

Beata PAWŁOWSKA

e-mail: beatapaw@wipos.p.lodz.pl

Katedra Inżynierii Bioprocusowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

## Konduktancja jako parametr monitorujący wzrost korzeni włośnikowatych *Paulownia tomentosa* w bioreaktorze

### Wstęp

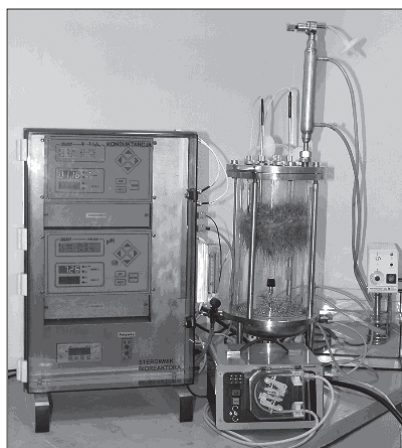
Problemem analitycznym w kulturach korzeni transformowanych w bioreaktorach jest brak możliwości bezpośredniego oznaczania przyrostu biomasy w czasie trwania hodowli. W celu doboru odpowiedniej metody monitorowania wzrostu biomasy w wielu pracach obserwowane były korelacje pomiędzy przyrostem świeżej lub suchej masy i różnymi, zmieniającymi się parametrami podłoża. Jedną z proponowanych metod było badanie zmiany stężenia cukru w podłożu pochodzonym w czasie trwania procesu. Matematyczną zależność pomiędzy wzrostem korzeni i zmianą zawartości cukru stwierdzono dla korzeni *Stizolobium hassjoo* [Huang i inni, 2004]. Kolejną propozycją były badania zmian ciśnienia osmotycznego, zaproponowane dla oszacowania przyrostu biomasy korzeni transformowanych *Hyoscyamus muticus* [Ramakrishnan i inni, 1999] i *Tagetes patula* [Suresh i inni, 2001]. Pomiary konduktancji dla określenia przyrostu biomasy korzeni włośnikowatych proponowane były w badaniach [Taya, 1989; Suresh, 2005].

W tej pracy badano korelację pomiędzy wzrostem biomasy i zmianą konduktancji w kulturach korzeni włośnikowatych *P. tomentosa* w kolbach wstrząsanych oraz w bioreaktorze rozpyłowym o pojemności 10 dm<sup>3</sup>. Stwierdzono, że konduktancja może być zastępczym parametrem monitorującym wzrost biomasy korzeni *P. tomentosa* w bioreaktorze rozpyłowym.

### Material i metody

#### Kultury korzeni włośnikowatych

Korzenie włośnikowate *Paulownia tomentosa* (klon G) otrzymano w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Kultury korzeni transformowanych prowadzono w ciemności, w kolbach *Erlenmeyera* o pojemności 300 cm<sup>3</sup> zawierających po 80 cm<sup>3</sup> podłoża WP bez regulatorów wzrostu, zawierającego 3% sacharozy, w temperaturze 26°C±2°C, na wytrząsarce rotacyjnej 100 obr./min. W celu powiększenia skali kultury hodowlę korzeni włośnikowatych przeprowadzono w bioreaktorze o pojemności 10 dm<sup>3</sup> (Rys. 1) zasilanym rozpyloną pożywką [Pawłowska, 2004]. Do bioreaktora wprowadzano sterylnie inokulat pochodzący z kultur w kolbach wstrząsanych. Hodowle prowadzono w temperaturze 26±2°C przez 4 tygodnie. W czasie trwania hodowli wykonywano pomiar konduktancji. Po zakończeniu każdego cyklu mierzono moką i suchą masę.



Rys. 1. Układ bioreaktora rozpyłowego o pojemności 10 dm<sup>3</sup> z szafą sterującą umożliwiającą pomiar konduktancji

#### Pomiar wzrostu korzeni w kolbach

Przyrost biomasy korzeni określano za pomocą oznaczeń świeżej i suchej masy w g/kolbę i g/dm<sup>3</sup>. Korzenie wyjmowano z kolb, odsączano na bibule i ważono świeżą masę. W celu uzyskania suchej masy, fragmenty korzeni suszono w suszarce w 100°C przez 1 godzinę, a następnie przez 24 godziny w 80°C.

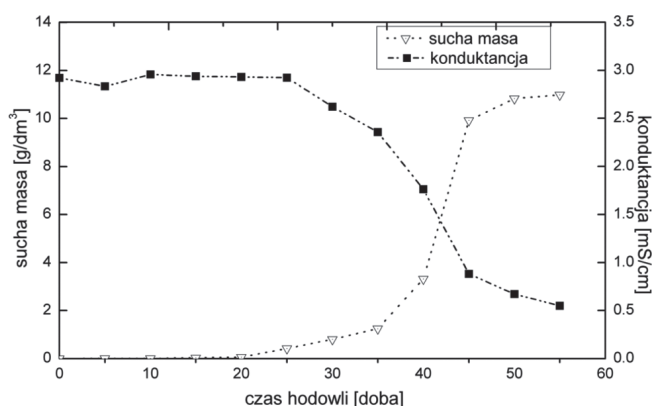
#### Pomiar konduktancji

Do oznaczenia konduktancji w podłożu z hodowli w kolbach wstrząsanych zastosowano aparat *pH* / konduktometr CPC-551 firmy *Elmetron* i czujnik konduktometryczny – typ CD-2 firmy *Hydromet*. W hodowli w bioreaktorze zastosowano konduktometr typu UPM 2000 i czujnik konduktometryczny firmy *Pol-Eko Projekt*.

### Wyniki i dyskusja

Zbadano zależność między zmianami konduktancji a przyrostem biomasy korzeni *P. tomentosa* w kolbach wstrząsanych (Rys. 2). W kulturach korzeni transformowanych w kolbach wstrząsanych podczas pierwszych 20 dni przyrost biomasy był nieznaczny – widoczna jest długa faza adaptacyjna. Do 20 doby hodowli nie obserwowano także zmian konduktancji. Początek zmian stwierdzono w 25 dobie hodowli, a gwałtowny spadek między 35 a 45 dobą hodowli, co przypadało na okres intensywnego wzrostu biomasy. Po 45 dobie hodowli, kiedy korzenie były w fazie spowolnionego wzrostu, wartość konduktancji malała w niewielkim stopniu.

Na rys. 3 przedstawiono wyniki pomiarów konduktancji mierzonej w podłożu pochodzonym bezpośrednio po usunięciu z kolby korzeni,



Rys. 2. Zmiany suchej masy i konduktancji właściwej w podłożu WP podczas hodowli korzeni *Paulownia tomentosa* w kolbach wstrząsanych

po uzupełnieniu podłoża do jego pierwotnej objętości oraz konduktancję wliczoną z uwzględnieniem ilości odparowanej z podłoża wody. Dynamika zmian we wszystkich wariantach miała podobny przebieg, jednakże konduktancja oznaczana bezpośrednio malała wolniej niż w dwóch pozostałych wariantach. Zależność pomiędzy przyrostem biomasy i zmianami konduktancji podłoża opisano modelem matematycznym (Rys. 4):

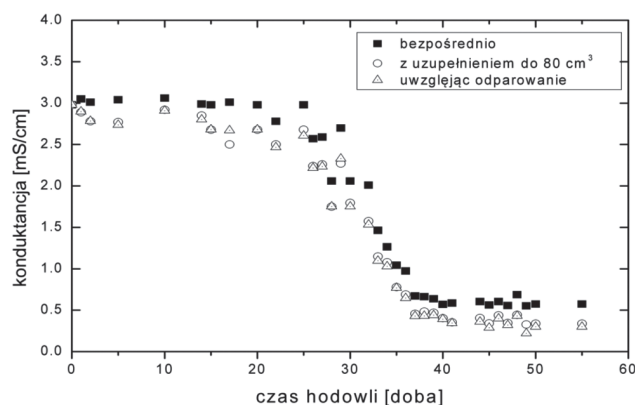
$$\kappa = aX + b \quad (1)$$

gdzie:

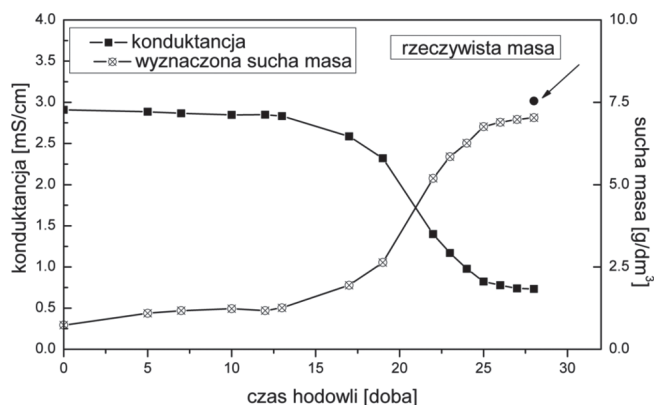
$X$  – biomasa, [g/dm<sup>3</sup>],

$\kappa$  – konduktancja właściwa [mS/cm],

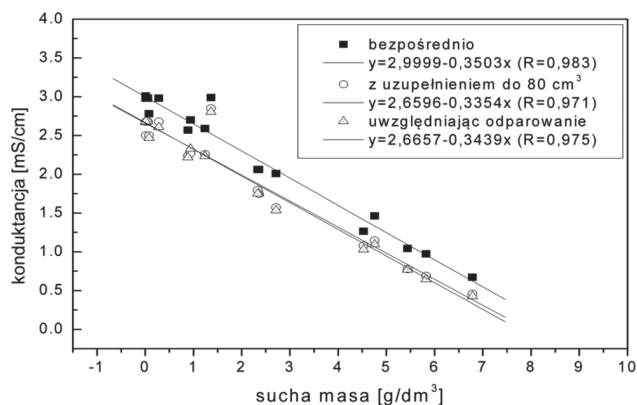
$a$  i  $b$  – wyznaczone doświadczalnie współczynniki.



Rys. 3. Zmiany wartości konduktancji podczas hodowli korzeni włośnikowatych *Paulownia tomentosa*



Rys. 5. Zmiany konduktancji w czasie hodowli korzeni włośnikowatych *P. tomentosa* w bioreaktorze rozpyłowym o pojemności 10 dm<sup>3</sup> i wyznaczona na tej podstawie dynamika przyrostu biomasy



Rys. 4. Zmiany konduktancji właściwej podłoża w funkcji zmian biomasy korzeni w kolejnych dobach hodowli korzeni włośnikowatych *Paulownia tomentosa* w kolbach wstrząsanych

Otrzymano w ten sposób zależności liniowe dla:

– bezpośredniego oznaczenia konduktancji podłoża pochodzanego:

$$\kappa = 3,00 \pm 0,05 - 0,35 \pm 0,01X \quad (2)$$

– oznaczenia po uzupełnieniu podłoża wodą do jego pierwotnej objętości:

$$\kappa = 2,66 \pm 0,07 - 0,34 \pm 0,02X \quad (3)$$

– z przeliczeniem uwzględniającym odparowaną wodę:

$$\kappa = 2,67 \pm 0,06 - 0,34 \pm 0,02X \quad (4)$$

Pomimo niewielkich różnic, można przyjąć, że każdy sposób oznaczenia konduktancji może być wykorzystany do śledzenia wzrostu korzeni.

Obliczono także zależność odwrotną, tj. zmian biomasy korzeni w funkcji zmian konduktancji podłoża, zgodnie z propozycją z pracy [Suresh i in., 2004]. Otrzymano w ten sposób równanie

$$X = 8,34 \pm 0,25 - 2,75 \pm 0,10\kappa \quad (5)$$

Podczas hodowli korzeni włośnikowatych w bioreaktorze 10 dm<sup>3</sup> (Rys. 1) badano przebieg wzrostu biomasy korzeni, monitorując zmiany konduktancji. Wyniki przedstawiono na rys. 5. Na podstawie wykonanych pomiarów konduktancji i wykorzystując do obliczeń równanie (5) wyznaczono krzywą wzrostu korzeni. Obliczona wartość końcowa masy korzeni była o 6,8% niższa od rzeczywistej.

Określenie końcowej masy korzeni w bioreaktorze na podstawie pomiarów konduktancji dla kultur korzeni *A. rusticana* wykonano w pracy [Taya i in., 1989]. Po 25 dobach hodowli w bioreaktorze mieszadłowym wyznaczone konduktometrycznie wartości suchej masy wynosiły: 5,1 kg/m<sup>3</sup> (rzeczywista 4,8 kg/m<sup>3</sup>); w bioreaktorze *air-lift*: 5,1 kg/m<sup>3</sup> (rzeczywista 2,8 kg/m<sup>3</sup>); w bioreaktorze ze złożem zraszanym: 7,1 kg/m<sup>3</sup> (rzeczywista 6,8 kg/m<sup>3</sup>). Duże różnice między biomasą oszacowaną za pomocą konduktancji i rzeczywistą zważoną występowały w bioreaktorach mieszadłowym i *air-lift*. Metoda nie w każdym zatem przypadku

pozwałała na dokładny pomiar biomasy, ale podczas trwania hodowli dawała obraz jego przebiegu – w fazie najintensywniejszego wzrostu konduktancja gwałtownie malała. W dwuetapowych kulturach korzeni transformowanych *Duboisia leichhardtii* w bioreaktorze stwierdzono, że ujemna korelacja występowała między konduktancją a biomasą podczas intensywnego wzrostu biomasy korzeni, ale nie było jej w drugim etapie procesu, podczas produkcji skopolaminy. Takie obserwacje mogą być istotne w projektowaniu i regulowaniu procesów biosyntezy określonych metabolitów [Muranaka i in., 1993].

### Podsumowanie

W kulturach korzeni włośnikowatych *P. tomentosa* w kolbach wstrząsanych stwierdzono ujemną korelację między wzrostem biomasy i zmianą konduktancji w czasie intensywnego namnażania korzeni.

Wyznaczono bezpośrednią zależność liniową zmian konduktancji podłoża w funkcji zmian biomasy korzeni w kolejnych dobach hodowli i opisano ją równaniem matematycznym. Zależność matematyczną zastosowano do śledzenia wzrostu korzeni *P. tomentosa* w bioreaktorze rozpyłowym o pojemności 10 dm<sup>3</sup>, na podstawie wyników pomiarów konduktancji. Obliczony wynik końcowy był niższy od rzeczywistego o 6,8%.

Opracowana pośrednia metoda oznaczania przyrostu biomasy podczas prowadzenia kultur roślinnych w bioreaktorze pozwala na przybliżone oszacowanie biomasy korzeni włośnikowatych *Paulownia tomentosa* w bioreaktorze o pojemności 10 dm<sup>3</sup> w oparciu o konduktancję podłoża.

### LITERATURA

- Huang S.Y., Hung C.H., Chou S.N., 2004. Innovative strategies for operation of mist trickling reactors for enhanced hairy root proliferation and secondary metabolite productivity. *Enz. Microb. Technol.*, 35, 22-32. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.011
- Muranaka T., Ohkawa H., Yamada Y., 1993. Continuous production of scopolamine by a culture of *Duboisia leichhardtii* hairy root clone in a bioreactor system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 219-223. DOI: 10.1007/BF00170370
- Pawłowska B., 2004. Badania kultur korzeni transformowanych roślin leczniczych w bioreaktorze zasilanym rozpyloną pożywką. Praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź.
- Ramakrishnan D., Luyk D., Curtis W.R., 1999. Monitoring biomass in root culture systems. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 6, 711-721. DOI:10.1002/(SICI)1097-0290(19990320)62:6<711::AID-BIT10>3.3.CO;2-S
- Suresh B., Rajasekaran T., Ramachandra-Rao S., Raghavarao K.S.M.S., Ravishankar G.A., 2001. Studies on osmolarity, conductivity and mass transfer for selection of a bioreactor for *Tagetes patula* L. hairy roots. *Process. Biochem.*, 36, 987-993. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00132-7
- Suresh B., Bais H.P., Raghavarao K.S.M.S., Ravishankar G.A., Ghildyal N.P., 2005. Comparative evaluation of bioreactor design using *Tagetes patula* L. hairy roots as a model system. *Process. Biochem.*, 1509-1515. DOI: 10.1016/j.procbio.2003.10.017
- Taya M., Yoyama A., Kondo O., Kobayashi T., Matsui C., 1989. Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. *J Chem. Eng.* 1, 22, 84-89. DOI: 10.1252/jcej.22.84