

# Kinetyka wzrostu kultur komórkowych *Gentiana cruciata* L. i *Gentiana tibetica* King oraz produkcja gencjopikrozydu

Dorota Kamińska<sup>1</sup>

Maria Wesotowska<sup>1</sup>

Paweł Króliczak<sup>2</sup>

Lutostawa Skrzypczak<sup>1</sup>

Włodzimierz Grajek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej  
Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego  
Poznań

<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego  
Poznań

## 1. Wstęp

Potencjalnym źródłem wtórnych metabolitów są kultury komórkowe. Tą drogą wyodrębniono dotąd wiele związków naturalnych z grup chemicznych: fenylopropanoidów, alkaloidów, terpenów i chinonów (1-3). Niektóre z nich są otrzymywane w skali przemysłowej, w większości przez firmy japońskie (4). Kultury komórkowe roślin zostały wykorzystane również w biotransformacji egzogennych związków, często o znaczeniu fitoterapeutycznym (5,6). Korzenie gatunków rodzaju *Gentiana* L. są surowcami leczniczymi wymienionymi w wielu farmakopeach świata (7). Aktywność biologiczną wykazują glikozydy sekoirydoidowe o gorzkim smaku. Głównymi związkami tej grupy chemicznej są amarogentyna i gencjopikrozyd — glikozyd najczęściej spotykany w roślinach rodziny *Gentianaceae* (8). Kulturami *in vitro* gatunków rodzaju *Gentiana* zajmowano się w kilku ośrodkach naukowych (9-15). Poza mikrorozmnażaniem regenerację roślin otrzymano również drogą embriogenezy (16-20) oraz w wyniku kultur *in vitro* protoplastów (21). Przy użyciu *Agrobacterium rhizogenes* uzyskano transformowane korzenie włośnikowate *Gentiana lutea* L. (22) i *G. punctata* L. (23), w których analizowano zawartości sekoirydoidów i pochodnych  $\gamma$ -pironu. W naszych wstępnych badaniach, pozytywne wyniki hodowli zawiesinowych *G. cruciata* i *G. tibetica* (24,25) były podstawą podjęcia badań nad kinetyką wzrostu zawiesin, szczególnie w skali bioreaktora, z równoczesną kontrolą zdolności produkcji gencjopikrozydu.



## 2. Materiał i metody

### 2.1. Materiał roślinny i warunki hodowli

Do założenia kultur zawieszinowych wykorzystano tkanki kalusowe otrzymane *in vitro* z nasion przechowywanych w lodówce w temp. 4°C. Umieszczone w wodzie, przez 24 godz. w temp. 25°C w ciemności, ulegały spęcznieniu. Następnie wyjaławiano je 70% etanolem (30 s) i 20% handlowym preparatem Clorox przez 10 minut. Nasiona płukano kilkakrotnie jałową wodą destylowaną i wykładano na pożywki agarowe Murashige i Skooga (MS; 26) z dodatkiem kwasu giberelinowego (GA<sub>3</sub>; 0,5 mg/dm<sup>3</sup>) i kinetyny (kin; 0,25 mg/dm<sup>3</sup>).

W zakładaniu kultur zawieszinowych wykorzystywano tkankę kalusową o luźnej strukturze, wykazującą zdolność przyrostu na pożywce MS z kin 0,5 mg/dm<sup>3</sup> i kwasem  $\alpha$ -naftylooctowym (NAA) 0,25 mg/dm<sup>3</sup>. Rozdrobnioną tkankę umieszczano w kolbach z jałową, płynną pożywką MS uzupełnioną kwasem dichlorofenoksyoctowym (2,4-D; 0,5 mg/dm<sup>3</sup>) i kinetyną (1 mg/dm<sup>3</sup>) lub benzyloadeniną (BA; 1 mg/dm<sup>3</sup>). Do 50 cm<sup>3</sup> pożywki przekładano 9-13 g świeżej tkanki kalusowej (0,3-0,4 suchej masy). Kolby umieszczano na wstrząsarce (150-160 obr/min) w pokoju hodowlanym o temp. 28°C  $\pm$  1°C przy oświetleniu o natężeniu 60  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s przez 16 godz. na dobę. Zawiesinę pasażowano co 2-4 tygodnie przez rozcieńczanie świeżą pożywką w proporcji 1:1. Tak otrzymany materiał wykorzystywano jako inoculum w kulturach prowadzonych w bioreaktorze (Bioflo III, firmy New Brunswick Sci. USA) o pojemności 5 dm<sup>3</sup>. Do tego urządzenia wprowadzono 3 dm<sup>3</sup> sterylnej pożywki MS i dodawano 1 dm<sup>3</sup> inoculum. Hodowlę prowadzono w stałych warunkach: temp. 28°C  $\pm$  1°C, napowietrzanie z szybkością 0,5-1,0 dm<sup>3</sup> i intensywności mieszania 100 obrotów na minutę, wartość pH = 5,6.

### 2.2. Metody analityczne

Cykl kultur w kolbach i bioreaktorze, dla których wyznaczono kinetykę wzrostu, trwał 21 dni przy pobieraniu prób co trzeci dzień. Oznaczenia suchej masy, liczby pojedynczych komórek i agregatów wykonano w dwóch lub pięciu seriach i trzech powtórzeniach.

#### 2.2.1. Oznaczenie suchej masy, liczby komórek i agregatów

Suchą masę oznaczono z pobierania 4,5 cm<sup>3</sup> zawiesiny komórek. Próby wirowano trzy razy po 15 min przy 12 tys. obr/min (wirówka MPW-211). Po każdym wirowaniu zbierano płyn znad osadu. Zawiesinę przemywano wodą destylowaną w celu usunięcia pożywki. Osad komórek przenoszono do naczyń wagowych o stałej masie i suszono w temp. 60°C, a następnie do stałej wagi w temp. 105°C. Stężenie biomasy komórek wyrażano w gsm/dm<sup>3</sup> pożywki. Liczbę komórek i agregatów oznaczano pobierając 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny



i rozcieńczano wodą destylowaną 6-, 10-, lub 20-krotnie w miarę zwiększania gęstości zawiesiny. Na płytce Petriego rozlewano równomiernie  $5 \text{ cm}^3$  zawiesiny i prowadzono obserwacje w mikroskopie odwróconym (firmy Nikon) przy 100-krotnym powiększeniu. Sumę komórek i agregatów określono z 10 wybranych pól widzenia.

### 2.2.2. Oznaczenie zawartości gencjopikrozydu

Do ilościowego oznaczenia związku pobierano masę komórek w 6, 12, 18 i 21 dniu kultury zawiesinowej. Próby suszono w temp.  $4^\circ\text{C}$ , a następnie w temperaturze pokojowej. Wyszuszony materiał ważono i rozcierano w moździerzu. Ekstrakcje prowadzono w kolbie okrągłodennej ( $250 \text{ cm}^3$ ), do której wprowadzono 1 g biomasy i  $50 \text{ cm}^3$  metanolu i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną na łaźni wodnej w temp.  $40^\circ\text{C}$  przez 1 godz. Ekstrakt zlewano znad osadu i sączono. Czynności te powtarzano 4-krotnie. Połączone ekstrakty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do suchej pozostałości, którą rozpuszczano w  $10 \text{ cm}^3$  wody destylowanej i dodano  $10 \text{ cm}^3$  chloroformu. Mieszanicę wytrząsano trzykrotnie w rozdzielaczu, zbierając frakcje wodne, łączono je i zagęszczano.

W pożywce zawartość gencjopikrozydu oznaczano bezpośrednio co trzy dni od inokulacji, do 21 dnia kultury. Do momentu oznaczenia płyny przechowywano w temp.  $-70^\circ\text{C}$ .

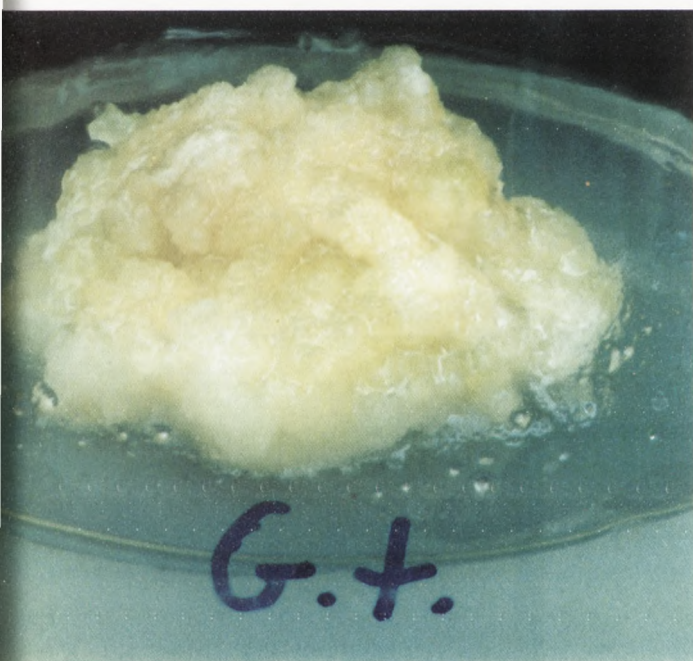
Zawartość związku oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w aparacie firmy Hewlett-Packard 1050 wg metody zastosowanej przez autorów japońskich (27). Badane próby sączono (Millipore  $0,22 \mu\text{m}$ ) i nanoszono na kolumnę w ilościach  $20 \mu\text{l}$  — ekstraktu metanolowego biomasy i  $200 \mu\text{l}$  — płynu pochodowlanego. Stosowano wzorzec gencjopikrozydu (firmy Roth).

## 3. Wyniki, dyskusja i wnioski

Drogą mikrorozmnażania uzyskaliśmy zregenerowane rośliny *Gentiana tibetica* i *G. cruciata*, które od kilku lat są hodowane w gruncie (fot. 1 i 2). Do założenia kultur komórkowych wykorzystano tkanki kalusowe wyprowadzone ze sterylnych siewek na pożywce MS z dodatkiem 2,4-D ( $0,25 \text{ mg}/\text{dm}^3$ ) i BA ( $1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ ). Najlepszy przyrost tkanki kalusowej otrzymano na pożywce MS uzupełnianej kin ( $0,5 \text{ mg}/\text{dm}^3$ ) i NAA ( $0,25 \text{ mg}/\text{dm}^3$ ) (fot. 3). Świeżo ustabilizowane kultury, przeniesione na płynną pożywkę MS z 2,4-D i BA, były zaczątkiem kultur zawiesinowych. W przypadku *G. tibetica* już po 3 dniach hodowli na ścianach kolb pojawiły się tzw. „kołnierze” — skupiska agregatów komórkowych (fot. 4). Ustalone zawiesiny były wykorzystywane do założenia kultur komórkowych w bioreaktorze (fot. 5).

**Kinetykę wzrostu** kultur zawiesinowych przedstawiono w postaci pomiaru stężenia komórek wyrażonego jako zawartość suchej masy w jednostce objętości pożywki. Obserwacje prowadzono dla kultur w kolbach i bioreakto-



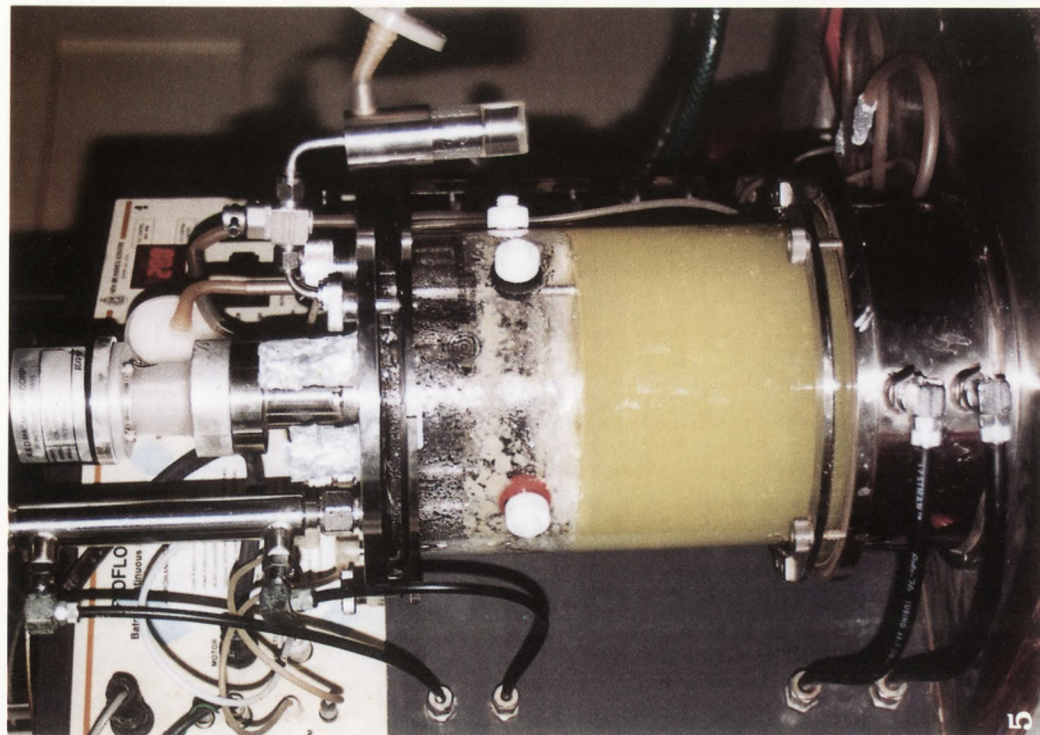


Fot. 1-3 *Gentiana tibetica* [1],  
*Gentiana cruciata* [2],  
tkanka kalusowa *G. tibetica* [3]  
na pożywce MS + kin. (0,5 mg/dm<sup>3</sup>)  
+ NAA (0,25 mg/dm<sup>3</sup>)



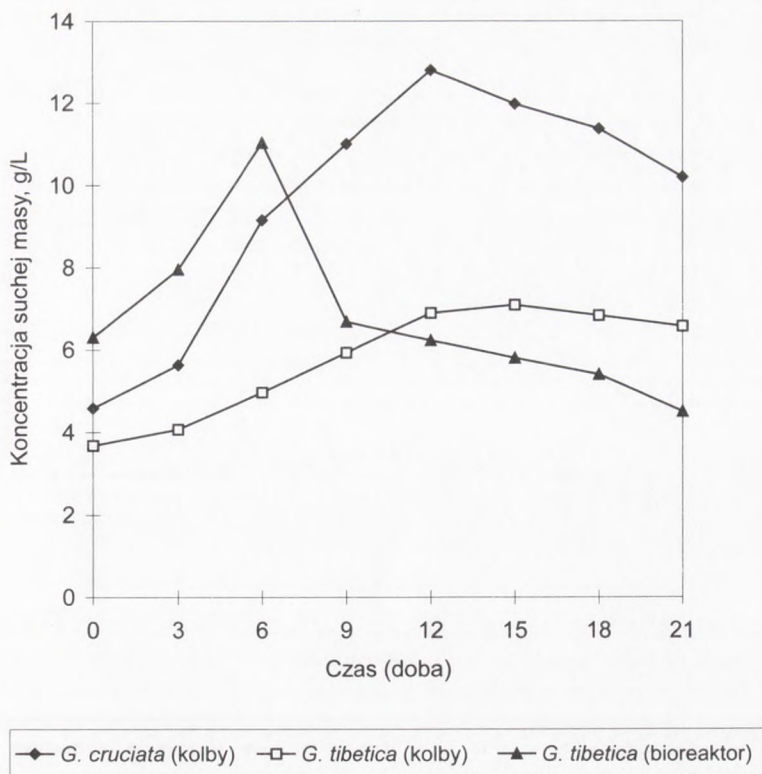


4



5

Fot. 4-5. *Gentiana tibetica* w kulturach zawieszonych [4,5].



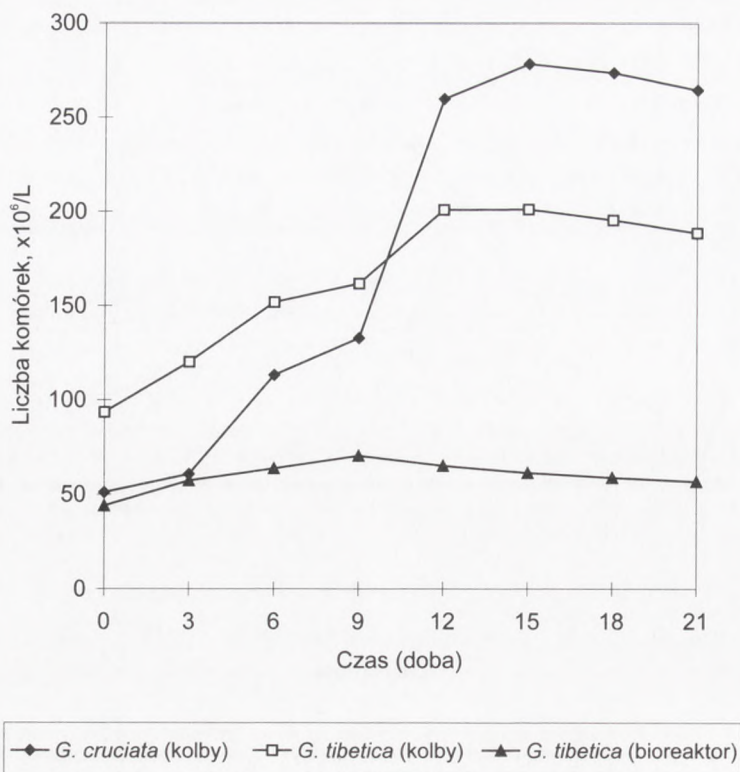
Rys. 1. Zmiany ilości suchej masy podczas wzrostu *G. cruciata* i *G. tibetica* w kolbach i w bioreaktorze.

rze (rys. 1). Największe stężenie biomasy oznaczono w 12 dobie kultury prowadzonej w kolbach dla *G. cruciata* i wynosiło  $12,4 \text{ g sm/dm}^3$ . Taki przyrost biomasy w cyklu 21-dniowym był trzykrotnie wyższy od gęstości komórek w dniu inokulacji. Podobnie w tym samym czasie, po 12-15 dniach, obserwowano przyrost masy kultury *G. tibetica*, lecz wartości były znacznie niższe i wynosiły średnio  $6,93 \text{ g sm/dm}^3$ .

W kulturach w bioreaktorze już od 3 dnia hodowli obserwowano wzrost masy komórek (28), która osiągnęła najwyższą wartość w 6 dniu kultury, po czym raptownie malała (rys. 1). O podobnych obserwacjach informowano w dalszych doświadczeniach (29).

W toku badań, obok przyrostu biomasy, określano również **stężenia poszczególnych form morfologicznych — komórek i agregatów**. Wzrost liczby komórek obserwowano między 9-12 dniem cyklu hodowlanego (rys. 2). Największy wzrost zanotowano dla *G. cruciata*, mniejszy dla *G. tibetica*, szczególnie w kulturze prowadzonej w bioreaktorze. W dalszych badaniach *G. tibetica* w bioreaktorze wykazano wzrost liczby komórek również od 9 dnia





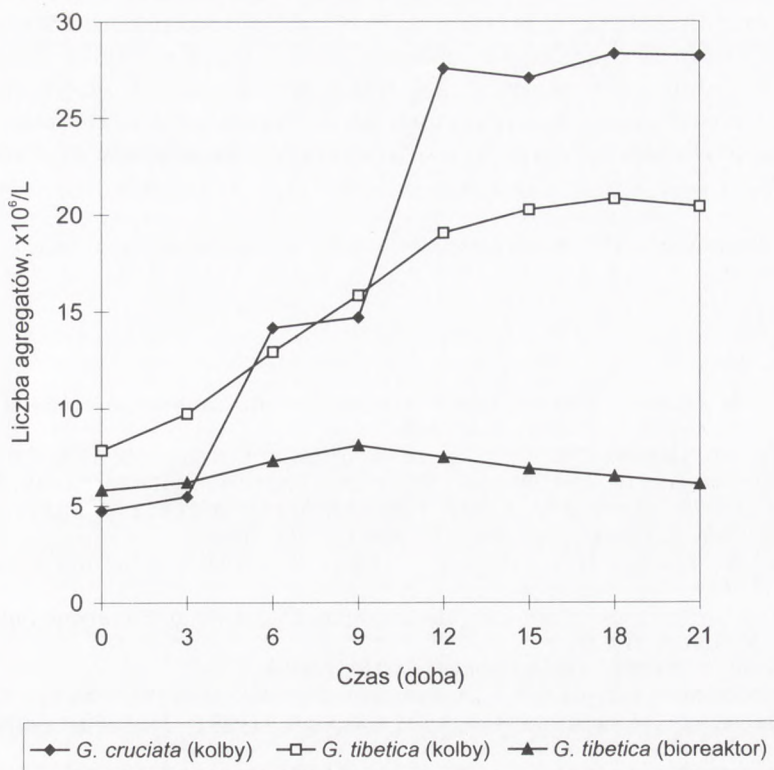
Rys. 2. Zmiany liczebności pojedynczych komórek w kulturach zawiesinowych *G. cruciata* i *G. tibetica* w kolbach i w bioreaktorze.

procesu. Podobny przebieg przyrostu notowano w odniesieniu do liczby agregatów komórkowych (rys. 3).

**Zawartość gencjopikrozydu** oznaczono w kulturach zawiesinowych *G. tibetica* w dwóch seriach. W biomacie obecność związku stwierdzono do 12 dnia kultury. Następnie w dalszych próbach występował jedynie w śladowych ilościach. Na podstawie wyników oznaczenia związków w płynie hodowlanym można wnioskować, że gencjopikrozyd jest uwalniany do pożywki. Od 6 dnia kultury zawartość związku ulegała stopniowemu zwiększaniu, osiągając w 21 dniu wartość 20841,94  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  (tab. 1).

O kulturach zawiesinowych gatunków rodzaju *Gentiana* L. brak dotąd informacji literaturowych.

Charakterystyka kinetyki wzrostu biomasy wyrażona w pomiarach masy komórkowej, określenie stężenia poszczególnych form morfologicznych w pożywce oraz stwierdzenie obecności **gencjopikrozydu**, zachęcają do prowadzenia dalszych obszernych badań, przede wszystkim z uwzględnieniem kultury w bioreaktorze. Na przykładzie *G. tibetica* wykazano, że aktywny biolo-



Rys. 3. Zmiany liczebności agregatów w kulturach zawieszinowych *G. cruciata* i *G. tibetica* w kolbach i w bioreaktorze.

TABELA 1  
ZAWARTOŚĆ GENCJOPIKROZYDU W KULTURZE KOMÓRKOWEJ *Gentiana tibetica* King

Dzień hodowli	Zawartość w biomase $\mu\text{g/g}$	Zawartość w pożywce $\mu\text{g/dm}^3$
0	—	39,65
3	—	481,46
6	200,42	380,05
9	—	492,53
12	115,43	302,44
15	—	1 726,16
18	śląd	5 314,47
21	śląd	20 841,94

gicznie związek, jest wydalany do pożywki, co można uważać za obiecujący wskaźnik w przypuszczalnym jego otrzymaniu. Stwierdzone miligramowe ilości gencjopikrozydu w warunkach prowadzonych badań, daleko odbiegają



od ilości innych związków otrzymywanych w kulturach komórkowych roślin (1,2,5). Istotnym elementem biotechnologii roślin jest nie tylko poszukiwanie nowych związków naturalnych, ale wskazywanie źródeł pozyskiwania, już znanych, substancji o właściwościach farmakologicznych. Badania nad kulturą komórkową *G. tibetica* w bioreaktorze są przedmiotem dalszych doświadczeń.

Autorzy dziękują za wykonanie fragmentów badań doświadczalnych mgr. mgr. R. Naumienko i J. Kowalskiemu.

## Literatura

1. Stöckigt J., Obitz P., Falkenhagen H., Lutterbach R., Endress S., (1995), *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 43, 97-109.
2. Scragg A. H., (1995), *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 43, 163-170.
3. Oksman-Caldentey K. M., Hiltunen R., (1996), *Field Crops Research*, 45, 57-69.
4. Alfermann A. W., Peterson M., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 199-205.
5. Kafar R., Aeri V., Datta A., (1992), *Fitoterapia*, 63, 33-43.
6. Pras N., Woerdenbag H. J., Uden W., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 117-121.
7. Penso G., (1983), *Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum*, OEMF, Milano, 436-437.
8. Skrzypczak L., (1992), *Biotechnologia*, 4(19), 50-59.
9. Wesołowska M., Skrzypczak L., Dudzińska R., (1985), *Acta Pol. Pharm.*, 42, 79-83.
10. Lamproye A., Crevecoeur M., Kevers C., Gaspar T., (1987), *Med. Fac. Landbuowo Rij-kuniv. Gent.*, 52, 1255-1257.
11. Semeniuk P., Griesbach R. J., (1987), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8, 249-253.
12. Viola U., Franz C., (1989), 37<sup>th</sup> Annu. Congr. on Med. Plant Research, Braunschweig, Abstracts, 115.
13. Skrzypczak-Pietraszek E., Skrzypczak L., Wesołowska M., (1993), *Sci. Pharm.*, 61, 287-296.
14. Skrzypczak L., Wesołowska M., Skrzypczak E., (1993), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, in: *Medicinal and Aromatic Plants IV*, Ed. Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, vol. 21, 172-186.
15. Kovalchuk L., Strashnyuk N., Trofimyak T., Blume Y., (1996), 44<sup>th</sup> Ann. Congr. of the Society for Med. Plant Res. and J. Meat. with the Czech Biotechnol. Society, Abstracts, Praga, 92.
16. Sharma N., Chandel K. P. S., Paul A., (1993), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34, 307-309.
17. Mikuła A., Rybczyński J. J., (1994), VI Ogólnopolska konferencja „Kultury *in vitro*”, Katowice-Ustroń.
18. Mikuła A., Rybczyński J. J., (1996), Konferencja naukowa „Aktualne kierunki w biochemii i biotechnologii”, Łódź, 161-163.
19. Mikuła A., Wesołowska M., Kapusta J., Skrzypczak L., Rybczyński J. J., (1996), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 65, 47-51.
20. Wesołowska M., Kapusta J., Skrzypczak L., (1994), 8<sup>th</sup> Inter. Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Florentia, Abstr. 176.
21. Takahata Y., Jomori H., Miyano S., Kunitake H., Mii M., (1995), *Regeneration of plants from protoplasts of Gentiana species (Gentian)*, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, in: *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VI*, Ed. Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, vol. 34, 55-62.
22. Menkovic N. R., Savikin-Fodulovic K. P., Grubisic D. V., Momcilovic I., (1996), 44<sup>th</sup> Ann. Congr. of the Society for Med. Plant Res. and J. Meat. with the Czech Biotechnol. Society, Praga, Abstr. 92-93.

23. Menkovic N. R., Savikin-Fodulovic K. P., Vinterhalter B. S., Grubisic D. V., Vinterhalter D. V., (1996), 44<sup>th</sup> Ann. Congr. of the Society for Med. Plant Res. and J. Met. with the Czech Biotechnol. Society, Praga, Abstr. 93.
24. Kamińska D., Wesołowska M., Króliczak P., Miłucha A., (1996), 44<sup>th</sup> Ann. Congr. of the Society for Med. Plant Res. and J. Meet. with the Czech Biotechnol. Society, Praga, Abstr. 93-94.
25. Kamińska D., Wesołowska M., Króliczak P., (1996), Konferencja naukowa, „Aktualne kierunki w biochemii i biotechnologii”, Łódź, 179-181.
26. Murashige T., Skooga F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473.
27. Yamada Y., Shoyam Y., Nishioka I., Kohda H., Namera A., Okamoto T., (1991), *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 204-206.
28. Naumienko R., (1996), „Kultury zawieszinowe gatunków z *Gentianaceae*”, praca magisterska, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, AM, Poznań.
29. Kowalski J., (1997), „Kinetyka wzrostu i produkcja gencjopikrozydu kultur zawieszinowych *Gentiana tibetica* King w bioreaktorze”, praca magisterska, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, AR, Poznań.

### Growth kinetics of cell cultures of *Gentiana cruciata* L., *Gentiana tibetica* King and gentiopicroside production

#### Summary

Suspension cells cultures were cultivated in flasks and bioreactor. The kinetics — growth rate and tissue morphology were presented. The quantitative amount of gentiopicroside, which appeared in the medium, was determined by the HPLC method.

#### Key words:

gentiopicroside, *Gentiana cruciata* L., *G. tibetica* King, suspension cultures, growth kinetics, bioreactor.

#### Adres do korespondencji:

Maria Wesołowska, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, ul. Św. Marii Magdaleny 14, 61-861 Poznań.