *P. somniferum* immobilizowane w piance poliuretanowej przekształcają kodeinon do kodeiny z wydajnością 79%, przy czym większość produktu (ponad 87%) wydzielana jest do podłoża. Wydajność biokonwersji zwiększyła się jeszcze bardziej po usunięciu z podłoża fosforanu (20). Lindsey i Yeoman (21) stwierdzili, że metoda immobilizacji z użyciem pianki poliuretanowej zwiększyła żywotność komórek *Capsicum frutescens* i ich zdolność do biosyntezy alkaloidu kapsaicyny.

ZESTAWIENIE 1

KORZYŚCI WYNIKAJĄCE Z UŻYCIA ROŚLINNYCH KOMÓREK IMMOBILIZOWANYCH
W PORÓWNIANIU Z HODOWLĄ KOMÓREK W ZAWIESZYNIE

- możliwe wyższe zagęszczenie komórek
- możliwa większa agregacja komórek (samoimmobilizacja)
- możliwa zwiększona wydajność produktu
- wyższe stężenie końcowe produktu
- wyższa produktywność z jednostki objętości bioreaktora
- zwiększona stabilność fizjologiczna
- możliwe przedłużone utrzymanie komórek wolno namnażających się lub nie namnażających się
- łatwe oddzielenie biomasy od pożywki

Omówiona już hydroksylacja β -metylodigitoksyny do β -metylodigoksyny jest procesem biotransformacji szczególnie nadającym się do opracowania technologii z użyciem komórek immobilizowanych (22), ponieważ zarówno substrat jak i produkt są transportowane przez błonę komórkową. Aktywnie namna-



Rys. 4. Schemat reakcji biokonwersji L-tyrozyny do L-DOPA w kulturze komórkowej *Mucuna pruriens*. Reakcja katalizowana jest przez peroksydazę (PO). Jako kofaktor i reduktor służy askorbinian sodu (AH_2) (26).

żające się komórki *Digitalis lanata* z hodowli zawieszinowej immobilizowano w kuleczkach żelu alginianowego. Inkubacja uzyskanego preparatu w odpowiednim podłożu sprzyjała dalszemu namnażaniu komórek w żelu i uzyskaniu wysokiej aktywności biotransformacyjnej. Komórki immobilizowane były stabilne; podczas 170 dni nie stwierdzono obniżenia się ich aktywności (23).

O korzystnym wpływie immobilizacji świadczą także wyniki przeprowadzonych badań z kulturą *Mucuna pruriens* (24,25). Kultury komórkowe tej rośliny mają zdolność ortohydroksylacji L-tyrozyny do L-DOPA (rys. 4). L-DOPA jest prekursorem biogennej aminy dopaminy, a także jest znanym lekiem stosowanym w leczeniu choroby Parkinsona. Po immobilizacji komórek w alginianie, 90% powstającej L-DOPA było wydalane do podłoża, podczas gdy normalnie gromadzona jest ona wewnątrz komórek. Komórki unieruchomione w innych nośnikach (pektynianie, agarozie lub żelatynie) również przekształcały tyrozinę do L-DOPA, ale wydajności były niższe aniżeli przy zastosowaniu alginianu (26). W badaniach przeprowadzonych przez Prasa i współ. (27) okazało się, że immobilizowane komórki *Mucuna pruriens* wykazują bardzo szerokie spektrum w zakresie regioselektywnej ortohydroksylacji. Reakcja ta zachodzi zarówno w obecności monofenoli, jak i difenoli i trifenoli, dając w rezultacie różne katechole nieraz o interesujących właściwościach leczniczych. Świadczy to raczej o niskiej specyficzności odpowiedzialnej za te reakcje fenylooksydazy.

Nie zawsze jednak immobilizacja jest korzystna dla przebiegu procesów biotransformacji. Gbolade i Lockwood (28) stwierdzili, że komórki *Petroselinum crispum* unieruchomione w pianie poliuretanowej posiadają większą niż kultury zawieszinowe zdolność do przekształcania (izomeryzacja) geraniolu w nerol. Jednakże, jak się okazało, komórki takie były mniej efektywne (< 60%) dla prowadzenia reakcji redukcji takich substratów jak citral i citronellal (28).

Stosowane dotychczas metody immobilizacji są czasochłonne i bardzo kosztowne, co znacznie zwiększa nakłady na produkcję metabolitów wtórnych w warunkach *in vitro*. Większość produktów gromadzona jest w komórkach i nie zawsze można uzyskać efekt permeabilizacji. Ta ostatnia zwiększa koszt technologii. W miarę upływu czasu często obserwuje się degradację nośnika. Badania nad doskonaleniem metod immobilizacji mogą przynieść szereg nowych, bardziej użytecznych rozwiązań. Wyczerpujący przegląd zagadnień związanych z technologią roślinnych komórek immobilizowanych zawierają m.in. prace Hulsta i Trampera (29) oraz Williamsa i Mavituny (30).

3. Agregaty komórkowe — samoimmobilizacja

Interesującym rozwiązaniem jest tworzenie się w kulturach komórkowych dużych, mniej lub bardziej regularnych agregatów. W odróżnieniu od normalnie występujących w hodowli zawieszinowej — luźnych wielokomórkowych połączeń i kłaczek, agregaty te zachowują dużą trwałość mechaniczną. Tendencja do tworzenia agregatów wynika z naturalnego mechanizmu namnażania komórek w formie tkanek, ale w kulturach *in vitro* może się przejawiać w różnym stopniu, zależnie od użytej linii komórkowej. Poza tym, powstawaniu agregatów mogą sprzyjać warunki hodowli: skład chemiczny podłoża, rodzaj bioreaktora, warunki mieszania w bioreaktorze. Tsoulpha i Doran (31) zmieniając typ cytokinin otrzymali kultury zawieszinowe *Solanum aviculare* zawierające jedynie zwarte, regularne agregaty 0,4 – 2 cm średnicy. Hegglin i współl. (32) uzyskali trwałe agregaty *Coffea arabica* i *Nicotina tabacum*, stosując specjalny układ eksperymentalny; bioreaktor fluidalny zapewniał łagodne warunki mieszania. Podłoże odbierane z górnej części bioreaktora było podawane za pomocą pompy do specjalnego zbiornika (oksygenatora), w którym następowało jego intensywne natlenianie, po czym ponownie było pompowane od dołu do bioreaktora. W warunkach małego stresu hydrodynamicznego zachodził proces samoimmobilizacji komórek i tworzyły się kilkumilimetrowe agregaty. Uzyskano wysoką szybkość wzrostu biomasy i jej duże zagęszczenie w bioreaktorze.

Duże, zwarte agregaty komórek mogą stwarzać niekorzystne warunki dyfuzji tlenu oraz substratów i produktów w strefie wewnętrznej. Efektem jest wówczas autoliza biomasy wewnątrz agregatów. Od ich wielkości może zależeć również efektywność syntezy produktu. W kulturze *Tagetes patula* obserwowano występowanie centralnej strefy autolizy w agregatach o średnicy ponad 5 mm (33). Dla ograniczenia oddychania krytyczna wartość średnicy była jeszcze niższa i wynosiła 3 mm. Na uwagę zasługuje to, że biosynteza produktów tiofenowych, która nie zachodziła w hodowli zawieszinowej, wyraźnie nasilała się w agregatach o średnicy powyżej 3 mm, a najefektywniej przebiegała w agregatach rzędu 11 – 13 mm. Powyżej 13 mm wewnątrz agregatów występowały znaczne przestrzenie wolne od biomasy i biosynteza produktu ulegała redukcji (33). Do opracowania procesów biotransformacyjnych, jak się wydaje, interesujące jest wykorzystanie techniki samoagregacji biomasy.

4. Bioreaktory do procesów biotransformacji

Panda i współl. (34), analizując przydatność różnych typów bioreaktorów do procesów z komórkami roślinnymi, dzieli je na dwie zasadnicze grupy bioreaktorów: 1) do hodowli zawieszinowych i 2) do procesów z komórkami immobilizowanymi. Wynika to zarówno z różnic konstrukcyjnych, jak i warunków procesowych. Zasadniczo, pozostając przy tym podziale, uważamy jednak, że istnieją również rozwiązania konstrukcyjne spełniające wymogi techniczne sta-

wiane obydwu typom procesów. Pominiemy tu najprostsze „bioreaktory”, jakimi są kolby wstrząsane; są one powszechnie stosowane z powodzeniem do hodowli zawiesinowych we wszystkich pracach biotechnologicznych.

4.1. Bioreaktory do hodowli komórek w zawieszynie

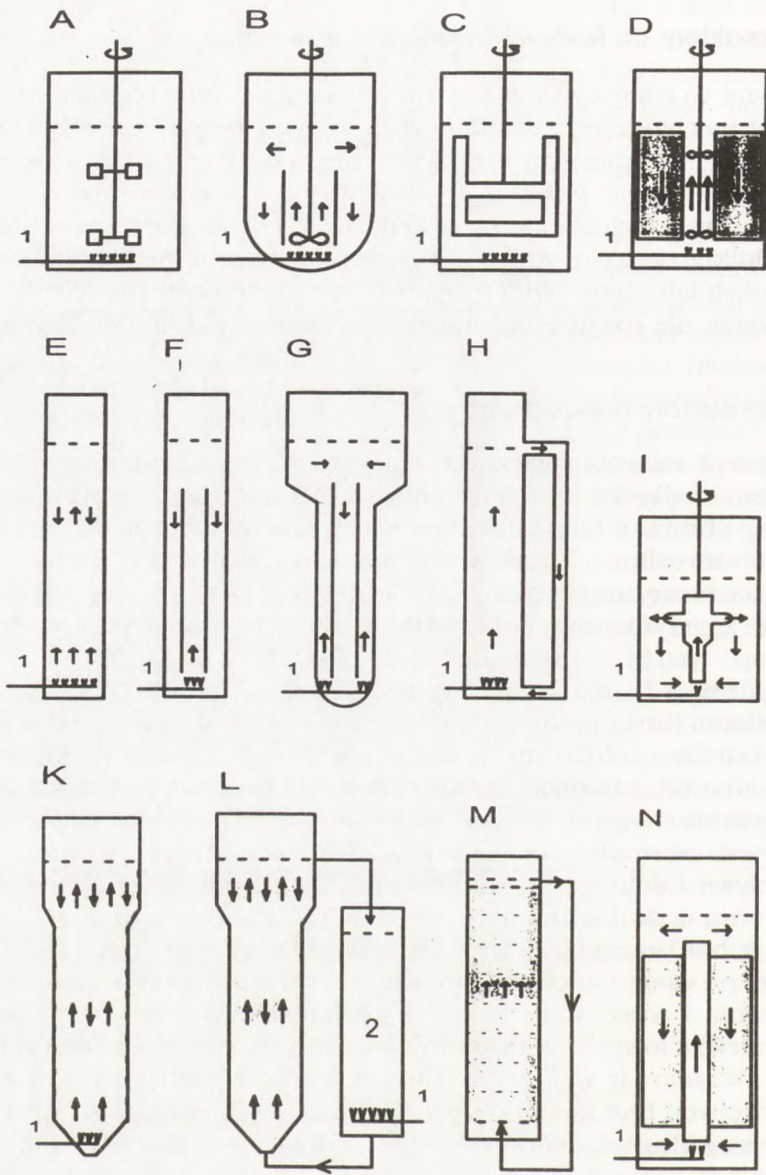
Najczęściej wykorzystywane są dwa podstawowe typy bioreaktorów: 1) wyposażone w mechaniczne mieszadło oraz 2) typu *airlift*, w których mieszanie jest wymuszone strumieniem przepływającego powietrza. Za pomocą tych bioreaktorów opracowano technologie w skali kilku i kilkudziesięciu m³. Większość opracowań technologicznych kończy się jednak obecnie na skali kilkunastu lub kilkudziesięciu litrów. Zarówno bioreaktory: mieszadłowe o specjalnej konstrukcji jak i typu *airlift* mogą być wykorzystywane nie tylko do hodowli zawiesinowych, ale również do procesów z komórkami immobilizowanymi.

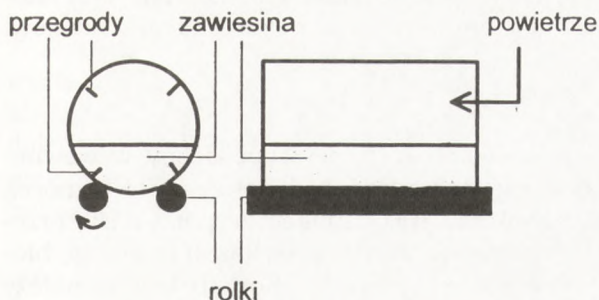
4.1.1. Bioreaktory mieszadłowe

W procesach mikrobiologicznych klasycznym rozwiązaniem jest bioreaktor z mieszadłem i bełkotką (rys. 5A). Wrażliwość komórek roślinnych na ścinanie wywołwane obrotami mieszadła, sprawia, że bioreaktory mieszadłowe do hodowli komórek roślinnych należy do tego celu odpowiednio dostosować. Proponowane są różne rozwiązania techniczne warunków mieszania. Najczęściej stosuje się zmodyfikowane mieszadła o dużych wymiarach i zmienionym kształcie (np. rys. 5C) oraz niskie obroty (34-36).

W klasycznych bioreaktorach wyposażonych w mieszadła tarczowe z płaskimi łopatkami (turbina Rushtona, rys. 5A) w strefie pracy wirnika występuje mieszanie burzliwe i duże siły ścinające. W innych strefach bioreaktora mieszanie ma charakter bardziej łagodny; mogą tworzyć się nawet strefy martwe o złej wymianie masy i sedymentacji komórek. Przeciwnieństwem turbiny Rushtona jest mieszadło śmigłowe (rys. 5B), zapewniające warunki laminarnego przepływu i dobrego makromieszania w całej objętości zawiesiny. W połączeniu z rurą cyrkulacyjną i odpowiednio ukształtowanym dnem, mieszadła te stwarzają bardzo zachowawcze warunki hodowli komórek.

Obecnie, po wielu latach przeprowadzonych doświadczeń, problem warunków mieszania i wrażliwości komórek roślinnych na siły ścinające w bioreaktorach mieszadłowych analizowany jest szerzej, z uwzględnieniem różnych aspektów. Okazało się np., że wrażliwość komórek różnych roślin lub nawet selekcyjonowanych linii komórkowych tej samej rośliny może się znacznie różnić. Znane są kultury komórkowe o dużej odporności mechanicznej (37). Poza tym, komórki w hodowli zawiesinowej mają tendencję do występowania w większych skupieniach (kłaczkach). Intensywne mieszanie mechaniczne ogranicza ich rozwój i zapewnia utrzymanie bardziej homogennej zawiesiny. Dobór warunków mieszania pozwala na kontrolowanie wielkości i zawartości kłaczek, a pośrednio wpływa na właściwości reologiczne zawiesiny. Wielkość kła-





Rys. 6. Obrotowy bioreaktor bębnowy.

czków lub bardziej trwałych agregatów może wpływać na efektywność procesu technologicznego.

4.1.2. Bioreaktory typu *airlift*

Spośród opracowanych typów bioreaktorów z pneumatycznym mieszaniem, rozwiązaniem szczególnie zalecanym do hodowli komórek roślinnych jest bioreaktor *airlift* z cyrkulacją wewnętrzną (rys. 5F,G), prostszy w budowie i tańszy w eksploatacji od bioreaktora mieszadłowego, a równocześnie zapewniający bardziej jednorodne warunki pracy (mieszania) i zdefiniowany charakter przepływu zawiesiny w porównaniu do kolumny z bełkotką (rys. 5E). Przepływ ten jest podobny jak w bioreaktorach z mieszadłem śmigłowym, a równocześnie nie występują trudności z uszczelnianiem wału mieszadła. Dużą zaletą bioreaktorów typu *airlift* jest małe zużycie mocy na mieszanie. Korzystnym rozwiązaniem jest zmiana kierunku przepływu zawiesiny (wynoszenie na zewnątrz i opadanie wewnątrz rury cyrkulacyjnej) oraz zastosowanie większej średnicy w górnej części bioreaktora (rys. 5G). Zmniejsza to tendencję pienia się hodowli, wynoszenia komórek do strefy piany i osadzania się ich na ścianie bioreaktora (38).

Interesującym rozwiązaniem jest hybrydowy bioreaktor typu *airlift cell-lift* (39), w którym strumień pęcherzyków powietrza wprowadzany jest do bioreaktora centralnie w stosunku do wirującego cylindra z otwartymi ramionami,

Rys. 5. Podstawowe typy bioreaktorów; A – C i E – I: bioreaktory do procesów z komórkami w zawieszynie, D i K – L: bioreaktory do procesów z komórkami immobilizowanymi; 1 – wlot powietrza, 2 – oksygenator.

A – klasyczny bioreaktor mieszadłowy z turbiną Rushtona, B – bioreaktor z mieszadłem śmigłowym i rurą cyrkulacyjną, C – bioreaktor z mieszadłem przystosowanym do zawieszin komórek roślinnych, D – bioreaktor mieszadłowy ze złożem komórek immobilizowanych, E – bioreaktor kolumnowy z bełkotką, F – klasyczny bioreaktor typu *airlift* z obiegiem wewnętrznym, G – bioreaktor typu *airlift* z odwróconym kierunkiem cyrkulacji zawiesiny i rozszerzoną częścią górną, H – bioreaktor typu *airlift* z obiegiem zewnętrznym, I – bioreaktor typu *airlift cell-lift* z wirującą rurą cyrkulacyjną spełniającą również rolę mieszadła, K – bioreaktor kolumnowy ze złożem upakowanym, L – bioreaktor kolumnowy ze złożem upakowanym i recyrkulacją zewnętrzną cieczy napowietrzanej w oksygenatorze, M – sekcyjny bioreaktor kolumnowy ze złożem upakowanym, N – bioreaktor typu *airlift* ze złożem komórek immobilizowanych.

spełniającego równocześnie funkcję rury cyrkulacyjnej i mieszadła. Przy stosunkowo niskich obrotach uzyskuje się dobre wymieszanie i natlenienie zawiesiny.

4.1.3. Bioreaktory bębnowe

Poziomy bęben obracający się na rolkach (rys. 6), wyposażony w wewnętrzne przegrody zapewnia dobre natlenienie hodowli o dużej gęstości komórek przy małym stresie hydrodynamicznym (34, 40). Tanaka i współ. (40) w przeprowadzonych badaniach z *Lithospermum erythrorhizon* wykazali przewagę bioreaktora bębnowego nad mieszadłowym oraz typu *airlift*. Konstrukcja ta należy jednak do rozwiązań, które nie rokują obecnie perspektywy zastosowań przemysłowych, głównie z uwagi na ograniczone możliwości powiększania skali.

4.2. Bioreaktory do komórek immobilizowanych

Z uwagi na gromadzenie się roślinnych metabolitów najczęściej wewnątrz komórek, immobilizowane komórki roślinne nie stanowią atrakcyjnego modelu badawczego, a tym bardziej technologicznego dla procesów biosyntezy. Odmiennie przedstawia się sytuacja w obszarze biotransformacji substratów egzogennych. Produkty takich biotransformacji są zazwyczaj transportowane poza komórką, co w pełni uzasadnia użycie komórek immobilizowanych; celem immobilizacji jest bowiem przede wszystkim ich powtórne (wielokrotne) użycie. Zasadnicze rozwiązania konstrukcyjno-technologiczne proponowane w tym zakresie przedstawiono w zestawieniu 2.

ZESTAWIENIE 2

BIOREAKTORY DO PROCESÓW Z UŻYCIEM KOMÓREK IMMOBILIZOWANYCH

Sposoby immobilizacji: typy bioreaktorów
Zamykanie w żelu lub w innych materiałach porowatych: <ul style="list-style-type: none"> • modyfikacje bioreaktorów mieszadłowych • bioreaktory kolumnowe <i>airlift</i> • bioreaktory kolumnowe ze złożem fluidalnym • bioreaktory kolumnowe ze złożem upakowanym
Immobilizacja w/na materiałach włóknistych: <ul style="list-style-type: none"> • modyfikacje bioreaktorów <i>airlift</i> • modyfikacje bioreaktorów mieszadłowych
Immobilizacja w systemach membranowych: <ul style="list-style-type: none"> • bioreaktory z membranami płaskimi • bioreaktory z wydrążonymi włóknami <i>hollow fiber</i>
Samoimmobilizacja — agregaty komórkowe: <ul style="list-style-type: none"> • bioreaktory <i>airlift</i> • bioreaktory ze złożem fluidalnym
Korzenie, korzenie transformowane <ul style="list-style-type: none"> • modyfikacje bioreaktorów mieszadłowych • bioreaktory <i>airlift</i> i ich modyfikacje

4.2.1. Bioreaktory kolumnowe

Szeroko wykorzystywana jest technika immobilizacji w kuleczkach żelowych, np. w alginianie wapnia. Do takiej formy biokatalizatora zalecane są szczególnie bioreaktory kolumnowe typu *airlift* (rys. 4F) lub ze złożem fluidalnym i recyrkulacją zewnętrzną (34, rys. 4L). Te ostatnie używane są również do procesów z agregatami komórkowymi, powstającymi w procesie samoimmobilizacji (35).

Jeżeli używane są bioreaktory kolumnowe ze złożem upakowanym, wówczas podczas powiększania skali wykonuje się bioreaktory sekcyjne (rys. 4M) z przegrodami (siatkami) na kilku poziomach z uwagi na wysokość złoża i jego ograniczoną wytrzymałość mechaniczną na ściskanie. Kolumny takie proponowane są jako bioreaktory z recyrkulacją lub przepływowe do pracy ciągłej.

Bioreaktory ze złożem upakowanym lub fluidalnym są szczególnie przydatne w procesach biotransformacji, w których nie zachodzi wymiana gazowa (oddychanie). W procesach biosyntezy, wymagających dobrego natlenienia, złoża upakowane są nieprzydatne. Złoża fluidalne mogą być utrzymywane pneumatycznie — przez wprowadzanie strumienia powietrza (rys. 5K) lub hydraulicznie — w wyniku recyrkulacji cieczy (rys. 5L) z odpowiednią szybkością. W drugim rozwiązaniu natlenianie cieczy proponuje się w zewnętrznym oksygenatorze (35).

W bioreaktorach fluidalnych oraz typu *airlift* występuje ścieranie się kuleczek żelowych, co bardzo ogranicza ich przydatność do procesów przemysłowych. Proponowane są bioreaktory z kuleczkami umieszczonymi w klatkach z siatki ze stali kwasoodpornej (40). Dla komórek immobilizowanych w materiałach włóknistych również zalecane są zmodyfikowane bioreaktory *airlift* ze złożem stałym (rys. 5N, 39). Proces rozpoczyna się od hodowli zawieszinowej, a w miarę upływu czasu hodowli zachodzi immobilizacja komórek wewnątrz materiału włóknistego (41).

4.2.2. Bioreaktory mieszadłowe

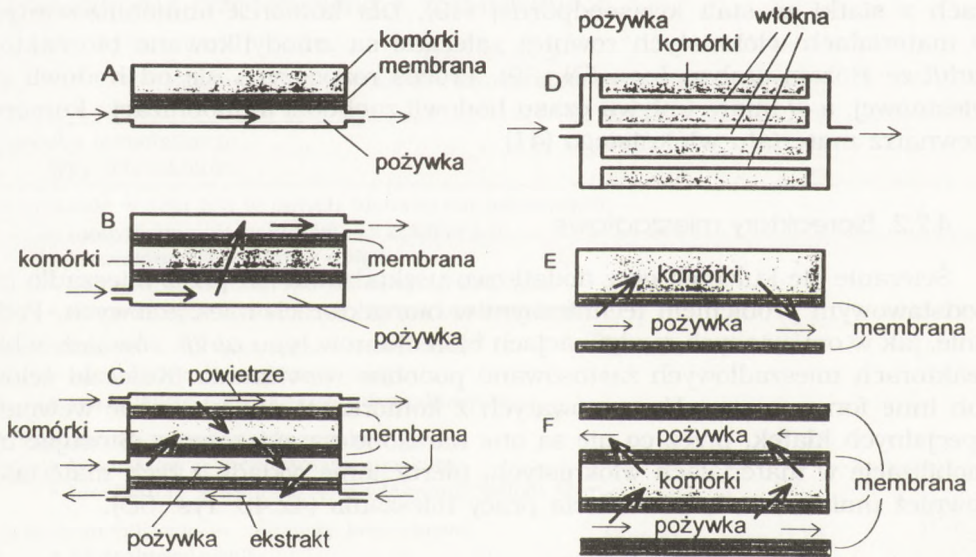
Ścieranie się kuleczek oraz dodatkowo uszkodzanie ich przez mieszadło jest podstawowym problemem technicznym w bioreaktorach mieszadłowych. Podobnie, jak w omówionych modyfikacjach bioreaktorów typu *airlift*, również w bioreaktorach mieszadłowych zastosowano podobne rozwiązania. Kuleczki żelowe lub inne formy materiałów porowatych z komórkami umieszcza się wewnątrz specjalnych klatek, przez co nie są one narażone na zniszczenie. Stosując immobilizację w materiałach włóknistych, nieruchome wkłady z tych materiałów również umieszcza się poza strefą pracy mieszadła (42,43, rys. 5D).

4.2.3. Bioreaktory membranowe

Bioreaktory membranowe (rys. 7) proponowane do hodowli komórkowych rozwiązują problem immobilizacji komórek, równocześnie z uzyskaniem ma-

ksymalnego ich zagęszczenia, możliwego w warunkach technicznych. Cała masa komórkowa jest zamknięta w przestrzeni pomiędzy półprzepuszczalnymi membranami. Jest ona wcześniej namnożona w hodowli zawieszinowej. Wymiana substratów i produktów biotransformacji zachodzi w procesie dyfuzji przez membranę o odpowiednio dobranych porach. Dostępne są produkty wielu firm wytwarzających zestawy do mikro- i ultrafiltracji. Materiał, z którego wykonana jest membrana musi być termostabilny ze względu na warunki sterylizacji bioreaktora. Yoon i Prenosil (44) zastosowali, np. membrany poli-propylenowe o porach rzędu 0,04 mm (stopień porowatości 45%), produkowane przez Celanese Corp., USA.

Bioreaktory z membranami płaskimi (rys. 7A-C) mogą być wyposażone w jedną, dwie lub więcej membran; omówienie tych rozwiązań zawarte jest w pracy Pandey i współ. (34). Do bardziej interesujących należy bioreaktor z trzema membranami (rys. 7C), zapewniającymi wymianę substratu i produktu w fazie wodnej, ekstrakcję produktu poza bioreaktor oraz wymianę gazową (O_2 , CO_2). Jednakże należy stwierdzić, że bioreaktory z płaskimi membranami nie są najbardziej korzystnym rozwiązaniem, jeżeli podczas procesu występuje intensywne oddychanie komórek. Zasadnicze bariery stwarza również powiększanie skali tych bioreaktorów. Problemem technicznym może być duża gęstość komórek i związane z tym utrudnione warunki dyfuzji substratu i produktu. W bioreaktorach z membranami płaskimi ogranicza to grubość



Rys. 7. Bioreaktory membranowe; A-C: bioreaktory z membranami płaskimi, D: bioreaktory z wydrążonymi włóknami (*hollow fiber*), E,F: kierunki transportu substratów i produktów przez membrany, którymi są ścianki włókien; objaśnienia w tekście.

warstwy biomasy i prowadzi do budowy bioreaktorów wielowarstwowych (wielomembranowych).

Alternatywnym rozwiązaniem jest bioreaktor rurowy z wiązką wydrążonych włókien (*hollow fiber reactor*, rys. 7D). Wiązka włókien o ścianach mikroporowatych umieszczona jest w rurze, której końce zakończone są podwójnymi ścianami. W ścianach wewnętrznych mocowane są wydrążone włókna, tj. rurki, przez które przepływa roztwór substratu. Komórki umieszczone są najczęściej w przestrzeni międzyrurkowej. Z uwagi na możliwą dużą liczbę włókien (kilkadziesiąt lub nawet ponad sto) umieszczonych wewnątrz złoża komórek, wymiana masy w całym układzie jest ułatwiona. Z dwóch możliwych układów: a) jedna wiązka włókien doprowadzająca substrat i odprowadzająca produkt (rys. 7E), b) dwie wiązki włókien — jedna zasilająca, druga odprowadzająca (rys. 7F), znacznie efektywniejszy jest układ drugi.

Dotychczas, modele bioreaktorów membranowych dla komórek roślinnych badane są w małej skali laboratoryjnej. Możliwość ich produkcyjnego wykorzystania została udokumentowana w biotechnologii komórek zwierzęcych (45).

5. Uwagi końcowe

Biotechnologie z wykorzystaniem roślinnych kultur komórkowych *in vitro* są przedmiotem prac licznych zespołów. Główny nurt badań dotyczy procesów biosyntezy *de novo* biologicznie czynnych metabolitów wtórnych. Spośród mniej niż dziesięciu technologii opracowanych do wdrożenia, prawdopodobnie tylko 2 – 3 zostały wdrożone do produkcji. Są to: otrzymywanie szikoniny, biomasy żeńszenia, metylodigoksyny. Tylko ostatnia technologia jest procesem biotransformacji. Spośród wielu przyczyn powolnego rozwoju przemysłowej biotechnologii komórek roślinnych, obok niewielkiego jeszcze stopnia znajomości i możliwości wykorzystania genetycznych i metabolicznych uwarunkowań procesów komórkowych, należy wymienić niską szybkość wzrostu i długi czas hodowli komórek *in vitro* oraz gromadzenie większości interesujących produktów wewnątrz komórek.

Na tym tle korzystnie pod względem technologicznym prezentuje się możliwość prowadzenia procesów biotransformacji. Komórki roślinne ze swoim bogatym aparatem enzymatycznym, mogą prowadzić bardzo różnorodne przekształcenia, pozwalające na otrzymanie związków chemicznych o pożądanych właściwościach. Substraty i produkty procesów biotransformacji najczęściej są transportowane przez błonę komórkową. Możliwe jest ponadto odwracalne lub trwałe zwiększenie przepuszczalności błony. Zabieg ten jest szczególnie korzystny w połączeniu z immobilizacją komórek, która stabilizuje ich aktywność. W efekcie, technologia biotransformacji ma jeszcze jeden bardzo istotny walor: raz wyhodowane komórki, po immobilizacji i innych obróbkach, mogą być wykorzystywane wielokrotnie w skróconych o namnażanie cyklach produkcyjnych. W ocenie autorów ten kierunek biotechnologii komórek roślinnych zasługuje na znacznie większą uwagę niż dotychczas.

Literatura

1. Barz W., Ellis B. E., (1980), *Natural Products as Medicinal Agents*, Eds. Beal J. L., Reinhard E., Hippokrates Verlage, Stuttgart, 447 - 507.
2. Kierstan M. P. J., Coughlan M. P., (1985), *Immobilized Cells and Enzymes*, Ed. Woodward J., IRL Press, Oxford, 39 - 48.
3. Woodward J., (1985), *Immobilized Cells and Enzymes*, Ed. Woodward J., IRL Press, Oxford, 3 - 18.
4. Felix H. R., (1987), *International Conference on Bioreactors and Biotransformations and Gleneagles*, UK, 9-12 November, Proceedings, Eds. Moody G.W., Baker P.B., Elsevier Appl. Sci. Publ., London, 277 - 286.
5. Pfitzner U., Zenk M. H., (1982), *Planta Med.*, 46, 10 - 14.
6. DiCosmo F., (1990), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Eds. Nijkamp H. J. J., van der Plas L. H. W., van Aartrijk J., Kluwer Academic Press, Dordrecht, 717 - 725.
7. Fujita Y., Hara Y., Morimoto T., Misawa M., (1990), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Eds. Nijkamp H. J. J., van der Plas L. H. W., van Aartrijk J., Kluwer Academic Press, Dordrecht, 738 - 743.
8. Vukovic J., Goodbody A. E., (1988), U.S. Patent 4,778,885.
9. Goodbody A. E., Endo T., Vukovic J., Kutney J. P., Choi L. S. L., Misawa M., (1988), *Planta Med.*, 43, 136 - 140.
10. Taya M., Yohama A., Nomura R., Kondo R., Matsui C., Kobayashi T., (1989), *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 31 - 34.
11. Parkinson M., Cotter T., Dix P. J., (1990), *Plant Science Lett.*, 66, 271 - 277.
12. Smith J. I., Amonzon E., Yamaguchi A., McLean S., DiCosmo F., (1988), *Biotechnol. Appl. Bioch.*, 10, 568 - 575.
13. Endo T., Goodbody A. E., Vukovic J., Misawa M., (1987), *Phytochem.*, 12, 3233 - 3234.
14. Petersen M., Alfermann A. W., Reinhard E., Seitz H. U., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 200 - 203.
15. Petersen M., Alfermann A. W., (1988), *Z. Naturforsch.*, 43C, 501 - 504.
16. Paper D., Franz G., (1989), *Planta Med.*, 55, 30 - 34.
17. Yoshikawa T., Furuya T., (1979), *Phytochemistry*, 18, 239 - 241.
18. Furuya T., Nakano M., Yoshikawa T., (1978), *Phytochemistry*, 17, 891 - 893.
19. Furuya T., Yoshikawa T., Taira M., (1984), *Phytochemistry*, 23, 999 - 1001.
20. Corchete P., Yeoman M. M., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 128 - 131.
21. Lindsey K., Yeoman M. M., (1984), *Planta*, 162, 495-501.
22. Alfermann A. W., (1985), *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Eds. Tramper J., van der Plas H. C., Linko P., Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 225 - 238.
23. Alfermann A. W., Bergmann W., Figur C., Helmbold U., Schwantag D., Schuller I., Reinhard E., (1983), *Plant Biotechnology*, Eds. Mantel S. H., Smith H., Cambridge University Press, Cambridge, 67 - 74.
24. Wichers H. J., Malingre Th. M., Huizing H. J., (1983), *Planta*, 158, 482 - 486.
25. Wichers H. J., Wijnsma R., Visser J. F., Malingre Th. M., Huizing H. J., (1985), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 4, 75 - 80.
26. Pras N., Hesselink P. G. M., Ten Tusscher J., Malingre Th. M., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 214 - 222.
27. Pras N., Booi G. E., Dijkstra D., Hovn A. S., Malingre Th. M., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 21, 9 - 15.
28. Gbolade A. A., Lockwood G. B., (1990), *Z. Naturforsch.*, 45C, 245 - 248.
29. Hulst A. C., Tramper J., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 546 - 558.
30. Williams P. D., Mavituna F., (1992), *Plant Biotechnology, Comprehensive Biotechnology*, Second Supplement, Eds. Fowler M. W., Warren G. S., Pergamon Press, Oxford, 63 - 76.
31. Tsoulpha P., Doran P. M., (1991), *Journal of Biotechnology*, 19, 99 - 110.

32. Hegglin M., Prenosil J. E., Bourne J. R., (1990), *Chimia*, 44, 26 – 32.
33. Hulst A. C., Meyer M. M., Breteler H., Tramper J., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 18 – 25.
34. Panda A. K., Mishra S., Bisaria V. S., Bhojwani S. S., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 386 – 397.
35. Scragg A. H., (1992), *Current Opinion in Biotechnology*, 3, 105 – 108.
36. Scragg A. H., (1992), *Plant Biotechnology, Comprehensive Biotechnology*, Second Supplement, Eds. Fowler M. W., Warren G. S., Pergamon Press, Oxford, 45 – 62.
37. Scragg A. H., Allan E. J., Leckie F., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 361 – 367.
38. Chmiel A., de Jesus M., Schwitzguébel J.-P., Zryd J.-P., (1993), *Biotechnologia*, 3(22), 56 – 60.
39. Kim D.-L., Pedersen H., Chin C. K., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 331 – 339.
40. Tanaka H., (1987), *Process Biochem.*, 8, 106 – 113.
41. Kobayashi Y., Fukui H., Tabata M., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 185-186.
42. Tom R., Jardin B., Chavarie C., Rho D., Archambault J., (1991), *J. Bacteriol.*, 21, 21 – 42.
43. Mavituna F., Park J., Williams P., Wilkinson A., (1987), *Plant and Animal Cells: Process Possibilities*, Eds. Webb C., Mavituna F., Horwood, Chichester, 92 – 115.
44. Yoon K-H., Prenosil J. E., (1989), *Swiss Biotech*, 7, 13 – 16.
45. Tyo M. A., Bulbulian B. J., Menken B. Z., Murphy T., (1988), *Animal Cell Biotechnology*, vol. 3, Eds. Spier R. E., Griffith J. B., Academic Press, London, 283 – 303.

Biotransformations using plant cell cultures.

Part II - Process conditions

Summary

Biological and biochemical conditions of biotransformation processes, applications of cell suspension, immobilised cells and enzyme preparations are discussed. The nature and form of biocatalysts determine the technical parameters of the process. Bioreactor systems for plant cell biotechnology are presented.

Key words:

plant cells, enzymes, biotransformations, bioreactors.

Adres dla korespondencji:

Halina Wysokińska, Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź,