



Warunki wzrostu korzeni transformowanych w bioreaktorach

Beata Pawłowska¹, Stanisław Ledakowicz¹, Aleksander Chmiel²

¹ Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

² Zakład Biosyntezy Środków Leczniczych, Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny, Łódź

The conditions of transformed roots growth in bioreactors

Summary

Transformed roots are also called transgenic roots or due to their appearance – hairy roots. Transformed roots are obtained by infection of plants or parts of them with soil bacteria, *Agrobacterium rhizogenes*. Genetically transformed roots are characterised by rapid and stable growth of biomass, genetic stability, and stable biosynthesis of metabolites. Hairy roots can be an alternative source of many economically important chemicals like enzymes, pigments, flavours and especially bioactive pharmaceuticals. Cultures of transformed roots are comparatively easy to cultivate in shaking flasks. Application of flasks does not allow to obtain great amount of biomass. There is a necessity of scaling up the culture using bioreactors. The first attempts of scaling up the culture were connected with bioreactors designed for microbiological processes. However, these bioreactors are inadequate for hairy roots cultures. Some promising results were achieved in the case of using mist bioreactor. This paper is a review of bioreactors employed in cultures of hairy roots and mathematical modelling of hairy root growth.

Key words:

hairy root cultures, bioreactors, metabolites, hairy root growth, mathematical modelling of hairy root growth.

Adres do korespondencji

Beata Pawłowska,
Katedra Inżynierii
Bioprosesowej,
Wydział Inżynierii
Procesowej i Ochrony
Środowiska,
Politechnika Łódzka,
ul. Wólczańska 213,
93-005 Łódź;
e-mail:
beatapaw@wipos.p.lodz.pl

biotechnologia

2 (69) 88–102 2005

1. Wprowadzenie

Alternatywnym źródłem wielu cennych produktów pochodzenia roślinnego, m.in. substancji aktywnych farmakologicznie, substancji aromatycznych, barwników, niektórych białek (enzymów)

i specyficznych polisacharydów mogą być roślinne kultury *in vitro*, w tym korzenie transformowane (transgeniczne, włośnikowate) [1,2]. Korzenie transformowane, powstające w wyniku transformacji plazmidowego DNA bakterii glebowych *Agrobacterium rhizogenes*, charakteryzują się szybkim przyrostem biomasy, stabilnością genetyczną, wydajną, utrzymującą się na stałym poziomie biosyntezą metabolitów [1,2].

Hodowle korzeni transformowanych, które stosunkowo łatwo przebiegają w kolbach wstrząsanych, stwarzają problemy w procesach bioreaktorowych. Ze względu na charakter wzrostu i delikatną strukturę korzeni włośnikowatych konieczne jest zastosowanie bioreaktorów o specjalnej konstrukcji [3,4].

2. Bioreaktory dla kultur korzeni transformowanych

Bioreaktory dla kultur korzeni transformowanych można sklasyfikować według ogólnego kryterium metody dostarczania energii do mieszania i transportu masy [5], są to: bioreaktory z mieszaniem mechanicznym (rys. 1), z mieszaniem pneumatycznym (rys. 2), z mieszaniem hydraulicznym (rys. 3). Pierwsze próby powiększenia skali hodowli korzeni włośnikowatych z kolb wstrząsanych związane były z użyciem bioreaktorów mieszadłowych zaprojektowanych do procesów mikrobiologicznych. W bioreaktorach tych, siły ścinające występujące w strefie pracy mieszadła niszczyły delikatną strukturę korzeni włośnikowatych, powodując powstawanie kalusa [3]. Podobne problemy występowały w hodowli korzeni w bioreaktorze bębnowym [6]. Także w klasycznych bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym (kolumny barbotażowe, bioreaktory typu *air-lift*), gdzie mieszanie zachodzi pod wpływem pęcherzyków powietrza, korzenie ulegały niszczeniu [7,8]. Konieczna była zatem inżynierska modyfikacja bioreaktorów o klasycznej budowie. Przykłady kultur korzeni włośnikowatych hodowanych w bioreaktorach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

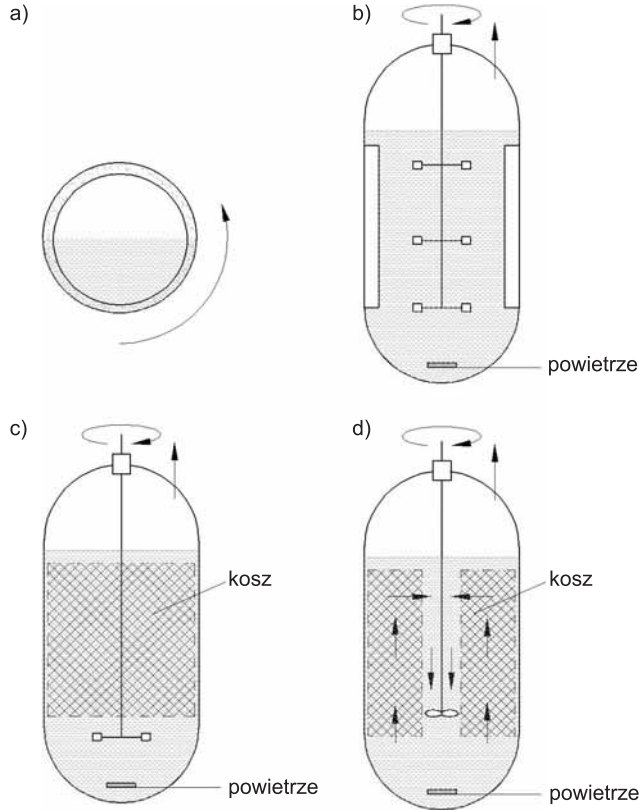
Przykłady zastosowania bioreaktorów w kulturach korzeni transformowanych

Typ bioreaktora	Pojemność (dm ³)	Kultura	Główne metabolity	Literatura
1	2	3	4	5
bioreaktory z mieszaniem mechanicznym				
z mieszadłem mechanicznym	0,3	<i>Armoracia rusticana</i>	–	[8]
	2	<i>Tagetes patula</i>	tiofeny	[40]
	2	<i>Panax ginseng</i>	ginzenozydy	[41]
	2	<i>Panax quiquefolium</i>	ginzenozydy	[41]
	1	<i>Daucus carota</i>	–	[6]
	14	<i>Catharathus roseus</i>	ajmalicyna, katarantyna	[31]

1	2	3	4	5
z mieszadłem mechanicznym z oddzieloną częścią mieszadłową	0,3	<i>Duboisia leichhardtii</i>	kopolamina	[10]
	2	<i>Panax ginseng</i>	ginzenozydy	[9]
	3,5	<i>Catbaranthus roseus</i>	ajmalicyna, katarantyna	[15]
	14	<i>Datura stramonium</i>	hiocsyjamina	[42]
bębnowy	1	<i>Daucus carota</i>	–	[6]
bębnowy z pianką poliuretanową do immobilizacji korzeni	1	<i>Daucus carota</i>	–	[6]
bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym				
kolumna barbotażowa	0,25	<i>Hyoscyamus muticus</i>	–	[19]
	1,5	<i>Fragaria × ananassa</i>	–	[24]
	1,5	<i>Artemisia annua</i>	artemizynina	[11]
	2,5	<i>Artemisia annua</i>	artemizynina	[14]
	15	<i>Solanum tuberosum</i>	–	[43]
	20	<i>Coleus forskokoblii</i>	forkoskolina	[44]
kolumna barbotażowa z półkami <i>air-lift</i>	2,5	<i>Artemisia annua</i>	rtemizynina	[14]
	1,2	<i>Panax ginseng</i>	ginzenozydy	[45]
	1,5	<i>Nicotina rusticana</i>	nikotyna	[3]
	9	<i>Nicotina rusticana</i>	nikotyna	[12]
	9	<i>Trigonella foenum-graceum</i>	diosgenina	[12]
<i>air-lift</i> z siatkowymi półkami	2,5	<i>Artemisia annua</i>	artemizynina	[14]
<i>air-lift</i> z siatkowym cylindrem do immobilizacji korzeni	9	<i>Nicotina rusticana</i>	nikotyna	[12]
	9	<i>Trigonella foenum-graceum</i>	diosgenina	[12]
bioreaktory z mieszaniem hydraulicznym				
ze złożem upakowanym	1	<i>Nicotina rusticana</i>	nikotyna	[17]
	1,4	<i>Beta vulgaris</i>	–	[22,23]
	3,5	<i>Catbaranthus roseus</i>	ajmalicyna, katarantyna	[15]
ze złożem zraszonym	1,4	<i>Hyoscyamus muticus</i>	–	[19]
	4	<i>Fragaria × ananassa</i>	–	[24]
ze złożem cyklicznie zraszonym	0,25	<i>Hyoscyamus muticus</i>	–	[19]
	0,3	<i>Armoracia rusticana</i>	–	[8]
ze złożem cyklicznie zalewanym	0,3	<i>Armoracia rusticana</i>	–	[8]
rozpyłowy	1,5	<i>Artemisia annua</i>	artemizynina	[11]
	1,8	<i>Carthamus tinctorius</i>	–	[22,23]
	1,8	<i>Beta vulgaris</i>	–	[22,23]
	3	<i>Stizolobium bassjoo</i>	–	[28]
	4	<i>Fragaria × ananassa</i>	–	[24]
	5	<i>Paulownia tomentosa</i>	werbaskozyd	[27]
	9	<i>Atropa belladonna</i>	atropina	[46]
	10	<i>Paulownia tomentosa</i>	werbaskozyd	[27]

2.1. Bioreaktory z mieszaniem mechanicznym

W bioreaktorze mieszadłowym strefa rosnących korzeni transformowanych, oddzielana jest od destrukcyjnego wpływu mieszadła za pomocą stalowego koszyka, wewnątrz którego następuje rozwój biomasy. W badaniach przeprowadzonych dla korzeni *Nicotiana rustica* [3], *Panax ginseng* [9] i *Duboisia leichhardtii* [10] potwierdzono skuteczność zastosowanej zmodyfikowanej konstrukcji bioreaktora z mieszadłem mechanicznym.

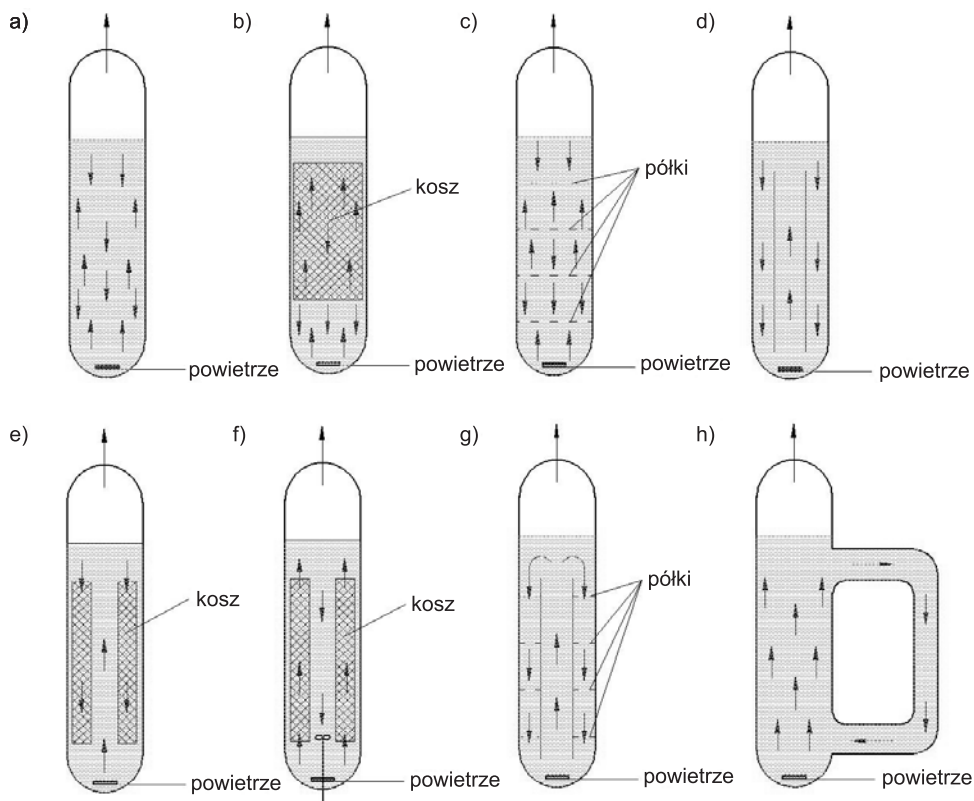


Rys. 1. Bioreaktory z mieszaniem: a) bębnowy, b) klasyczny z mieszadłem mechanicznym do procesów mikrobiologicznych, c) z mieszadłem mechanicznym z wydzieloną częścią do wzrostu korzeni, d) z mieszadłem mechanicznym – śmigłowym z wydzieloną częścią do wzrostu korzeni.

W typowym bioreaktorze bębnowym, zastosowanym przez Kondo i wsp. [6] do hodowli korzeni transformowanych *Daucus carota*, podczas obrotowego ruchu bębna, korzenie ulegały niszczeniu. Bioreaktor wyposażono w warstwę poliuretanowej pianki, przymocowanej do wewnętrznej ścianki bioreaktora. Pianka poliuretanowa stanowiła rodzaj nośnika dla korzeni i stwarzała dobre warunki podtrzymania ich i mechanicznej ochrony. Dzięki takiej modyfikacji bioreaktora bębnowego, korzenie transformowane nie ulegały odrywaniu się i niszczeniu, co poprawiło ogólną wydajność procesu [6].

2.2. Bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym

W bioreaktorach z mieszaniem pneumatycznym mieszanie zachodzi pod wpływem pęcherzyków sprężonego powietrza wprowadzanych przez dysze w dolnej części bioreaktora. Do hodowli korzeni transformowanych proponowane są zarów-



Rys. 2. Bioreaktory z mieszaniem pneumatycznym: a) kolumna barbotażowa z wkładem mechanicznym, c) kolumna barbotażowa z półkami, d) bioreaktor typu *air-lift*, e) bioreaktor typu *air-lift* z nośnikiem mechanicznym z wewnętrzną recykulacją, f) bioreaktor typu *air-lift* z nośnikiem mechanicznym z zewnętrzną recykulacją, g) bioreaktor typu *air-lift* z półkami, h) bioreaktor typu *air-lift* z zewnętrzną rurą recykulacyjną.

no kolumny barbotażowe jak i bioreaktory typu *air-lift* [7,8,11]. Korzystna okazała się modyfikacja tego typu bioreaktorów polegająca na zastosowaniu mechanicznej matrycy, umożliwiającej „przyczepienie” korzeni i zabezpieczenie ich w ten sposób przed uszkodzeniem. Takie unieruchomienie (immobilizacja) może być przeprowadzone za pomocą wprowadzonego do kolumny barbotażowej koszyka z siatki stalowej [11] lub nylonowej [12]. Ten sposób immobilizacji stosowano dla kultur korzeni *Trigonella foenum-graceum* w bioreaktorze *air-lift* [12], dla kultur *Artemisia annua* w kolumnie barbotażowej [11]. Nośnikiem dla korzeni może być także poliuretanova pianka. Taki sposób immobilizacji zastosowano w bioreaktorze *air-lift* dla korzeni *Armoratia rusticana* [8] i *Datura metel* [13]. Do unieruchomienia korzeni *Artemisia annua* [14] w bioreaktorze *air-lift* i kolumnie barbotażowej zastosowano półki ze sta-

lowej siatki. Taka metoda umożliwia zabezpieczenie korzeni przed zniszczeniem, a także umożliwia wzrost korzeni we wszystkich kierunkach.

2.3. Bioreaktory z mieszaniem hydraulicznym

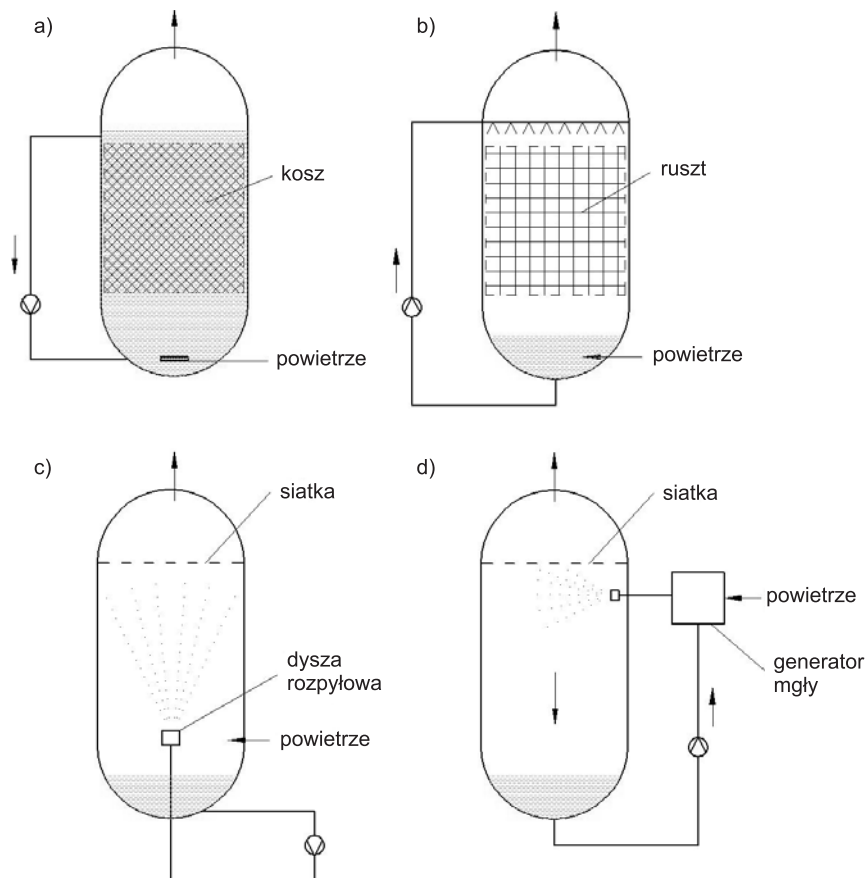
W bioreaktorach z mieszaniem hydraulicznym energia dostarczana jest za pomocą zewnętrznej pompy. Do hodowli korzeni włośnikowatych proponowano bioreaktor ze złożem upakowanym z biomasą rosnącą na mechanicznym nośniku zanurzonym w cyrkulującym, napowietrzanym podłożu. Taki bioreaktor zastosowano dla kultur korzeni włośnikowatych *Catharathus roseus* [15], *Beta vulgaris* [16] i *Nicotiana rusticana* [17].

W kulturach korzeni *Armoracia rusticana* zastosowano bioreaktor mieszany hydraulicznie, z cyklicznie zalewanym złożem korzeni immobilizowanych na pianie poliuretanowej [8].

Do tej grupy bioreaktorów zaliczany jest także bioreaktor z ciągłą fazą gazową i rozproszoną fazą ciekłą, w którym korzenie zawieszono na nośniku w atmosferze powietrza, zraszane są pożywką w sposób ciągły lub okresowy. W tego typu bioreaktorze przeprowadzono hodowle korzeni *Nicotiana glauca*, *Nicotiana rustica*, *Datura stramonium* [18], *Hyoscyamus muticus* [19] i *Armoracia rusticana* [20].

Bioreaktor z systemem zraszającym zastosowano w kulturze korzeni włośnikowatych *Datura stramonium* [21]. Układ bioreaktora składał się z kilku zasadniczych części: głównego bioreaktora o pojemności 500 dm³, bioreaktora posiewowego o pojemności 10 dm³ i rury o specjalnej konstrukcji, umożliwiającej rozdrobnienie korzeni i sterylną inokulację głównego bioreaktora. Proces przebiegał w trzech etapach. W pierwszym etapie przez 14 dni namnażano biomasę pochodzącą z kolb wstrząsanych w bioreaktorze „wysiewającym” w podłożu inokulacyjnym. Po tym czasie, naczynie wysiewające było umieszczane bezpośrednio nad króćcem inokulacyjnym bioreaktora głównego i za pomocą rury sterylnie przenoszono biomasę. W drugim etapie rozdrobnione fragmenty korzeni były recyrkulowane w inokulacyjnym podłożu, co powodowało ich zaczepianie na zawieszonych haczykach, następnie podłoże inokulacyjne było wypompowane. W trzecim etapie uruchamiano system zraszający; korzenie rosły zawieszono na haczykowatych łańcuchach w atmosferze powietrza, zraszane podłożem produkcyjnym.

Bioreaktory rozpyłowe nazywane też mgłowymi (*mist bioreactor*) są specjalną konstrukcją bioreaktora ze złożem zraszającym. Korzenie transformowane rozwijają się w nich na specjalnych nośnikach w atmosferze jałowego powietrza, natomiast zasilanie ich w składniki odżywcze zachodzi poprzez doprowadzanie pożywki rozpylonej w postaci mgły – kropelek o średnicy kilku mikrometrów. Mgła może zostać wytworzona za pomocą ultradźwiękowych generatorów mgły [11,22,23] lub przez zastosowanie dysz rozpylających o specjalnej budowie [24]. W konstrukcji takiego bioreaktora wyeliminowano warunki powstawania sił ścinających i ułatwiono



Rys. 3. Bioreaktory z mieszaniem hydraulicznym: a) z wydzieloną przestrzenią dla korzeni, b) ze złożem zraszanym, na rusztach immobilizacji korzeni, c) rozpyłowy – rozpylanie cieczy za pomocą generatora mgły, d) rozpyłowy – rozpylanie cieczy za pomocą dyszy rozpyłowej.

dostęp tlenu do wzrastającej biomasy [25-27]. Efekty te warunkują przydatność takiego rodzaju bioreaktora do prowadzenia hodowli korzeni włośnikowatych.

W pracach eksperymentalnych, których celem było porównanie różnych typów bioreaktorów do hodowli korzeni transformowanych, stwierdzono wyższą wydajność biomasy i metabolitów w bioreaktorach rozpyłowych [11,24]. W pracy Kim i wsp. [11] badano produkcję artemizyniny w kulturach korzeni *Artemisia annua* w dwóch rodzajach bioreaktorów. Okazało się, że trzykrotnie więcej metabolitu uzyskano w bioreaktorze rozpyłowym (2,64 $\mu\text{g/g s.m.}$) niż w kolumnie barbotażowej (0,98 $\mu\text{g/g s.m.}$). Nuutila i wsp. [24] porównali wzrost korzeni *Fragaria x ananassa* w bioreaktorze z korzeniami zraszanymi (*trickling bioreactor*), w bioreaktorze rozpyłowym (*mist bioreactor*) i kolumnie barbotażowej. Najwyższy przyrost świeżej biomasy uzyskali w bioreaktorze rozpyłowym (37 g/dm^3), podobny w kolumnie barbotażowej.



Fot. 1. Układ bioreaktora zasilanego rozpyloną pożywką.



Fot. 2. Kultura korzeni włośnikowatych *Paulownia tomentosa* w bioreaktorze zasilanym rozpyloną pożywką (o pojemności 5 dm³).

zowej (32 g/dm³), natomiast najniższy w bioreaktorze zraszonym (24 g/dm³) [24]. Hodowle korzeni *Nicotiana tabacum* w bioreaktorach: rozpyłowym, zraszonym, typu *air-lift* oraz w kolbach wstrząsanych porównane zostały w pracy Whitney [4]. Przyrost biomasy korzeni w bioreaktorze rozpyłowym (127,6 g) był ponad dwukrotnie wyższy niż w pozostałych hodowlach. W porównaniu z hodowlą kultur korzeni *Paulownia tomentosa* w kolbach wstrząsanych po 28 dobach hodowli, wyższą wydajność biomasy i wyższą produkcję werbaskozydu uzyskano w bioreaktorze rozpyłowym (fot. 1 i 2) [27].

2.4. Monitorowanie wzrostu biomasy w bioreaktorach

Podczas prowadzenia hodowli korzeni transformowanych w bioreaktorach zasadniczym problemem analitycznym jest oznaczanie biomasy. Ponieważ nie ma możliwości bezpośredniego pomiaru jej przyrostu, w związku z tym poszukuje się metod pośrednich. W celu dobrania odpowiedniej metody pomiaru biomasy obserwowane były korelacje pomiędzy przyrostem biomasy (świeżej lub suchej masy) i róż-

nymi, zmieniającymi się parametrami podłoża. Badane były zmiany stężenia cukru [28], zmiany ciśnienia osmotycznego [29,30] i zmiany konduktancji [11,15,28-31]. Pomiar konduktancji, jako parametru określającego przyrost biomasy korzeni włośnikowatych wykorzystywany był w wielu pracach. Próbowano sformułować różne matematyczne zależności pomiędzy przyrostem biomasy i zmieniającą się konduktancją podłoża hodowlanego:

$$X = A + B \cdot \kappa \quad [27,28] \quad (1)$$

$$\Delta X = a \cdot \Delta \kappa \quad [8,27,30] \quad (2)$$

gdzie: κ – konduktancja, X – masa korzeni, $\Delta \kappa$ – zmiana konduktancji, ΔX – wzrost suchej biomasy, a , A , B – wyznaczone doświadczalnie współczynniki.

Korelację pomiędzy wzrostem biomasy i zmianą konduktancji zaproponowano dla kultur korzeni włośnikowatych *P. tomentosa* hodowanych w kolbach wstrząsanych. Pomiar konduktancji wykorzystano do śledzenia wzrostu korzeni *P. tomentosa* w bioreaktorze rozpyłowym o pojemności 10 dm³. Korzystając z wyznaczonych zależności liniowych w kolbach wstrząsanych, wyznaczono hipotetyczny wzrost biomasy w bioreaktorze. Końcowy wynik uzyskany z liniowej zależności był niższy od rzeczywistego o 6,8%. Stwierdzono, że konduktancja może być zastępczym parametrem monitorującym wzrost biomasy korzeni *P. tomentosa* w bioreaktorze rozpyłowym [27].

Wyznaczenia końcowej masy korzeni na podstawie pomiarów konduktancji dokonano w pracy Taya i wsp. dla kultur korzeni *A. rusticana* [8]. Po 25 dobach hodowli w bioreaktorze z mieszadłem mechanicznym, na podstawie pomiaru konduktancji, uzyskano następujące wartości dotyczące biomasy: 5,1 kg s.m./m³ (rzeczywista 4,8 kg s.m./m³); w bioreaktorze *air-lift*: 5,1 kg s.m./m³ (rzeczywista 2,8 kg s.m./m³); w bioreaktorze ze złożem zraszanym: 7,1 kg s.m./m³ (rzeczywista 6,8 kg s.m./m³). Duży błąd pomiędzy oszacowaną za pomocą konduktancji masą i zważoną masą rzeczywistą na końcu procesu obserwowano w hodowlach prowadzonych w bioreaktorze z mieszadłem mechanicznym i typu *air-lift*. Proponowana metoda nie w każdym przypadku pozwalała na dokładny pomiar biomasy, ale podczas trwania hodowli dawała obraz jego przebiegu – w fazie najintensywniejszego wzrostu, gwałtownie malała konduktancja.

W dwuetapowych kulturach korzeni transformowanych *Duboisia leichhardtii* w bioreaktorze stwierdzono, że konduktancja spadała podczas pierwszego etapu hodowli, czyli w czasie intensywnego wzrostu biomasy korzeni, natomiast pozostawała niezmienną w drugim etapie procesu, podczas produkcji skopolaminy. Takie obserwacje mogą być istotne w projektowaniu i regulowaniu procesów biosyntezy określonych metabolitów [10].

Badanie zmiany stężenia cukru w podłożu pohodowlanym może także stanowić metodę pośredniego określania wzrostu korzeni. Matematyczną zależność pomiędzy wzrostem korzeni i zmianą zawartości cukru w pożywce stwierdzono dla korzeni *Stizolobium hassjoo* [28]:

$$X = B + A S \quad (3)$$

gdzie X – sucha masa korzeni, S – stężenie cukru, A , B – współczynniki w równaniu.

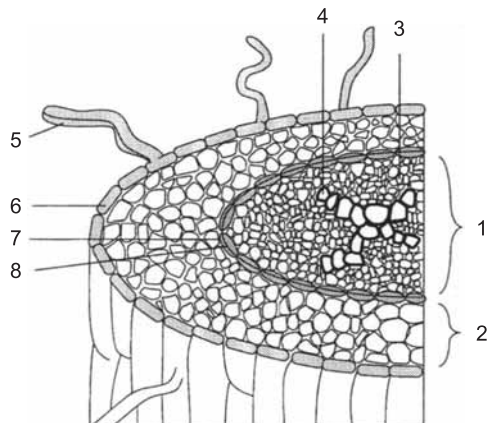
Kolejną propozycją było badanie zmian ciśnienia osmotycznego. Taką metodę oszacowania przyrostu biomasy zaproponowano dla korzeni transformowanych *Hyoscyamus muticus* [29] i *Tagetes patula* [30].

Odminną koncepcją pomiaru wzrostu korzeni w kulturze bioreaktorowej było wyposażenie bioreaktora w statyw o trzech nóżkach, z których jedna (skrótowa) umieszczona byłaby na wadze [27]. Rozwiązanie to wymagało odpowiedniego wykalibrowania wskazań wagi jako części rzeczywistego przyrostu biomasy w bioreaktorze. Okresowe przerwy w doprowadzeniu pożywki pozwalały na pomiar masy bioreaktora z rosnącymi korzeniami po spłynięciu nadmiaru pożywki W ten sposób śledzono przyrost mokrej biomasy. Wykorzystana w eksperymencie metoda nie przyniosła jednak oczekiwanego rezultatu, ponieważ waga często ulegała rozkalibrowaniu, uniemożliwiając dokładny pomiar.

3. Kinetyka i modelowanie wzrostu korzeni transformowanych

Badania kinetyki procesu biotechnologicznego obejmują pomiar i analizę szybkości wzrostu biomasy, szybkości wykorzystywania składników podłoża, tworzenia metabolitów i ustalenie zależności matematycznych pomiędzy tymi wielkościami [32]. Poznanie kinetyki pozwala na opisanie procesów biologicznych za pomocą równań matematycznych i stworzenie matematycznych modeli wzrostu. W dotychczasowym piśmiennictwie przedmiotem wielu prac eksperymentalnych jest modelowanie procesów mikrobiologicznych, pozwalające przewidzieć szybkość wzrostu mikroorganizmów [5,32]. Niewiele natomiast uwagi poświęcono modelowaniu wzrostu korzeni włośnikowatych. Kultury korzeni i innych zorganizowanych tkanek roślinnych znacznie różnią się od kultur mikrobiologicznych i roślinnych kultur zawieszinowych. Formowanie nowych komórek zachodzi w specyficznych tkankach merystematycznych, podczas gdy pozostałe komórki podlegają czasowym zmianom w inne typy tkanek, takich jak: floem, ksylem [33]. Zróżnicowanie komórek korzenia przedstawiono na rysunku jego poprzecznego przekroju (rys. 4). Podejmując próby modelowania wzrostu korzeni należy uwzględnić fakt, że nie wszystkie komórki mają porównywalny cykl komórkowy i znajdują się w porównywalnych fazach cyklu komórkowego [34]. W związku z tym poszukiwane są metody analizy zmian zachodzących w komórkach podczas wzrostu korzeni [35].

W badaniach korzeni włośnikowatych *Artemisia annua* Wyslouzil i wsp. [36] obserwowali rzeczywisty wzrost pojedynczych korzeni w specjalnie skonstruowanych bioreaktorach i opisali wydłużanie i rozgałęzianie się pojedynczych korzeni w funkcji czasu. Zaproponowana zależność ma postać:

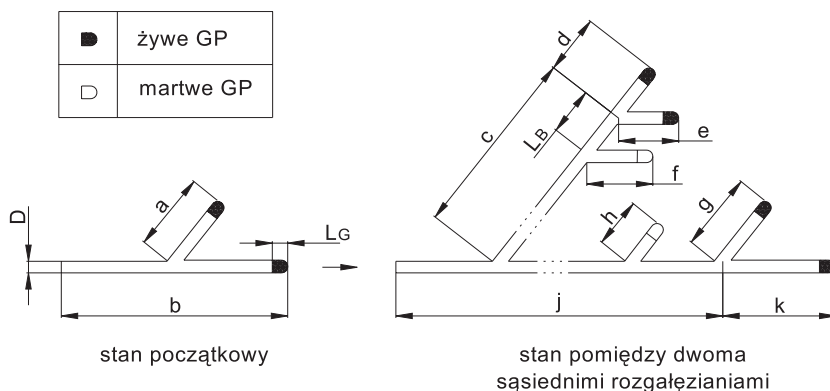


Rys. 4. Schemat poprzecznego przekroju korzenia wg Yu [34]: 1) plerom – walec osiowy, 2) peryblem – kora pierwotna, 3) floem, 4) ksylem, 5) włosniki, 6) epiblema – skórka korzenia, 7) endoderma – śródkórnia, 8) pasma Caspary'ego.

$$\text{Przyrost długości} = \frac{L - L_0}{L_0} \quad (4)$$

$$\text{Jednostka wzrostu korzenia} = \frac{\text{całkowita długość korzenia}}{\text{liczba wierzchołków}} \quad (5)$$

W modelu wzrostu korzeni włosnikowatych Kino-Oka i wsp. [37], przyjęli założenia zgodne z morfologią rozgałęziania i wydłużania się korzeni (rys. 5). W modelu tym założono, że:



Rys. 5. Schemat wzrostu korzeni włosnikowatych wg Kino-Oka i wsp. [38].

- 1) korzenie włósnikowate rosną w sposób jednowymiarowy, wydłużając się na wierzchołku korzenia – merystemie (wierzchołek wzrostu, GP) o długości L_G ;
- 2) podwojenie się GP w korzeniu włósnikowatym następuje w ciągu niezna-
czącego czasu; każdy GP rośnie i formuje wysoko rozgałęziony korzeń włósnikowa-
ty;
- 3) czynniki środowiska, takie jak np. siły ścinające, powodują zanikanie GP;
- 4) korzeń jest cylindrem o średnicy D i długości L .

W podstawowym założeniu 1, liniowy wzrost jednego GP opisano równaniem:

$$dL/dt = \mu L_G \quad (6)$$

gdzie μ – właściwa szybkość wydłużania GP; Δt – czas pomiędzy kolejnymi po-
działami GP, Δt przedstawiono wzorem:

$$\Delta t = \int_0^L dL / \mu L_G \quad (7)$$

Warunki graniczne:

$$\begin{aligned} t = 0 ; L = L_0 ; N = N_0 ; (n_b = 1) \\ t = t_{I,nb} ; L = L_{I,nb} ; N = N_{I,nb} ; (n_b \geq 2) \end{aligned}$$

gdzie: t – czas wzrostu korzeni, L – długość korzenia, N – liczba wierzchołków
GP, indeks 0 – warunki początkowe, I nb – wartości po czasie $t_{I,nb}$.

Szybkość niszczenia GP opisano wzorem:

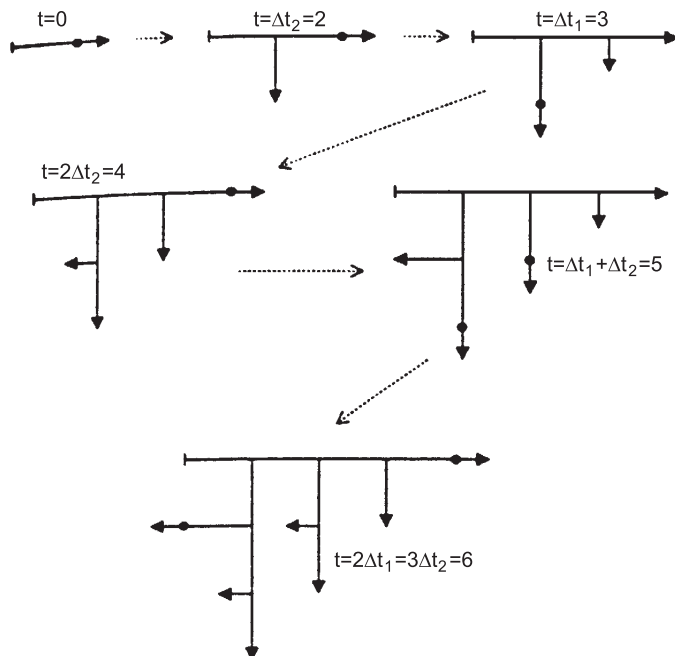
$$dN/dt = -k N \quad (8)$$

Wyznaczając ogólną długość korzenia L z pierwszego przedstawionego w mode-
lu równania, z uwzględnieniem zniszczenia N stożków GP, wyznaczono stężenie su-
chej masy korzeni X w następującej postaci:

$$X = \rho \pi (1 - W_c) L D^2 / 4 V \quad (9)$$

gdzie: W_c – zawartość wody w korzeniach, X – sucha biomasa korzeni, ρ – gę-
stość korzenia, μ – specyficzna szybkość wydłużania, L – długość korzenia włóśni-
kowatego, D – średnica korzenia, V – objętość podłoża.

W pracy Kim i wsp. [34] i Hjorsto [38] zaproponowano najpierw model roz-
gałęziania się korzenia (rys. 6), a następnie pewne modele segregowane wzrostu ko-
rzenia oraz stochastyczny model rozgałęziania korzenia z uwzględnieniem zamiera-
nia pewnej ilości stożków wzrostu. Zaproponowany model pozwala określić ilość
frakcji – $F(i,N)$ korzeni o N żywych wierzchołkach, po czasie $i \Delta t$ w sposób reku-
racyjny (na podstawie ilości frakcji po czasie $(i-1) \Delta t$).



Rys. 6. Schemat przyrostu odgałęzień wg Hjorsto [39]; odgałęzienia korzeni są oznaczone za pomocą strzałek, a miejsca tworzenia wierzchołka – za pomocą kropek; t – czas wzrostu korzenia, Δt_1 – czas, po którym powstaje wierzchołek na korzeniu rodzicielskim, Δt_2 – czas, po którym powstaje boczne odgałęzienie z wierzchołka na korzeniu rodzicielskim.

$$F(i, N) = \sum_{M=N/2}^{2^{i-1}} F(i-1, M) \frac{M!}{N/2! M-N/2!} p^{N/2} (1-p)^{M-N/2} \quad (10)$$

Zaprezentowano również wykorzystanie tego modelu do wyliczenia liczby korzeni z martwymi wierzchołkami.

$$F(i, 0) = \sum_{j=1}^i \sum_{M=1}^{2^{i-1}} F(j-1, M) (1-p)^M \quad (11)$$

gdzie: Δt – czas, po którym pewna ilość wierzchołków korzeni podwaja się przy założeniu, że żaden wierzchołek nie obumrze, N – ilość wierzchołków powstałych z ilości M w czasie Δt : $F(i, N)$ – ilość frakcji korzeni o N żywych wierzchołkach, po czasie $i \Delta t$: $F(i, 0)$ – ilość frakcji korzeni z martwymi wierzchołkami, po czasie $i \Delta t$: p – prawdopodobieństwo, że dany wierzchołek ulegnie podwojeniu, a nie obumrze w czasie Δt .

Wzrost kultur korzeni transformowanych próbowano opisać równaniami wykorzystywanymi w kulturach drobnoustrojowych. Podjęto próbę opisu wzrostu korzeni włóśnikowatych za pomocą krzywej logistycznej [27,31,39]:

$$X = X_M / (1 + Ae^{-k t}) \quad (12)$$

gdzie: X_M – maksymalna masa korzeni, k – współczynnik wzrostu, A – iloraz masy plonu do masy inokulatu, X – masa korzeni, t – czas hodowli.

Ten model zastosowano dla kultur korzeni włośnikowatych *P. tomentosa* i otrzymano: $X_M = 10,33$ [g/dm³], $k = 0,309$ [doba⁻¹]; $A = 880$ [27].

Model logistyczny wzrostu korzeni zaproponowali Moreno-Valenzuela i wsp. [31]. Dla kultur korzeni włośnikowatych *Catharathus roseus*; zaproponowano zależność $X = 13 / (1 + e^{-(0,157t)})$. Model logistyczny przedstawili także Rijwani i wsp. [39] dla kultur korzeni *Catharathus roseus*; dla kilku pasaży otrzymali: $X = X_M / (1 + e^{(4,71-0,27t)})$, $X = X_M / (1 + e^{(4,99-0,24t)})$, $X = X_M / (1 + e^{(5,16-0,21t)})$.

Przyrost masy korzeni opisywano także za pomocą krzywej wykładniczej:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (13)$$

Ten model wykorzystano w kulturze korzeni włośnikowatych *Paulownia tomentosa* do opisu fazy intensywnego wzrostu korzeni [27]. Wyznaczona właściwa szybkość wzrostu dla korzeni *P. tomentosa* wynosiła: $\mu = 0,173$ [doba⁻¹], a okres podwojenia biomasy korzeni $t_d = 4,01$ [doba].

4. Podsumowanie

W badaniach kultur korzeni włośnikowatych ważnym i aktualnym kierunkiem prac jest znalezienie optymalnej do ich wzrostu konstrukcji bioreaktora, umożliwiającej powiększenie skali hodowli i komercyjne wykorzystanie korzeni. Obiecujące wyniki osiągnięto w przypadku zastosowania bioreaktora rozpyłowego lub mgłowego nie stosowanego dotychczas do hodowli drobnoustrojów (*mist, nutrient-mist bioreactor*). W pracach badawczych, jak dotąd, niewiele uwagi poświęcono kinetyce i modelowaniu wzrostu korzeni włośnikowatych, zatem ten obszar inżynierii bioreaktorowej wymaga intensyfikacji badań.

Literatura

1. Dicosmo F., Misawa M., (1995), *Biotechnol. Adv.*, 13 (3), 425-453.
2. Bourgaud F., Gravat A., Milesi S., Gontier E., (2001), *Plant Sci.*, 161, 839-851.
3. Wilson P. D. G., Hilton M. G., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1987), *International Conference on Bioreactors and Biotransformations Gleneagles*, Scotland, UK.
4. Whitney P. J., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 13-17.
5. Shuler M. L., Kargi F., (2002), *Bioprocess Engineering, Basic Concepts*, PH PTR.
6. Kondo O., Honda H., Taya M., Kobayashi T., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (32), 291-294.
7. Kwok K. H., Doran P. M., (1995), *Biotechnol. Prog.*, 11, 429-435.
8. Taya M., Yoyama A., Kondo O., Kobayashi T., Matsui C., (1989), *J. Chem. Eng. Jpn.*, 1 (22).
9. Inomata S., Yokoyama M., Gozu Y., Shimizu T., Yanagi M., (1993), *Plant Cell Rep.*, (12), 681-686.

10. Muranaka T., Ohkawa H., Yamada Y., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 219-223.
11. Kim Y., Wyslouzil B. E., Weathers P. J., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 451-455.
12. Rodriguez-Mendiola M. A., Stafford A., Cresswell R., Arias-Castro C., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 697-702.
13. Cusido R. M., Palazon J., Pinol M. T., Bonfill M., Morales C., (1999), *Planta Med.*, 65, 144-148.
14. Liu C. Z., Wang Y. C., Ouyang F., Ye H. C., Li G. F., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20 (3), 265-268.
15. Nuutila A. M., Toivonen L., Kauppinen V., (1994), *Biotechnol. Tech.*, 8 (1), 61-66.
16. Kino-Oka M., Hitaka Y., Taya M., Tone S., (1999), *Chem. Eng. Sci.*, 54, 3179-3186.
17. Rhodes M. J. C., Hilton M., Parr A. J., Hamill J. D., Robins R. J., (1986), *Biotechnol. Lett.*, 8(6) 415-420.
18. Green K. D., Thomas N. H., (1996), *J. Fermet. Bioeng.*, 81 (5), 453-457.
19. McKelvey S. A., Gehring J. A., Hollar K. A., Curtis W. R., (1993), *Biotechnol. Prog.*, 9, 317-322.
20. Taya M., Hegglin M., Prenosil J. E., Bourne J. R., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 170-176.
21. Wilson P. D. G., (1997), Ed. Doran P. M., *Hairy roots. Culture and applications*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 179-191.
22. Diloirio A. A., Cheetham R. D., Weathers P. J., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 463-467.
23. Diloirio A. A., Cheetham R. D., Weathers P. J., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 457-462.
24. Nuutila A. M., Lindqvist A. S., Kauppinen V., (1997), *Biotechnol. Tech.*, 11 (6), 363-366.
25. Weathers P., Wyslouzil B. E., Whippe M., (1997), Ed. Doran P. M., *Hairy roots. Culture and applications*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 191-201.
26. Pawłowska B., Chmiel A., (2003), *Biotechnologia*, 4(63), 142-153.
27. Pawłowska B., (2004), *Badania kultur korzeni transformowanych roślin leczniczych w bioreaktorze zasilany rozpyloną pożywką*, praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź.
28. Huang S. Y., Hung C. H., Chou S. N., (2004), *Enzyme Microb. Technol.*, 35, 22-23.
29. Ramakrishnan D., Luyk D., Curtis W. R., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 62 (6), 711-721.
30. Suresh B., Rajasekaran T., Ramachandra-Rao S., Raghavarao K. S. M. S., Ravishankar G. A., (2001), *Process Biochem.*, 36, 987-993.
31. Moreno-Valenzuela O., Coello-Coello J., Loyola-Vargas V. M., Vazquez-Flota F., (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 1017-1021.
32. Chmiel A., (1974), *Postępy Mikrobiologii*, 2 (13), 21-39.
33. Yu S., Mahagamasekera M. G. P., Williams G. R. C., Kanokwaree K., Doran P., (1997), Ed. Doran P. M., *Hairy roots. Culture and applications*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 139-150.
34. Kim Y., Hopper E., Hjortso M., (1995), *Biotechnol. Prog.*, 11, 178-186.
35. Ninomiya K., Tsushima Y., Kino-Oka M., Taya M., (2003), *J. Biosci. Bioeng.*, 96 (1), 98-101.
36. Wyslouzil B. E., Waterbury R. G., Weathers P. J., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 70 (2), 143-146.
37. Kino-Oka M., Nagatome H., Taya M., (2001), *Adv. Biochem. Eng. Biot.*, 72, 186-220.
38. Hjortso M. A., (1997), Ed. Doran P. M., *Hairy roots. culture and applications*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 169-178.
39. Rrijhwani S. K., Ho C.-H., Shanks J. V., (1999), *Metab. Eng.*, 1, 12-25.
40. Buitelaar R. M., Langenhoff A. A. M., Heidstra R., Tramper J., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13 (6), 487-494.
41. Kevers C., Jacques Ph., Thonart Ph., Gaspar Th., (1999), *Plant Growth Regul.*, 27, 173-178.
42. Hilton M. G., Rhodes J. C., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 132-138.
43. Tescione L. D., Ramakrishnan D., Curtis W. R., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 207-213.
44. Krombholz R., Mersinger R., Kreis W., Reinhard E., (1992), *Planta Med.*, 58, 330-333.
45. Yoshikawa T., Asada Y., Furuya T., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (39), 460-464.
46. Williams G. R. C., Doran P. M., (2000), *Biotechnol. Prog.*, 16, (12), 391-401.