

MACIEJ PILAREK
JUSTYNA DĘBOWSKA
KRZYSZTOF W. SZEWCZYK

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Hodowla komórek *Nicotiana tabacum* BY-2 w bioreaktorze membranowym z wykorzystaniem perfluorowanego nośnika tlenu

Wprowadzenie

Hodowane w głąbnie komórki roślinne są poddawane działaniu sił ścinających, generowanych w skutek intensywnego mieszania oraz napowietrzania pożywki. Wrażliwość komórek roślinnych na niszczące efekty działania naprężeń stycznych wynika ze specyficznej budowy ściany komórkowej, której podstawowym składnikiem są mikrofibryle celulozy [1, 2]. Poszukuje się zatem rozwiązań pozwalających na zapewnienie kompromisu między właściwymi warunkami wymiany masy a łagodnymi warunkami hydrodynamicznymi hodowli komórek roślinnych w bioreaktorach. Zastosowanie ciekłego nośnika gazów, którego zdolność do wiązania tlenu jest wyższa niż rozpuszczalność O_2 w wodzie, umożliwia zmniejszenie intensywności mieszania pożywki w porównaniu z tradycyjnymi systemami napowietrzania. Dodatkowo znaczne zredukowana zostaje szybkość przepływu fazy napowietrzającej przez objętość naczynia hodowlanego [3].

Unikalnymi cechami pozwalającymi wykorzystywać ciekłe perfluoroalkany (perfluorowizwiązki, z ang. *perfluorochemicals*, *PFC*) jako nośniki tlenu w biotechnologii są wysoka rozpuszczalność gazów oddechowych (O_2 i CO_2), chemiczna i biologiczna obojętność oraz hydro- i liofobowość determinująca całkowity brak mieszalności z płynami fizjologicznymi i ciekłymi pożywkami [3–5]. W zdecydowanej większości aplikacji dotyczących hodowli komórkowych, perfluorowizwiązki są dodawane bezpośrednio do pożywki. Zachodzi wówczas rozdział perfluorowanej fazy napowietrzającej oraz wodnej fazy napowietrzanej pożywki [3, 4]. Możliwe jest także użycie perfluorowanego nośnika tlenu jako medium pośredniczącego w wymianie gazowej podczas hodowli komórek prowadzonych w bioreaktorach membranowych. Niestety brak jest danych literaturowych charakteryzujących ilościowo transportu masy w tego typu rozwiązaniach procesowo-aparaturowych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie przydatności perfluorodekalin jako ciekłego nośnika tlenu w hodowli w głąbnie komórek *Nicotiana tabacum* L. (tytoniu szlachetnego) linii *Bright Yellow No. 2* prowadzonej w reaktorze membranowym typu *hollow-fibre*.

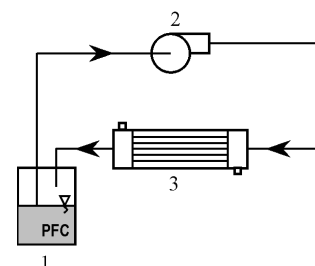
Materiały i metodyka badań

PFC. Jako ciekły perfluorowany nośnik tlenu użyto perfluorodekalinę ($C_{10}F_{18}$; *ABCR GmbH & Co. KG*, Niemcy). Związek ten wykazuje wysoką rozpuszczalność tlenu (do $490 \text{ cm}^3 O_2 / \text{dm}^3 \text{ PFC}$) oraz ditlenku węgla (do $1500 \text{ cm}^3 CO_2 / \text{dm}^3 \text{ PFC}$). Całkowite wysycenie szkieletu węglowego czas-

teczone zapewnia perfluorodekalinie inertność chemiczną a także brak mieszalności z układami wodnymi oraz lipidami [3]. Celem zapewnienia aseptycznych warunków wzrostu komórek roślinnych, perfluorowany nośnik tlenu był sterylizowany termicznie (121°C , 15 min.) przed użyciem w hodowli. Po sterylizacji, perfluorodekalin była nasycona powietrzem atmosferycznym (15 min.) a jałowość procesu zapewniało zastosowanie filtra gazu o średnicy por $0,45 \mu\text{m}$.

Komórki roślinne. Hodowano komórki *Nicotiana tabacum* zmodyfikowanej genetycznie, ciągłej linii komórkowej *Bright Yellow No.2* (*Laboratorium Bioprocessów WICHIP Politechniki Warszawskiej*). Jest to rosnąca w postaci zawiesiny nieodróżnicowana populacja komórek, wyprowadzonych z tkanki miękkiszowej tytoniu szlachetnego. Medium hodowlane stanowiło podłoże *Murashige* i *Skoog* (*Sigma-Aldrich*, nr kat. M5519) o pH 5,5 uzupełnione o sacharozę (2%), KH_2PO_4 (0,0255%) oraz auksynę 2,4-D (0,2 mg/dm^3). Przygotowaną pożywkę sterylizowano termicznie (121°C , 15 min.).

Bioreaktor membranowy. Schemat badanego układu przedstawiony został na rys. 1. Recyrkulowana, wstępnie nasycona powietrzem atmosferycznym perfluorodekalin zbierana była w naczyniu wyrównawczym – 1, z którego, przy pomocy pompy perystaltycznej – 2 przetłaczana była przez kapilary bioreaktora membranowego – 3. Jako bioreaktor typu *hollow-fibre* wykorzystany został moduł dialityczny FX 10 firmy *Fraesenius SE* (Niemcy) o powierzchni efektywnej $1,8 \text{ m}^2$, którą zapewnia wiązka kapilar o średnicy wewnętrznej $185 \mu\text{m}$. Medium hodowlane, w którym rosły komórki *N. tabacum* BY-2, wypełniało przestrzeń międzykapilarną modułu membranowego. Moduł kapilarny był umieszczony na kołyszce laboratoryjnej (10 cykli/min.) w celu zapewnienia mieszania płynu hodowlanego wewnątrz bioreaktora.



Rys. 1. Schemat układu doświadczenia (objaśnienia w tekście)

Metody analityczne. Stężenie tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym, mierzono przy użyciu elektrody tlenowej COG-1 i miernika CX-401 firmy *Elmetron* (Polska).

Analiza żywotności hodowanych komórek polegała na ich selektywnym wybarwieniu wodnym roztworem (1%) błękitu trypanu (*Sigma-Aldrich*, nr kat. T8154) komórek zamierających lub martwych. Po zmieszaniu równych objętości płynu hodowlanego i roztworu barwnika, wykorzystując he-

mocytometr *Malasseza* (Brand, Niemcy) sporządzano preparat mikroskopowy, który następnie analizowano (powiększenie 20x) przy użyciu mikroskopu odwróconego pola typu *Eclipse TS-100/F* firmy *Nikon* (Japonia). Żywotność komórek (CV) liczono jako ułamek komórek żywych (niewybarwionych) w ogólnej liczbie wszystkich komórek (wybarwionych i niewybarwionych).

Względny przyrost biomasy tytoniu BY-2 (B) oznaczano metodą wagową przez pomiar mokrej masy inokulum oraz biomasy uzyskanej po 10 dniach hodowli.

Ilościową analizę sacharozy w pobieranych co 24 godziny próbach płynu hodowlanego oraz oznaczanie nikotyny w komórkach tytoniu prowadzono techniką elektroforezy kapilarnej przy użyciu aparatu CE-3D firmy *Agilent* (USA), wykorzystując zmodyfikowane metody *Soga* [6] oraz *Ralapati* [7]. Zarówno do oznaczania sacharozy jak i nikotyny stosowano kapilarę o długości 48 cm i średnicy wewnętrznej 50 μm . W analizie sacharozy używano buforu (pH 12,1) zawierającego kwas 2,6-pirydynodikarboksylowy (20 mM) oraz bromek cetylotrimetyloamonowy (0,5 mM). Rozdział prób zachodził pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego -25kV oraz w stałej temperaturze 20°C. Stosowano pośrednią detekcję UV dla analitycznej długości fali $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm (szerokość pasma 20nm) przy referencyjnej długości fali $\lambda = 275$ nm (szerokość pasma 10 nm). Do analizy nikotyny używano buforu fosforanowego (20 mM) o pH 2,5. Rozdział przeprowadzano w temperaturze 20°C z zachowaniem stałego napięcia elektrycznego +25 kV. Bezpośredniego pomiaru absorbancji dokonano dla $\lambda_{\text{max}} = 260$ nm (szerokość pasma 4 nm).

Wyniki badań i dyskusja

W celu ilościowej charakterystyki transportu masy wyznaczono wartości objętościowego współczynnika wnikania tlenu w badanym układzie. Wartość $k_{L,a}$ określano na podstawie pomiaru stężenia rozpuszczonego tlenu w wodnym roztworze pożywki wypełniającej przestrzeń między kapilarami bioreaktora typu *hollow fibre* podczas napowietrzania pozbawionej tlenu pożywki. Współczynnik wyznaczono z równania wyrowadzonego z bilansu tlenu w układzie:

$$\ln\left(1 - \frac{C_{O_2}}{c_{O_2}^*}\right) = -k_{L,a}at \quad (1)$$

Na rys. 2 przedstawiono zależności wartości $k_{L,a}$ od szybkości przepływu nośnika tlenu (odpowiednio perfluoroalkanu, powietrza i wody) przez kapilary bioreaktora membranowego. Okazało się, że nasycona powietrzem atmosferycznym perfluorodekalina zapewnia najbardziej wydajne natlenienie medium hodowlanego spośród zbadanych mediów pośredniczących w wymianie gazowej. W przypadku użycia perfluorowanego nośnika tlenu uzyskano bowiem wyższe wartości $k_{L,a}$ niż stosując powietrze lub nasyconą nim wodę.

Na rys. 3 przedstawiono zmiany stężenia sacharozy w medium hodowlanym w zależności od czasu hodowli komórek tytoniu BY-2 w badanym bioreaktorze membranowym. Największy spadek stężenia sacharozy obserwowano w hodowlach z recyrkulowaną perfluorodekalina przetłaczaną przez kapilary modułu typu *hollow fibre*. Najwolniej źródło węgla zużywane było w hodowlach kontrolnych (bez perfluoroalkanu).

W tabelicy 1 zamieszczono wyniki przyrostu mokrej biomasy oraz oznaczenia żywotności komórek w hodowlach poszczególnych serii. Wykorzystanie przetłaczanej przez kapilary

perfluorodekaliny znacznie zwiększyło przyrost biomasy w porównaniu z wynikami hodowli kontrolnych (bez PFC). Również wyniki oznaczenia żywotności komórek tytoniu w hodowlach poszczególnych serii doświadczalnych potwierdziły korzystny wpływ perfluorowanego nośnika tlenu zastosowanego w reaktorze membranowym. Średnia żywotność komórek w hodowlach z recyrkulowanym napowietrzonym PFC wynosiła 94–95%. W przypadku stosowania perfluorodekaliny, która tylko

wypełniała kapilary bioreaktora, lecz nie była recyrkulowana żywotność wyniosła 83%. Zdecydowanie niższą wartość średniej żywotności komórek zanotowano dla hodowli kontrolnych (bez PFC) i wynosiła ona tylko 61%. Zastosowanie perfluorowanego nośnika tlenu nie wpłynęło na stężenie nikotyny w komórkach tytoniu. W ekstrakcie komórkowym uzyskanym z biomasy hodowanej z wykorzystaniem perfluorodekaliny, jak i z hodowli kontrolnych stężenie nikotyny zawierało się w zakresie od 6,45 do 6,97 mg/dm^3 .

Tabela 1
Względny przyrost biomasy (B) oraz żywotność komórek (CV) w hodowlach poszczególnych serii

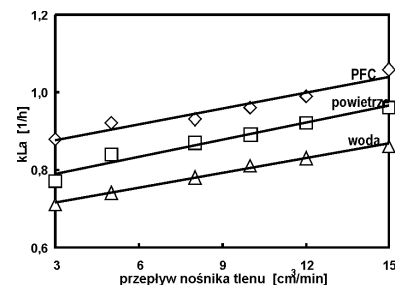
Hodowla	B	CV
1% inokulum; PFC 5ml/min.	—	94 %
10% inokulum; PFC 5ml/min.	712 %	95 %
10% inokulum; PFC 0ml/min.	356 %	83 %
10% inokulum; brak PFC	122 %	61 %

Wnioski

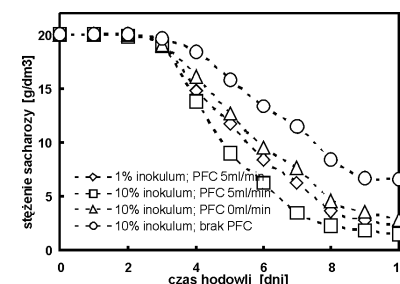
Użycie nasyconej powietrzem atmosferycznym perfluorodekaliny pozwoliło uzyskać wyższe wartości współczynnika $k_{L,a}$ niż w przypadku innych zbadanych nośników tlenu. Recyrkulowany napowietrzony perfluoroalkan wpłynął korzystnie na przyrost biomasy oraz żywotność komórek tytoniu linii BY-2 hodowanych w bioreaktorze typu *hollow fibre* w porównaniu z hodowlami kontrolnymi prowadzonymi bez fazy perfluorowanej. Zastosowanie perfluorowanego nośnika tlenu nie wpłynęło na stężenie nikotyny w komórkach tytoniu.

LITERATURA

1. M. Jarvis, M. McCann: *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 1 (2000).
2. D. Sowana, D. Williams, B. O'Neill, E. Dunlop: *Biochem. Eng. J.*, **12**, 165 (2002).
3. M. Pilarek, K.W. Szewczyk: *Biochem. Eng. J.*, **41**, 38 (2008).
4. K. Lowe: *J. Fluor. Chem.*, **118**, 19 (2002).
5. M. Pilarek, K.W. Szewczyk: *Biotechnologia*, **69**, 125 (2005).
6. T. Soga, M. Serwe: *Food Chem.*, **69**, 339 (2000).
7. S. Ralapati: *J. Chrom.*, **695**, 117 (1997).



Rys. 2. Zależność wartości $k_{L,a}$ od szybkości przepływu nośnika tlenu



Rys. 3. Zmiany stężenia sacharozy w pożywce w zależności od czasu hodowli