

**Aleksander Chmiel**Samodzielna Pracownia  
Biosyntezy Środków Leczniczych  
Akademia Medyczna  
Łódź**Biotechnologia komórek  
roślinnych****1. Wprowadzenie**

Możliwe jest utrzymanie przy życiu oraz prowadzenie (teoretycznie przez dowolnie długi czas) hodowli izolowanych tkanek lub komórek organizmów wyższych *in vitro* na syntetycznych podłożach zawierających niezbędne składniki odżywcze i regulacyjne. Stało się to podstawą rozwoju szerokich prac badawczych i biotechnologicznych. Nie umniejszając znaczenia kultur tkankowych *sensu stricto*, w tym artykule ograniczymy się do omówienia hodowli komórkowych w zawieszynie oraz komórek immobilizowanych, czyli unieruchomionych na powierzchni lub wewnątrz nierozpuszczalnego nośnika. Pominięte zostaną hodowle kalusowe, hodowle korzeni (*root organ cultures*), czy korzeni transformowanych (włośnikowatych – *hairy roots*). Hodowle zawieszinowe są znacznie bardziej atrakcyjnym modelem doświadczalnym i technologicznym, dogodnym do opracowania i prowadzenia procesów w dużej skali produkcyjnej. Nie bez znaczenia dla biotechnologów jest również podobieństwo zawieszinowych kultur komórkowych do hodowli drobnoustrojów.

Ważną rolę w rozwoju hodowli komórek roślinnych i zwierzęcych odegrały opracowane wcześniej techniki mikrobiologiczne, a bioprocessy z użyciem tych komórek w dużym stopniu oparte są na osiągnięciach biotechnologii drobnoustrojowych. Istnieją jednak zasadnicze różnice w biologii (morfologii, fizjologii, genetyce) drobnoustrojów i kultur komórkowych organizmów wyższych, co decyduje o konieczności odmiennego podejścia w wielu biologicznych i technicznych aspektach biotechnologii z ich użyciem.

Biotechnologia komórek roślinnych rozwijana jest w dwóch obszarach. Jednym jest hodowla roślin – szybkie różnicowanie się komórek, regeneracja pędów i mikropropagacja roślin o identycznych cechach użytkowych oraz selekcja nowych odmian roślin. Drugim natomiast są zastosowania przemysłowe – głównie biosynteza metabolitów wtórnych.

W niniejszej pracy omówimy przemysłowe wykorzystanie komórek roślinnych do wytwarzania produktów aktywnych farmakologicznie. Rośliny są surowcami do produkcji około 25% stosowanych obecnie leków. Należą tu zarówno mieszanki ziołowe, wyciągi, jak również wyizolowane związki (np. atropina, skopolamina, kokaina, kodeina, papaweryna, winblastyna) oraz produkty chemicznie zmodyfikowane (np. leki steroidowe produkowane z diosgeniny i fitosteroli). Za wprowadzaniem metod biotechnologicznych do produkcji wielu cennych metabolitów roślinnych przemawia niezależnienie się od stref klimatycznych występowania roślin, warunków pogodowych, sezonowości uprawy i zbioru roślin, zmienności plonowania, a ponadto możliwość osiągnięcia większej koncentracji niektórych bioproduktów oraz wielokrotne skrócenie cyklu produkcyjnego (np. z wielu lat do kilku tygodni). Na rysunku 1 podano zarys opracowywania biotechnologii wytwarzania metabolitów roślinnych.

Duże nakłady na prace badawcze, koszty inwestycyjne, problemy techniczne hodowli komórek *in vitro* (wiele roślin trudno jest hodować *in vitro*) są jednak przyczyną powolnego postępu w rozwoju przemysłowej biotechnologii komórek roślinnych. U podstaw każdej technologii z komórkami jako czynnikami procesowymi leży znajomość biologii użytych komórek. Omówienie aspektów technologicznych poprzedzone zatem zostanie analizą porównawczą różnych typów komórek stosowanych w biotechnologii.

Rośliny dzikie lub uprawne

*Selekcja*

Roślina wyróżniająca się  
wysoką zawartością  
pożądanego produktu

*Izolacja fragmentu  
rośliny (tkanki)*

Hodowla pierwotna kalusa

Hodowle wtórne kalusa

Hodowle zawieszinowe

*Selekcja klonów  
Modyfikacje genetyczne  
Testowanie stabilności*

Wyselekcjonowany szczep  
(linia komórkowa)

*Optymalizacja pożywki  
i warunków hodowli  
Powiększanie skali*

Hodowla w bioreaktorze

*Izolacja produktu*

Produkt

Rys. 1. Etapy opracowywania przemysłowej biotechnologii komórek roślinnych.



## 2. Komórki drobnoustrojowe, roślinne i zwierzęce

Drobnoustroje – organizmy mikroskopijne – stanowią biologicznie niejednorodną grupę, obejmującą prokariotyczne bakterie, eukariotyczne grzyby (drożdże i grzyby strzępkowe), oraz – stojące na pograniczu organizmów żywych – wirusy. Wszystkie stosowane w biotechnologii drobnoustroje, z wyjątkiem wirusów, które wymagają komórek gospodarza, dają się stosunkowo łatwo namnażać w bioreaktorze.

Porównując komórki czterech typów organizmów stosowanych w biotechnologii (tab. 1), łatwo zauważyć istotne różnice w ich wielkości i masie. Komórki zwierzęce są kilkaset razy cięższe i około tysiąca razy większe od komórek bakteryjnych i pozbawione sztywnej ściany komórkowej, która zapewniałaby im stabilność mechaniczną w hodowli *in vitro*. Stokrotnie większe od komórek zwierzęcych są komórki roślinne, ale te z kolei wyposażone są w ścianę i dlatego są bardziej odporne na działanie czynników zewnętrznych. W warunkach bioreaktora ich wielkość może jednak stwarzać problemy hodowlane i zmuszać do zapewnienia łagodnych warunków mieszania. Komórki różnych roślin mogą wykazywać pod tym względem znaczne różnice.

Tabela 1

Przykłady wielkości komórek wykorzystywanych w biotechnologii

| Parametr                         | Komórki                      |                                   |                               |                   |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------|
|                                  | bakteryjne<br><i>E. coli</i> | drożdżowe<br><i>S. cerevisiae</i> | zwierzęce<br><i>hybrydoma</i> | roślinne          |
| masa (pg/kom.)                   | 0,4                          | 10                                | 400–500                       | $1-5 \times 10^3$ |
| wymiar ( $\mu\text{m}$ )         | $0,5 \times 2$               | $2 \times 8$                      | < 10                          | 20–200            |
| powierzchnia ( $\mu\text{m}^2$ ) | 3                            | 100                               | > 1000                        | < 10 000          |
| objętość ( $\mu\text{m}^3$ )     | 1                            | 50                                | > 4000                        | > 10 000          |
| pow./obj. ( $\mu\text{m}^{-1}$ ) | 3                            | 2                                 | 0,3                           | 0,1               |

Ważnym parametrem biologicznym i technologicznym jest stosunek powierzchni do objętości komórki, który decyduje o efektywności wymiany materii pomiędzy komórką a środowiskiem i wpływa na szybkość metabolizmu. Przystawanie składników odżywczych z podłoża oraz metabolizm w komórkach zwierzęcych i roślinnych są kilkanaście do kilkudziesięciu razy wolniejsze niż u drobnoustrojów. Przejawia się to przede wszystkim znacznie niższą szybkością namnażania (porównaj okresy generacji w tab. 2). W obrębie hodowli komórek roślinnych rekordowo szybko namnażają się komórki *Nicotiana tabacum*; w bioreaktorze o pojemności 20 m<sup>3</sup> okres generacji wynosił 15 godzin, a dobowe przyrosty suchej masy komórkowej zawierały się w granicach 5–10 g/l (1). Najniższe namnożenie komórek, rzędu 10<sup>6</sup> i plon biomasy poniżej 1 g s.m./l, uzyskuje się w hodowli komórek zwierzęcych, podczas gdy biomasa komórek roślinnych w bioreaktorze może osiągać 20–30 g s.m./l, a najwyższy plon, do 50 g s.m./l, uzyskuje się w hodowli grzybów strzępkowych (tab. 2). Komórki roślinne wyróżniają się bardzo wysokim współczynnikiem konwersji źródła węgla i energii w masę komórkową, w granicach 0,65–0,85 (2, 3).

Komórki zwierzęce i roślinne charakteryzują się znacznie niższym – aniżeli bakterie i grzyby, zapotrzebowaniem na tlen (tab. 2), co wynika z dużo wolniejszego metabolizmu. Ma to istotne znaczenie technologiczne, gdyż pozwala na stosowanie mniej intensywnego napowietrzania hodowli oraz łagodniejszych warunków mieszania. Dotyczy to zwłaszcza komórek zwierzęcych.



Tabela 2

## Wybrane parametry technologiczne komórek

| Parametr                              | Komórki      |           |           |           |
|---------------------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
|                                       | bakteryjne   | grzybowe  | zwierzęce | roślinne  |
| okres generacji (h)                   | 0,1–1        | 1–10      | 10–50     | 15–120    |
| namnożenie (komórek/ml)               | do $10^{11}$ | do $10^9$ | do $10^6$ | do $10^8$ |
| plon biomasy (g s.m./l)               | 5–15         | 10–50     | 0,1–1     | 5–30      |
| czas hodowli (doby)                   | 1–3          | 2–14      | 4–8       | 10–20     |
| zapotrzebowanie na tlen (mg/g s.m. h) | do 100       | do 50     | do 5      | do 10     |

Kolejnym zagadnieniem biologiczno-technologicznym jest różnicowanie metaboliczne komórek organizmów wyższych wynikające z odmiennych funkcji, jakie pełnią one *in vivo* w różnych tkankach i organach. Uwarunkowane genetycznie różnicowanie komórkowe w roślinach i zwierzętach znajduje się pod kontrolą sygnałów pochodzących od innych komórek, tkanek i organów. W efekcie następuje specjalizacja komórek (tkanek), np. w zakresie biosyntezy lub magazynowania określonych produktów metabolizmu.

W warunkach hodowli *in vitro* – w bioreaktorze dąży się natomiast do uzyskania możliwie jednorodnej populacji komórek wydajnie syntetyzujących pożądany produkt. Pozbawione naturalnego środowiska, typowego oddziaływania pomiędzy komórkami w tkankach oraz normalnych chemicznych sygnałów występujących w organizmie, komórki znajdują się pod wpływem zastępczych oddziaływań czynników chemicznych i fizycznych w bioreaktorze. Optymalizacja tych czynników, a zwłaszcza składu podłoża hodowlanego decyduje o przebiegu procesu i wydajności produktu.

W hodowli *in vitro* komórki roślinne i zwierzęce zachowują swoją naturalną tendencję do pozostawania w mniej lub bardziej zwartych połączeniach liczących po kilka do kilkuset komórek, co utrudnia prowadzenie procesu biotechnologicznego i jego intensyfikację. W hodowli wielu typów komórek zwierzęcych nie udaje się uzyskać wzrostu w zawieszynie i konieczne jest wówczas namnażanie komórek w postaci tzw. monowarstwy, np. na ściankach naczynia hodowlanego, na wewnętrznych elementach mechanicznych lub na powierzchni specjalnych mikronośników (4). Ogólnie można wyróżnić następujące sposoby hodowli komórek organizmów wyższych *in vitro*, stosowane w pracach laboratoryjnych i procesach technologicznych:

- 1) na pożywce zestalonej, np. agarom;
- 2) na powierzchni inertnego nośnika obmywanego pożywką;
- 3) na powierzchni mikronośników zawieszonych w pożywce;
- 4) we wnętrzu kuleczek żelu lub w kapsułkach;
- 5) pomiędzy półprzepuszczalnymi membranami lub rurkami;
- 6) w zawieszynie – w całej objętości pożywki.

W odniesieniu do komórek zwierzęcych podstawowe znaczenie technologiczne (produkcyjne) mają obecnie hodowle na wewnętrznej powierzchni szklanych lub plastikowych naczyń, na umieszczonych w tych naczyniach elementach o rozwiniętej powierzchni oraz na powierzchni tzw. mikronośników, np. typu Cytodex (4). Przemysłowa biotechnologia komórek roślinnych związana jest natomiast przede wszystkim z hodowlą zawieszinową; w niektórych technologiach mogą być stosowane również komórki immobilizowane.



### 3. Namnażanie komórek roślinnych a biosynteza produktów

W roślinach metabolity wtórne, będące najczęściej przedmiotem opracowań technologicznych, gromadzone są zazwyczaj w komórkach specjalnych typów, w różnych etapach rozwoju rośliny. Wydajna produkcja tych związków w hodowlach komórkowych wymaga zatem stworzenia specjalnych warunków procesowych dla wyselekcjonowanych linii komórkowych. Obecnie w hodowli *in vitro* możliwe jest uzyskanie nagromadzenia ponad 30 bioproduktów w ilości podobnej lub wyższej, aniżeli występują one w roślinach (5-7). Wybrane przykłady podano w tab. 3, natomiast tab. 4 zawiera przykłady metabolitów już wytwarzanych w skali przemysłowej lub bliskich wdrożenia do produkcji (7).

Tabela 3

Nadprodukcja metabolitów wtórnych w hodowlach komórkowych (wg 5)

| Produkt<br>(roślina)                            | Zawartość produktu     |  |      |
|---|------------------------|--|------|
|   | w roślinie<br>(% s.m.) | w hodowli komórkowej<br>(% s.m.) (g/l) |      |
| ginsenozyd ( <i>Panax ginseng</i> )             | 4,1                    | 27                                     | -    |
| antrachinon ( <i>Morinda citrifolia</i> )       | 2,2                    | 18                                     | 2,5  |
| antocyjany ( <i>Vitis</i> sp.)                  | 0                      | 16                                     | 0,8  |
| kwas rozmarynowy ( <i>Coleus blumei</i> )       | 3,0                    | 15                                     | 3,6  |
| szikonina ( <i>Lithospermum erythrorhizon</i> ) | 1,5                    | 14                                     | 1,5  |
| berberyna ( <i>Coptis japonica</i> )            | 2-4                    | 10                                     | 1,2  |
| kwas szikimowy ( <i>Galium mollugo</i> )        | 0                      | 10                                     | 1,2  |
| jatrozyna ( <i>Berberis stolonifera</i> )       | 0                      | 7                                      | 2,7  |
| ajmalicyna ( <i>Catharanthus roseus</i> )       | 0,3                    | 1                                      | 0,26 |
| serpentyna ( <i>Catharanthus roseus</i> )       | 0,5                    | 0,8                                    | 0,16 |

Tabela 4

Najbardziej zaawansowane biotechnologie produktów roślinnych wdrożone do produkcji lub na etapie wdrażania (wg 2, 18, 29)

| Produkt                  | Roślina   | Zastosowanie           | Firma                              |
|--------------------------|---|------------------------|------------------------------------|
| szikonina                | <i>Lithospermum erythrorhizon</i>                 | kosmetyki,<br>farmacja | Mitsui Petrochemicals<br>(Japonia) |
| berberyna                | <i>Coptis japonica</i><br><i>Thalictrum minus</i> | farmacja               | Mitsui Petrochemicals<br>(Japonia) |
| biomasa                  | <i>Panax ginseng</i>                              | farmacja               | Nitto Denki Kyogo<br>(Japonia)     |
| peroksydaza              | <i>Raphanus</i>                                   | diagnostyka            | Toyobo, (Japonia)                  |
| geraniol                 | <i>Geranium</i>                                   | perfumy                | Kanebo (Japonia)                   |
| kwas rozmarynowy         | <i>Coleus blumei</i>                              | farmacja               | Natterman, (RFN)                   |
| $\beta$ -metylodigoksyna | <i>Digitalis lanata</i>                           | farmacja               | Boehringer<br>Mannheim (RFN)       |
| polisachrydy             | <i>Echinacea purpurea</i>                         | farmacja               | DIVERSA Ges. (RFN)                 |



Rozwój hodowli komórek roślinnych przypomina dynamikę procesów mikrobiologicznych. Zasadniczy przyrost liczby komórek i stężenia biomasy ma charakter wykładniczy (w tzw. fazie logarytmicznej) lub liniowy. Średnia szybkość przyrostu suchej masy komórkowej kształtuje się w granicach 5–10 g/l/dobę, a maksymalne namnożenie osiąga 25–30 g/l. Zawartość metabolitów wtórnych w biomacie (suchej masie) może wynosić kilka lub kilkanaście procent, a nawet przekraczać 20%; na przykład w hodowli *Coleus blumei* uzyskano 25% (5,6 g/l) kwasu rozmarynowego, a w hodowli *Lithospermum erythrorhizon* otrzymano 23% (6,4 g/l) szikoniny (7). Końcowe stężenie produktu na poziomie kilku gramów w litrze hodowli jest bardzo wysokim osiągnięciem. Należy jednak odnotować, że w drobnoustrojowych biosyntezach antybiotyków uzyskuje się obecnie produkcję 10–30 g/l, a w wypadku penicyliny nawet około 50 g/l (8). Stało się to możliwe dzięki długoletnim intensywnym pracom nad doskonaleniem szczepów i procesów technologicznych. Można oczekiwać zatem, że biotechnologia komórek roślinnych ma przed sobą jeszcze wiele do osiągnięcia.

Biosynteza produktu może pozostawać w różnych relacjach w stosunku do rozwoju hodowli komórkowej. Duża szybkość wzrostu jest najczęściej niekorzystna dla biosyntezy metabolitów wtórnych; sprzyja jej natomiast limitacja wzrostu niskim stężeniem określonych składników podłoża oraz obecność lub brak określonych fitohormonów (9).

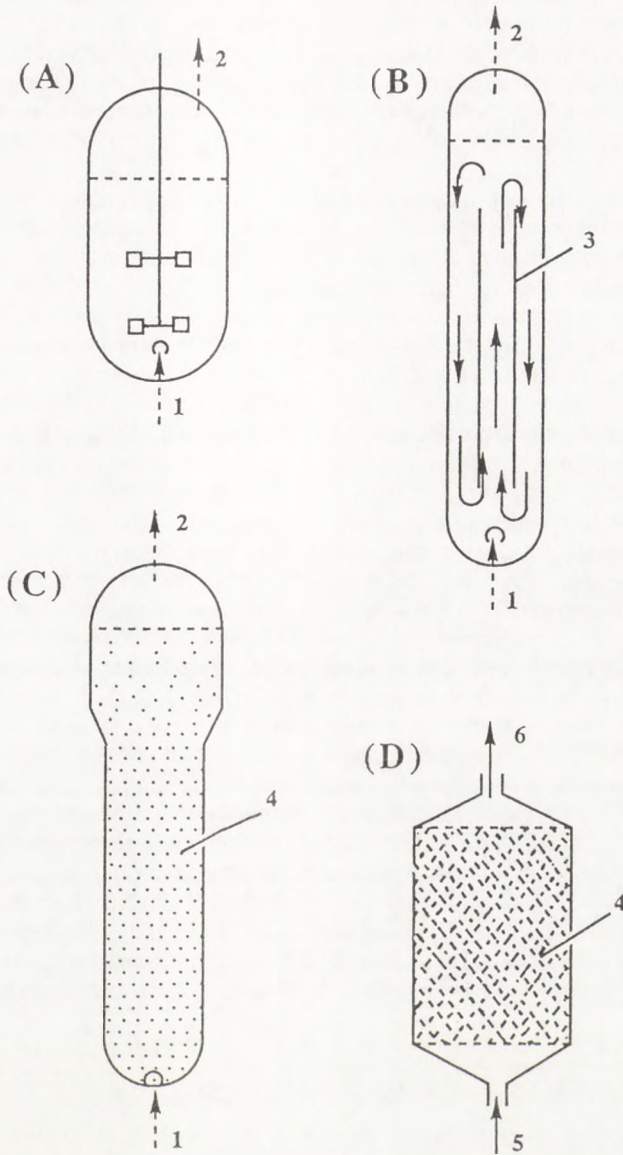
W roślinach biosynteza wielu metabolitów jest ściśle związana z różnicowaniem komórkowym. Tymczasem w hodowli zawieszinowej komórki mają podobne warunki rozwoju i przejawiają podobną aktywność metaboliczną. Wydajną biosyntezę produktów w warunkach braku różnicowania komórkowego i morfogenezy można osiągnąć w wyniku selekcji odpowiednich linii komórkowych oraz doboru chemicznego składu podłoża i pozostałych warunków hodowli. Stymulację produkcji można w niektórych procesach uzyskać wprowadzając do podłoża prekursorzy. Ważną rolę stymulującą lub hamującą odgrywa regulacja hormonalna auksynami i cytokininami. Z innych czynników regulacyjnych należy wymienić temperaturę, odczyn podłoża, światło (9).

Komórki roślinne gromadzą zazwyczaj produkty metabolizmu w swoim wnętrzu, co bardzo ogranicza wielkość produkcji. Wydzielanie produktu poza komórki zależy od produktu, gatunku rośliny i warunków hodowli. Pozakomórkową produkcję stwierdzono w przypadku berberyny w hodowli komórkowej *Thalictrum minus* w podłożu zawierającym auksynę i cytokininę, podczas gdy w hodowli *Coptis japonica* berberyna jest gromadzona w komórkach (10).

#### 4. Technika kultur komórkowych w bioreaktorach

Powszechnie stosowana laboratoryjna technika hodowli kalusa (niezorganizowanej masy komórkowej na powierzchni zestalonej pożywki), będąca pierwszym etapem namnażania kultur komórkowych *in vitro* (rys. 1), nie pozwala zazwyczaj na pełną ocenę ich technologicznej przydatności. Warunki hodowli kalusa nie zapewniają maksymalnej ekspresji genów warunkujących biosyntezę metabolitów wtórnych. Masa kalusowa przeniesiona do ciekłej pożywki w kolbach wstrząsanych ulega fragmentacji i dalsze namnażanie komórek zachodzi w zawieszynie – w kolbach wstrząsanych lub bioreaktorach.

Kolejne etapy powiększania skali hodowli prowadzone są w bioreaktorach zbiornikowych z mieszadłem mechanicznym (rys. 2A) lub kolumnowych typu *airlift* (rys. 2B). Pierwsze są powszechnie stosowane w przemyśle biotechnologicznym (co jest nie bez znaczenia dla wdrażania nowych biotechnologii), zapewniają bardziej burzliwe mieszanie hodowli i umożliwiają intensyfikację procesu. W odniesieniu do biotechnologii komórek roślinnych wymagają one jednak często zastosowania mieszadeł o specjalnych wirnikach w celu uniknięcia dużych sił ścinających, które łatwo niszczą komórki roślinne. Wady tej nie mają bioreaktory typu *airlift*, stwarzają one jednak pewne ograniczenia w zakresie kontroli warunków natlenienia hodowli i powiększania jej skali. Natlenienie hodowli jest regulowane jedynie przez zmianę szybkości



Rys. 2. Schematy podstawowych konstrukcji bioreaktorów do prowadzenia procesów z użyciem komórek roślinnych. A – bioreaktor z mieszadłem mechanicznym, B – bioreaktor typu *airlift* z cyrkulacją wewnętrzną, C – bioreaktor ze złożem fluidalnym, D – bioreaktor ze złożem upakowanym; 1 – wlot powietrza, 2 – wylot powietrza, 3 – rura przelewowa, 4 – złożo biokatalizatora, 5 – wlot cieczy (roztworu substratu), 6 – wylot cieczy (roztworu produktu).



napowietrzania (równoczesny wpływ na warunki mieszania), podczas gdy w bioreaktorach mieszadlowych istnieje możliwość wyboru niezależnej lub równoczesnej regulacji szybkości napowietrzania i szybkości obrotów mieszadła. Największe bioreaktory stosowane obecnie do hodowli komórek roślinnych mają 75 m<sup>3</sup> pojemności całkowitej (ok. 60 m<sup>3</sup> pojemności roboczej) i wyposażone są w mieszadła o specjalnej konstrukcji (11). Obszerne omówienie inżynierskich aspektów hodowli komórek roślinnych w bioreaktorach różnych typów zawierają prace specjalistyczne (7, 12–15).

Obok hodowli zawieszinowej opracowywane są modele procesów z komórkami immobilizowanymi (14, 15, 16), oraz konstruowane są odpowiednie bioreaktory do takich procesów (rys. 2CD). Spośród licznych metod immobilizacji najczęściej stosowane jest zamykanie komórek roślinnych w żelach (np. alginianowym lub kappa-karagenowym) albo w bioreaktorach membranowych (14). Komórki immobilizowane są szczególnie przydatne do prowadzenia procesów biotransformacji, w których uczestniczą pojedyncze enzymy lub układy kilkunenzymowe. Ponadto, w niektórych procesach komórki immobilizowane mogą zapewnić uzyskanie znacznie wyższej produkcji pożądanego metabolitu, aniżeli jest to możliwe w hodowli zawieszinowej (17).

Immobilizacja komórek przez związanie ich z nośnikiem lub zamknięcie w określonej przestrzeni bioreaktora, zapewnia łatwe wydzielenie ich z zawiesiny poreakcyjnej i wielokrotne użycie w kolejnych procesach biosyntezy. Rozdzielenie namnażania komórek i biosyntezy produktu umożliwia niezależne prowadzenie obu etapów w warunkach dla nich optymalnych. Rozwinięciem takiego modelu jest proces ciągły z użyciem komórek immobilizowanych, w którym roztwór substratu wprowadzany jest do bioreaktora z szybkością odpowiadającą szybkości syntezy, a produkt odprowadzany jest w strumieniu hodowli wypływającym z bioreaktora.

Komórki immobilizowane charakteryzują się szeregiem dalszych zalet (18). Nośnik spełnia funkcję ochronną dla komórek, zabezpieczając je przed mechanicznym uszkodzeniem. W bioreaktorze z komórkami immobilizowanymi możliwe jest uzyskanie znacznie wyższego ich zagęszczenia, aniżeli w zawieszynie, co zwiększa produktywność takiego układu. Łatwiej jest również utrzymać komórki wolno namnażające się.

Technologia komórek immobilizowanych ma jednak zasadnicze ograniczenie w zastosowaniu do procesów z komórkami roślinnymi. W zdecydowanej większości procesów produkty gromadzone są bowiem wewnątrz produkujących je komórek, co sprawia że komórki mogą być wykorzystane tylko jednorazowo w pojedynczym cyklu produkcyjnym. Problem ten nie istnieje w odniesieniu do nielicznych metabolitów gromadzonych pozakomórkowo, czego przykładem jest berberyna w hodowli komórek *Thalictrum minus* (10) oraz kapsaicyna w hodowli komórek *Capsicum frutescens* (17). Pozakomórkowe gromadzenie produktu można osiągnąć w pewnym stopniu przez stosowanie zabiegów zwiększających przepuszczalność błony komórkowej (18–20).

## 5. Przykłady procesów w bioreaktorach

W tab. 5 podano przykłady procesów biosyntezy produktów roślinnych w dużej skali. Przystępując do opracowywania procesu technologicznego z użyciem komórek roślinnych należy uwzględnić fizjologię komórek, relację pomiędzy syntezą produktu a namnażaniem biomasy i kinetykę procesu. Jeżeli synteza produktu jest sprzężona ze wzrostem komórek, umożliwia to prowadzenie prostego procesu jednoetapowego, którego przykładem jest produkcja aktywnych immunologicznie polisacharydów w hodowli *Echinacea purpurea* (21). Modyfikacja tego procesu przez kilkakrotne okresowe odbieranie części hodowli i wprowadzanie odpowiedniej porcji świeżej pożywki pozwala na znaczną jego intensyfikację uzyskanie wyższej produktywności bioreaktora z pominięciem wstępnej fazy namnażania materiału posiewowego (22). Analogiczną technologię opracowano dla procesu biotransformacji  $\beta$ -metylodigitoksyny do  $\beta$ -metylodigoksyny w hodowli *Digitalis lanata* (23, 24).



Tabela 5

## Przykłady procesów biotechnologicznych z komórkami roślinnymi (wg 18)

| Produkt                  | Bioreaktor (m <sup>3</sup> ) | Proces    | Produkcja     |
|--------------------------|------------------------------|-----------|---------------|
| kwas rozmarynowy         | 0,042                        | okresowy  | 100 g/14 dób  |
| β-metylodigoksyna        | 0,200                        | półciągły | 500 g/3 mies. |
| szikonina                | 0,750                        | okresowy  | 1,2 kg/2 tyg. |
| biomasa <i>Nicotiana</i> | 1,5                          | ciągły    | 6,9 g/l/dobę  |
| biomasa <i>Nicotiana</i> | 20                           | ciągły    | 5,8 g/l/dobę  |
| biomasa <i>Giseng</i>    | 20                           | okresowy  | 0,5 g/l/dobę  |

Korzystnym rozwiązaniem jest hodowla okresowa z zasilaniem świeżą pożywką (*fed batch culture*) o odpowiednio zoptymalizowanym składzie. Pozwala ona na utrzymanie aktywnych i namnażających się komórek w warunkach wzrastającego ich zagęszczenia, przedłużenie fazy produkcji, a w efekcie końcowym umożliwia uzyskanie wyższego stężenia produktu. Technika tę zastosowano do biosyntezy berberyny w hodowli *Coptis japonica* (10).

Do procesów, w których produkt syntetyzowany jest w warunkach wzrostu silnie limitowanego lub dopiero po zakończeniu fazy wzrostu, klasyczną hodowlę okresową modyfikuje się w proces dwuetapowy. Po namnożeniu biomasy, oddziela się ją od podłoża wzrostowego i wprowadza do zoptymalizowanego podłoża produkcyjnego. Takie postępowanie użyte zostało do biosyntezy szikoniny przez komórki *Lithospermum erythrorhizon* (18) oraz berberyny w hodowli komórek *Thalictrum minus* var. *hypoleucum* (10). Ponieważ unikatową cechą tej drugiej linii komórkowej było wydzielanie produktu do podłoża, proponowana jest technologia z użyciem złoża komórek unieruchomionych w żelu alginianowym (10). Złoże zalewane jest cyklicznie pożywką na 30 sekund, po czym poddawane intensywnemu napowietrzaniu. Tylko taki sposób zapewnia dostateczne natlenienie złoża biokatalizatora w warunkach wysokich wymagań tlenowych przez komórki w fazie produkcji. Ponieważ w miarę produkcji berberyny jest ona gromadzona w recyrkulującej pożywce uzyskuje się stężenie krytyczne dla jej krystalizacji, i kryształy oddzielane są w specjalnym zbiorniku zainstalowanym w linii technologicznej. W ten sposób z 1 litra pożywki można uzyskać 2,4 g berberyny, podczas gdy w klasycznym procesie hodowli okresowej uzyskiwano tylko 0,76 g/l (10). Technika komórek immobilizowanych proponowana jest również w biotransformacji β-metylodigitoksyny do β-metylodigoksyny (25).

## 6. Warunki powodzenia biotechnologii komórek roślinnych

Uzyskanie dobrych wyników w biotechnologii komórek roślinnych zależy od wielu czynników i jest efektem powodzenia na wszystkich etapach opracowywania procesu biotechnologicznego (rys. 1, tab. 6). Do najważniejszych należy selekcja wysokowydajnych linii komórkowych. Efekty prac selekcyjnych nad komórkami *Coptis japonica* prezentowane są w tab. 7. Nie mniej ważna jest optymalizacja podłoża produkcyjnego, ilości inokulum i warunków natlenienia (tab. 8).

Za ekonomicznie uzasadnioną objętość bioreaktora do biosyntezy środków farmaceutycznych proponuje się co najmniej 1 m<sup>3</sup> (27). Podstawowym kryterium decydującym o wdrożeniu nowej technologii jest jej opłacalność. Analiza kosztów produkcji (18, 27-29) określa minimalne stężenie końcowe produktu w bioreaktorze na poziomie ponad 1 g/l, przy jego cenie co najmniej 400-500 USD/kg. Zapotrzebowanie na produkt musi być przy tym odpowiednio duże – wartość rocznej produkcji na poziomie kilkudziesięciu mln USD, aby celowa okazała się inwestycja



instalacji technologicznej. Produkty bardzo drogie, ale o niewielkim rynku zbytu, takie jak np. olejek jaśminowy (cena 5000 USD/kg, roczna wartość sprzedaży 0,5 mln USD), nie są brane pod uwagę jako przedmiot opracowań biotechnologicznych (18, 28). Podobnie przedstawia się problem dużego rynku przy niskiej cenie, czego przykładem jest olejek z liści mięty kędzierzawej (*spearmint oil*): zbyty na poziomie 100 mln USD, ale cena tylko 30 USD/kg (18, 28).

Tabela 6

**Wyniki kolejnych etapów opracowywania biotechnologii kwasu rozmarynowego w hodowli komórek *Coleus blumei* (wg 18 i 26)**

| Etap  | Kwas rozmarynowy   |                          |
|---|--------------------|--------------------------|
|   | zawartość (% s.m.) | produktywność (g/l/dobę) |
| 1. Roślina <i>Coleus blumei</i>                                       | 1,1                |                          |
| 2. Selekcja linii komórkowych   | 2,9                | 0,02                     |
| 3. Optymalizacja podłoża i warunków hodowli                           | 15,0               | 0,25                     |
| 4. Powiększanie skali: bioreaktor 20 l airlift z mieszadłem spiralnym | 10,3               | 0,31                     |
|   | 13,6               | 0,45                     |
| 5. Optymalizacja technologii, proces dwuetapowy                       | 21,0               | 0,91                     |

Tabela 7

**Wyniki selekcji linii komórkowych *Coptis japonica***

| Materiał                             | Produkt (% s.m.) | Czas       | Produktywność (mg/g/dobę) |
|--------------------------------------|------------------|------------|---------------------------|
| roślina (korzeń)                     | 5                | 5-6 lat    | 0,024                     |
| zawiesina komórkowa (przed selekcją) | 5                | 3 tygodnie | 2,3                       |
| wyselekcjonowana linia komórkowa     | 13,2             | 3 tygodnie | 6,3                       |

Tabela 8

**Wpływ podłoża, warunków natlenienia i ilości inokulum na wzrost *Lithospermum erythrorhizon* i produkcję pochodnych szikonony**

| Podłoże                 | Inokulum (g s.m./l) | Plon biomasy (g s.m./l) | Produkt (g/l) |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------|
| White                   | 3                   | 6,8                     | 0,13          |
| Mg                      | 3                   | 11,3                    | 1,40          |
| Mg                      | 4,9                 | 16                      | 1,90          |
| M + doprowadzenie tlenu | 5,6                 | 17,5                    | 2,30          |

Wśród najbardziej opłacalnych (obecnie lub w najbliższej przyszłości) biotechnologii wymieniana jest produkcja szikoniny, glikozydów nasercowych *Digitalis*, alkaloidów opium, alkaloidów *Catharanthus*, olejków zapachowych oraz roślinnych prekursorów leków steroidowych.



## Literatura

1. Noguchi M., Matsumoto T., Hirata V., Yamamoto K., Katsuyama A., Azechi A., Kato K., (1977), in: *Plant Tissue and its biotechnological application*, eds.: W. Barz, E. Reinhard, M.H. Zenek, Springer-Verlag, Berlin, 85-94.
2. Petiard V., Steck P., (1985), in: *Perspectives in Biotechnology*, eds.: J.M. Cardoso Duarte, L.J. Archer, A.T. Bull, G. Holt, Plenum Press, New York, 139-153.
3. Ten Hoopen H.J.G., van Gulik W.M., Meijer J.J., (1990), in: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, eds. H.I.J. Nijkamp, van der L.H.W. Plas, J. van Aartijk, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 601-608.
4. Griffiths J.B., (1988), in: *Animal Cell Biotechnology*, 3, eds.: R.E. Spier, J.B. Griffiths, Academic Press, London, 179-219.
5. Brodelius P., (1985), in: *Applications of Isolated enzymes and Immobilized Cells to Biotechnology*, ed. A.I. Laskin, Addison-Wesley, Reading, 109-148.
6. Fowler M.W., Scragg A.H., (1988), in: *Plant Cell Biotechnology*, eds.: M.S.S. Pais, F. Mavituna, J.M. Novais, Springer-Verlag, Berlin, 165-177.
7. Ten Hoopen H.J.G., van Gulik W.M., Meijer J.J., Luyben K.C.A.M., (1988), *Proceedings 8<sup>th</sup> Intern. Biotechnol. Symp.*, Paris, vol. 1, 179-192.
8. Calam C.T., (1987), *Process Development in Antibiotic Fermentations*, Cambridge University Press, Cambridge.
9. Stafford A., Morris P., Fowler M.W., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 578-587.
10. Tabata M., (1988), *Proceedings 8<sup>th</sup> Intern. Biotechnol. Symp.*, Paris, vol. 1, 167-178.
11. Ritterhaus E., Ulrich J., Weiss A., Westphal K., (1989), *BioEngineering* 5, (1), 8-10.
12. Shuler M.L., (1988), in: *Plant Cell Biotechnology*, eds.: M.S.S. Pais, F. Mavituna, J.M. Novais, Springer-Verlag, Berlin, 328-342.
13. Fonseca N.M.R., Mavituna F., Brodelius P., (1988), in: *Plant Cell Biotechnology*, eds.: M.S.S. Pais, F. Mavituna, J.M. Novais, Springer-Verlag, Berlin, 389-401.
14. Panda A.K., Mishra V.S., Bisaria V.S., Bhojwani S.S., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 386-397.
15. Novais J.M., (1988), in: *Plant Cell Biotechnology*, eds.: M.S.S. Pais, F. Mavituna, J.M. Novais, Springer-Verlag, Berlin, 353-363.
16. Hulst A.C., Tramper J., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 546-558.
17. Lindsey K., Yeoman M.H., (1984), *Planta*, 162, 495-501.
18. Fontanel A., Tabata M., (1987), *Nestle Research News* 1986/1987, 93-103.
19. Alfermann A.W., (1985), in: *Biocatalysts in Organic Chemistry*, eds.: J. Tramper, H.C. van der Plas, P. Linko, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 225-238.
20. Brodelius P., (1990), in: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, eds.: H.I.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas, J. van Aartijk, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 567-576.
21. Westphal K., (1990), in: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, eds.: H.I.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas, J. van Aartijk, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 601-608.
22. Ritterhaus E., Ulrich J., Weiss A., Westphal K., (1989), *BioEngineering* 5, (2), 28-34.
23. Breuling M., Spieler H., Schwantag D., Alfermann A.W., Reinhard E., (1987), in: *Biochemical Engineering*, eds.: H. Chmiel, W. Hammes, J.E. Bailey, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 443-449.
24. Reinhard E., Kreis W., Barthlen U., Heimbold U., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 502-508.
25. Spieler H., Alfermann A.W., Reinhard E., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 1-4.
26. Ulbrich B., Wiesner W., Arens H., (1985), in: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, eds.: K.H. Neumann, W. Bartz, E. Reinhard, Springer-Verlag, Berlin, 293-303.
27. Sato F., Yamada Y., (1984), *Phytochem.*, 23, 281-285.
28. Fowler M.W., Cresswell R.C., Stafford A.M., (1990), in: *Bioactive Compounds from Plants (Ciba Foundation Symposium 154)*, Wiley, Chichester, 157-174.
29. Petiard V., Courtois D., Masseret B., Delaunay P., Florin B., (1987), in: *Proc. 4<sup>th</sup> European Congress of Biotechnology*, vol. 4, eds.: O.M. Neijssel, R.R. van der Meer, K.C.A.M. Luyben, Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam, 157-168.



## Plant cell biotechnology

### Summary

Technical requirements and conditions for plant cell cultures are described. Stirred tank reactors and *airlift* reactors are most useful for the plant cell cultivation. The biology of plant, animal and microbial cells and their growth characteristics in bioreactors are discussed. Industrial examples of plant cell cultures used for the biosynthesis of secondary products are presented.

### *Adres dla korespondencji:*

Aleksander Chmiel, Instytut Technologii i Chemii Leków, Akademia Medyczna w Łodzi,  
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź.