

# Modyfikacja bioreaktora do hodowli komórek roślinnych

Aleksander Chmiel<sup>1</sup>

Maria de Jezus<sup>2</sup>

Jean-Paul Schwitzguébel<sup>2</sup>

Jean-Pierre Zrýd<sup>3</sup>

## 1. Wprowadzenie

Hodowla zawieszinowa komórek roślinnych *in vitro* stawia specjalne wymagania techniczne używanym do tego celu bioreaktorom. Stosowane są zazwyczaj konstrukcje oparte na dwóch typach bioreaktorów opracowanych dla procesów mikrobiologicznych; są to bioreaktory z mieszadłem mechanicznym oraz bezmieszadłowe typu *air-lift*. Ponieważ komórki roślinne są znacznie bardziej wrażliwe od drobnoustrojowych na działanie sił ścinających, preferowane są bioreaktory bezmieszadłowe, a w mieszadłowych konstruowane są specjalne typy mieszadeł i stosowana jest niska szybkość ich obrotów (1 - 3).

Mieszanie i napowietrzanie są przyczyną pienienia się hodowli, wynoszenia komórek z pianą nad powierzchnię cieczy i ich osadzanie się na ścianie bioreaktora i innych elementach znajdujących się nad poziomem hodowli. Pozbawione składników odżywczych komórki nie syntetyzują pożądanego produktu i ulegając autolizie zwiększają pienistość hodowli. W efekcie potęgowane jest dalsze „wynoszenie” komórek z zawiesiny. Stwarza to poważny problem technologiczny m.in. w hodowli komórek roślinnych, trwających zazwyczaj kilkanaście dób.

Problem taki wystąpił w pracy zespołu badawczego Uniwersytetu i Politechniki w Lozannie (4). W celu jego rozwiązania podjęto próbę modyfikacji oryginalnego laboratoryjnego bioreaktora typu *air-lift* firmy CHEMAP o pojemności całkowitej 14 l.

Jako model biologiczny użyto hodowlę zawieszinową *Beta vulgaris*. Prowadzono ocenę namnożenia komórek, pienienia się hodowli i adhezji komórek w górnej części bioreaktora. Wykonano pomiary objętościowego współczynnika wnikania tlenu z fazy gazowej do wody.

<sup>1</sup> Akademia Medyczna w Łodzi

<sup>2</sup> Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

<sup>3</sup> Université de Lausanne

## 2. Bioreaktora

oreaktor (rys. 1A) o średnicy wewnętrznej 150 mm i wyso-  
 wyposażony był w rurę cyrkulacyjną o średnicy 75 mm. Po-  
 w-  
 w-  
 po-  
 na styku dna i ściany bioreaktora zastosowano mieszadło śmigłowe z dolnym  
 napędem o obrotach  $150 \text{ min}^{-1}$ .

W celu zmniejszenia pienienia się hodowli i wynoszenia komórek z zawie-  
 siny zastosowano modyfikacje dokonujące zmiany:

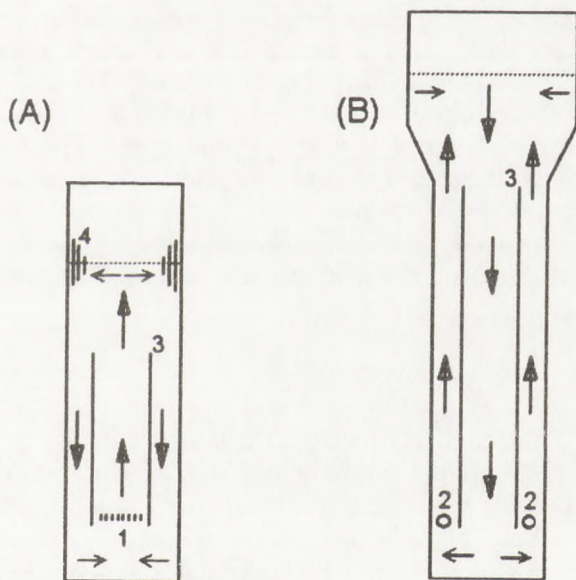
- 1) systemu napowietrzającego,
- 2) kierunku cyrkulacji zawiesiny,
- 3) geometrii górnej części bioreaktora (rys. 1B).

Przepływ powietrza w bioreaktorze typu *air-lift* spełnia dwa zadania: do-  
 starczenie tlenu do zawiesiny komórek oraz wymuszenie przepływu i miesza-  
 nia zawiesiny w bioreaktorze. Zasadniczymi czynnikami wpływającymi na te  
 dwa parametry są: szybkość przepływu powietrza i wielkość powierzchni mię-  
 dzyfazowej gaz-ciecz. Ta ostatnia zależy od stopnia rozdrobnienia powietrza,  
 czyli liczby i wielkości pęcherzyków wydostających się z urządzenia napowie-  
 trzającego.

W oryginalnym bioreaktorze powietrze włączane było przez kilkanaście  
 otworów o średnicy ok. 1 mm, dając rój pęcherzyków o średnicy kilku mm.  
 Zastosowano układ czterech cylindrycznych stalowych spieków porowatych  
 (średnica 10 mm, długość 25 mm, wielkości porów  $10 \mu\text{m}$ ) rozmieszczonych  
 symetrycznie na okręgu. Wykonano dwa układy: a) o średnicy 60 mm —  
 mniejszej od średnicy rury cyrkulacyjnej, b) o średnicy 120 mm — pośredniej  
 pomiędzy średnicą rury i bio-  
 reaktora. W pierwszym wypad-  
 ku zawiesina komórek w rurze  
 cyrkulacyjnej była przemiesz-  
 czana do góry, w drugim na-  
 tomiaś, kierunek ruchu za-  
 wiesiny był przeciwny (rys. 1).

Modyfikując bioreaktor  
 zwiększono jego średnicę w  
 górnej części (rys. 1B) przez

Rys. 1. Schemat bioreaktora i cyr-  
 kulacji zawiesiny komórek w bio-  
 reaktorze: (A) bioreaktor oryginalny,  
 (B) — bioreaktor zmodyfikowany.  
 Strzałki pokazują kierunek cyrkulacji  
 zawiesiny komórek. 1 — belkotka,  
 2 — spiek porowaty, 3 — rura cyrku-  
 lacyjna, 4 — depozyt komórek na ścia-  
 nie bioreaktora.



dodanie szklanego cylindra o średnicy 220 mm i wysokość konicznego stalowego łącznika o wysokości 150 mm. Taki i dwukrotne zmniejszenie prędkości przepływu zawiesiny komorne części bioreaktora.

### 3. Wyniki. Warunki pracy bioreaktora

Obserwacje hodowli komórek *Beta vulgaris* pozwoliły na ocenę użyteczności wprowadzonych modyfikacji bioreaktora. Powiększenie średnicy bioreaktora w górnej części, powodując spadek prędkości unoszenia komórek, prowadziło do zmniejszenia gęstości biomasy w strefie przypowierzchniowej. W efekcie obserwowano redukcję wynoszenia komórek do strefy piany nad hodowlą.

Zmiana kierunku przepływu (do góry w części przyściennej i do dołu w rurze cyrkulacyjnej) miała wpływ na zmniejszenie się przylegania komórek do ściany bioreaktora nad poziomem hodowli. Komórki były przemieszczane od ściany bioreaktora do jego części centralnej, gdzie następowało ich zasysanie do rury cyrkulacyjnej.

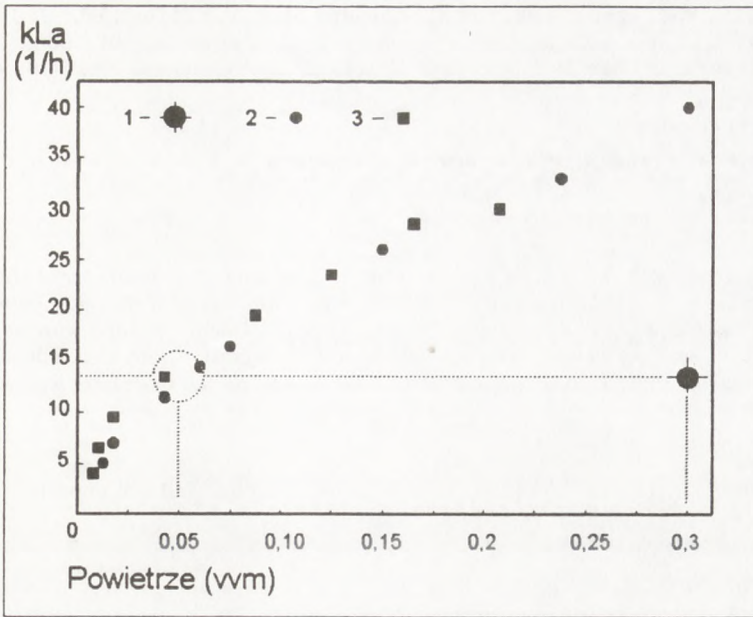
Oceniając warunki napowietrzania w zmodyfikowanym bioreaktorze wykonano pomiary współczynnika wnikania tlenu z powietrza do fazy wodnej. Zależność współczynnika  $k_{L}a$  od szybkości przepływu powietrza przedstawiono na rys. 2.

W oryginalnym bioreaktorze właściwe warunki mieszania i napowietrzania w fazie intensywnego namnażania komórek uzyskiwano przy szybkości przepływu powietrza 0,3 vvm, co odpowiadało wartości  $k_{L}a = 13,6h^{-1}$  (dla wody) i natlenieniu hodowli na poziomie 30%.

Zastosowanie nowego systemu napowietrzającego pozwoliło na uzyskanie (dla tej samej szybkości napowietrzania)  $k_{L}a = 40 h^{-1}$ , natomiast wartość  $k_{L}a = 13,6h^{-1}$  uzyskano dla szybkości napowietrzania 0,05 vvm, a zatem sześciokrotnie niższej aniżeli wymagana w bioreaktorze oryginalnym. Tak znaczna redukcja szybkości napowietrzania ma następujące znaczenie technologiczne: 1) zmniejszenie o ponad 80% zapotrzebowania na sprężone powietrze, co daje znaczny efekt ekonomiczny w skali przemysłowej, 2) redukcję sił ścinających, co ma znaczenie w hodowli wrażliwych na ścinanie komórek roślinnych, 3) zmniejszenie pienienia się hodowli i wynoszenia komórek do piany, 4) redukcję depozytu biomasy na ścianie bioreaktora.

### 4. Podsumowanie

Zjawisko wynoszenia komórek do fazy piany w bioreaktorze typu *air-lift*, w którym powietrze obok dostarczania tlenu spełnia również rolę czynnika mieszającego, było analizowanym obiektem badawczym. Spośród trzech modyfikacji bioreaktora największe znaczenie, jak się wydaje, ma zmiana układu napowietrzającego, powodująca zwiększenie powierzchni międzyfazowej wni-



Rys. 2. Zależność współczynnika  $k_{La}$  od szybkości przepływu powietrza. 1 — wartość dla bioreaktora oryginalnego w warunkach napowietrzania odpowiadających fazie intensywnego namnażania komórek, 2 i 3 — wartości dla zmodyfikowanego układu napowietrzającego, 2 — bioreaktor bez zmiany średnicy części górnej ( $V_{rob} = 11$  l), 3 — bioreaktor o zwiększonej średnicy części górnej ( $V_{rob} = 20$  l).

kania tlenu (wzrost  $k_{La}$ ) przy równoczesnym zmniejszeniu wymaganej szybkości przepływu powietrza. Zmiana kierunku przepływu zawiesiny komórek w bioreaktorze spełniła rolę pomocniczą, zmniejszając tendencję do osadzania się komórek na ścianie bioreaktora na powierzchni hodowli. Powinno sprzyjać temu również poszerzenie średnicy bioreaktora. Wobec nakładania się różnych efektów na wynik końcowy oraz niewielką pojemność bioreaktora trudno jest wyróżnić wpływ tej ostatniej modyfikacji, gdyż nie prowadzono pomiarów zmiany gęstości komórek w poszczególnych częściach bioreaktora w czasie trwania hodowli. Należy oczekiwać, że wpływ ten może być znaczny przy powiększaniu skali hodowli (wielkości bioreaktora), gdyż wówczas wysokość części rozszerzonej, a zatem długość strefy spadku prędkości unoszenia komórek (i ich gęstości) będzie wzrastała.

## Literatura

1. Fonesca N. M. R., Mavituna F., Brodelius P., (1988), *Plant Cell Biotechnology*, ed.: M. S. S. Pais, F. Mavituna, J. M. Novais, Springer-Verlag, Berlin, 389 - 401.
2. Panda A. K., Mishra S., Bisaria V. S., Bhojwani S. S., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 389 - 397.

3. Westpal K., (1990), Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, ed.: H. J. J. Nijkamp, van der Plas, J. van Aartrijk, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 601 - 608.
4. Schwitzgubel J.-P., Zrýd J.-P., Leathers R., (1992), Biotechnologia P.I., 3(18), 4 - 14.

## Bioreactor modification for plant cell culture

### Summary

*Air-lift* laboratory bioreactor for plant cell culture was improved. Diameter of the upper part of the bioreactor was expanded from 155 to 220 mm. Function of a draughttube was changed from a suspension riser to a downcomer. Instead of original aeration tube with holes stainless steel sintered air sparger was introduced. As a result the aeration rate was reduced sixfold for the same  $k_L a$  value, and the culture foaming and cell deposit on the bioreactor wall was markedly limited.

### key words:

*air-lift* bioreactor, plant cell culture, *Beta vulgaris*, foaming, wall cell deposit.

### Adres do korespondencji:

Aleksander Chmiel, Samodzielna Pracownia Biosyntezy Środków Leczniczych, Akademia Medyczna, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź.