

Praca dyplomowa inżynierska

Badania wpływu warunków mieszania typu *wave* na hodowane węgłnie komórki *Nicotiana tabacum* linii BY-2



Autor: Maria Bobrova

Nr albumu: 308240

Promotor: dr hab. inż. Maciej Pilarek, prof. uczelni

Opiekun pomocniczy: dr inż. Kamil Wierzchowski

Rok akademicki: 2023/2024

Wprowadzenie

Komórki *Nicotiana tabacum* linii BY-2 hodowane w warunkach *in vitro* znajdują coraz szersze zastosowanie w branży przemysłowej, w tym biofarmaceutycznej oraz w badaniach naukowych z zakresu hodowli *in vitro* komórek roślinnych. Znajomość genomu komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2 pozwala na ich zastosowanie w produkcji roślinnych metabolitów i enzymów, a białka, zawarte w komórkach tytoniu szlachetnego są niezbędne do produkcji leków i szczepionek. W części doświadczalnej pracy komórki *Nicotiana tabacum* pełnią rolę modelowej biomasy roślinnej do badań wpływu prototypowych naczyń hodowlanych na morfologię oraz proliferację biomasy roślinnej w warunkach mieszania typu *wave*.

Cel i zakres pracy

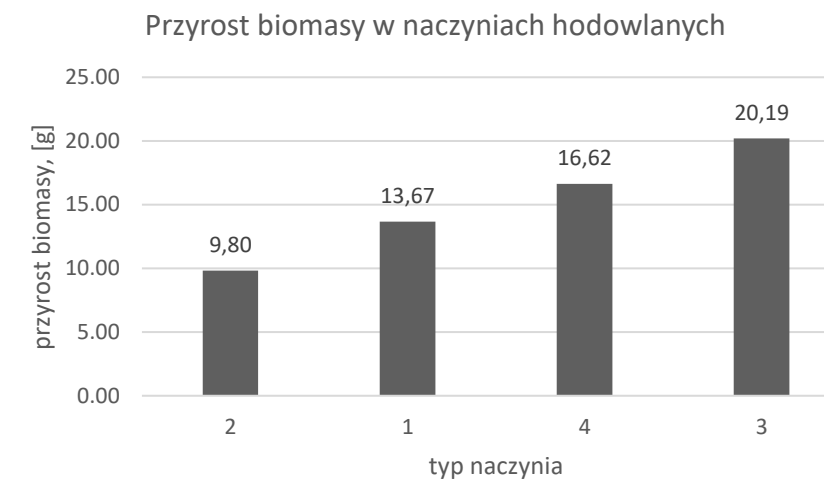
Celem pracy było zbadanie wpływu jednorazowych naczyń hodowlanych wykonanych z biodegradowalnego polimeru za pomocą technologii druku 3D na proliferację komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2 hodowanych w warunkach *in vitro* i poddawanych ciągłym oscylacyjnym wychyleniom. W ramach pracy również podjęto próbę adaptacji komercyjnie dostępnych testów enzymatycznych PrestoBlue™ oraz LDH do określania aktywności metabolicznej oraz aktywności dehydrogenazy mleczanowej w hodowlach biomasy roślinnej;

Część literaturowa

W części literaturowej przedstawiono techniki i sposoby hodowli komórek roślinnych w warunkach *in vitro* z zastosowaniem konwencjonalnej aparatury oraz omówiono rozwiązania komercyjne bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave*.

Część doświadczalna

Część doświadczalna pracy dotyczyła określenia wpływu geometrii naczynia hodowlanego na proliferację biomasy komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2. W tym celu oprócz metody grawimetrycznej pomiaru przyrostu mokrej biomasy, podjęto próbę zaadaptowania dwóch testów enzymatycznych wykorzystywanych w hodowlach *in vitro* biomasy komórek zwierzęcych: testu PrestoBlue™ stosowanego do oznaczania aktywności mitochondrialnych i obecnych w cytozolu dehydrogenaz, oraz testu LDH stosowanego do oznaczania aktywności dehydrogenazy mleczanowej uwalnianej z uszkodzonych komórek.



Rys.1. Wyniki pomiaru przyrostu biomasy w naczyniach o różnej geometrii

Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że kształt prototypowych naczyń hodowlanych znacząco wpłynął na efekt proliferacji hodowanej w nich biomasy roślinnej:

- kształt dna naczynia hodowlanego znacząco wpływa na proliferację komórek *N. tabacum* linii BY-2, przy czym modyfikacja dna naczynia hodowlanego kształtkami wpływa intensyfikująco na przyrost biomasy zawiesiny komórek roślinnych i pomaga namnożyć średnio ok. 1,5 razy więcej komórek niż w przypadku naczyń z dnem niemodyfikowanym kształtkami.
- za pomocą testu PrestoBlue™ można oznaczyć aktywność metaboliczną komórek *N. tabacum* linii BY-2;
- inkubacja zawiesiny komórek tytoniu szlachetnego linii BY-2 z testem PrestoBlue™ powinna trwać minimum 30 minut a wyznaczenie rozcieńczenia zawiesiny komórek wymaga dalszych badań;
- oznaczenie aktywności LDH w zawieszynie komórek linii BY-2 nie jest możliwe z powodu zbyt niskiego poziomu LDH w komórkach roślinnych.