

新型气升式反应器中浸没/非浸没周期 对水母雪莲细胞培养的影响

袁晓凡, 陈书安, 赵兵, 王玉春, 刘德明

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:应用新型周期浸没气升式反应器,进行了水母雪莲细胞的浸没悬浮和非浸没静置交替循环培养,研究了培养过程中的关键条件——浸没/非浸没周期对水母雪莲细胞生长、黄酮合成及细胞聚集体调控的影响,发现5 min/4 h为最佳的循环周期.在此循环周期下,当通气量为40 L/h、接种量(干重DW)为2~3 g/L时,经20 d的培养,细胞聚集体分布最佳,细胞干重达9.6 g/L,黄酮类化合物的含量及黄酮类化合物的产量分别可达35.2 mg/g (DW)及338 mg/L.

关键词:气升式反应器;浸没/非浸没循环周期;水母雪莲;黄酮

中图分类号:Q813.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-606X(2003)04-0361-05

1 前言

设计适合于植物细胞培养的新型生物反应器是实现植物细胞大规模培养技术的一个关键.国内外开发研究了多种植物细胞大规模培养反应器,但能工业化生产的尚为数不多^[1,2].国内对新疆紫草细胞大规模培养已进行了反应器研究,由于是全浸没式培养,细胞长期浸泡使细胞生长和次生代谢产物合成能力受到抑制,导致紫草宁含量低,还不能用此类反应器进行工业化生产^[3].许多报道中描述了细胞聚集体的形成有利于次生代谢产物的合成,McCown等^[4]发现细胞聚集体大于2 mm则内部出现明显的细胞分化,次生代谢产物的合成能力显著提高.因此,在细胞培养过程中对细胞聚集体进行调控来提高次生代谢物含量是很重要的.针对细胞聚集体形态及特性与次生代谢产物间有密切联系的特点,我们研制了一种周期浸没自动翻转筛网式反应器,使固定化静置和浸没悬浮培养结合,以解决细胞堆积、堵塞以及长期浸没造成的细胞聚集体形态、特性无法调控导致有效次生代谢产物合成能力下降的问题.

本工作以我国传统名贵中草药水母雪莲为实验材料,研究了反应器培养过程中的关键条件——浸没悬浮与非浸没静置交替循环周期对细胞聚集体分布、生物量及黄酮合成的影响,为植物细胞大规模培养反应器的改进及细胞聚集体形态、特性的调控研究提供参考.

2 材料与amp;方法

2.1 实验材料

实验选用由本实验室筛选得到的水母雪莲(*Saussurea medusa*)细胞系.

2.2 培养方法及条件

反应器及摇瓶培养均采用Murashige和Skoog(MS)^[5]培养基,添加2 mg/L萘乙酸(NAA),0.2 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA),30 g/L蔗糖,在pH 5.8~5.9,(25±1)°C,2200 lx光照16 h/d下培养.摇

收稿日期:2003-01-09,修回日期:2003-03-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:20076047)

作者简介:袁晓凡(1972-),女,辽宁省沈阳市人,博士,助理研究员,生物化学专业.

瓶培养采用 150 ml 三角瓶, 内装 50 ml 培养液, 摇床转速为 100 r/min. 雪莲细胞在固体培养基(含 6.8 g/L 琼脂)上每隔 18 d 继代 1 次, 固体培养基上的细胞用于反应器及摇瓶培养的接种.

2.3 新型周期浸没气升式反应器系统及操作

2.3.1 装置及工艺流程

如图 1 所示, 实验装置主要包括玻璃反应器主体、储液罐、电磁阀、自动控制仪表及各种辅助设备. 反应器主体 1 由内径 10 cm、长 30 cm 的扩口玻璃管及上下法兰连接而成, 工作体积 1.8 L. 反应器中设有可自动翻转的两层不锈钢筛网 2, 筛网间的距离为 7 cm, 两层筛网靠不锈钢拉杆与上法兰上的电磁阀 6 相连以实现自动翻转. 培养液(1.8 L)装在储液罐 11 中灭菌, 培养液靠 2 个电磁阀 9 及与反应器主体连接的管子实现浸没/非浸没周期循环. 3 个电磁阀与时间继电器 17 相连, 控制整个体系的周期性操作. 在非浸没培养阶段, 电磁阀 6 和电磁阀(9 下)关闭, 电磁阀(9 上)打开, 培养液从反应器主体下到储液罐中, 细胞均匀停留在两层筛网和反应器底部[图 1(a)], 反应器内的通气由空气分布器供给; 在浸没培养阶段, 电磁阀 6 和电磁阀(9 下)打开, 电磁阀(9 上)关闭, 电磁阀 6 带动反应器内的不锈钢拉杆上下运动, 反应器内的两层筛网跟着自动翻转至与水平方向成约 50° , 从流量计(13 下)通过的空气将储液罐中的培养液压到反应器内, 细胞在反应器内循环悬浮运动. 整个反应器系统置于恒温培养室中, 以 40 W 日光灯进行定时光照.

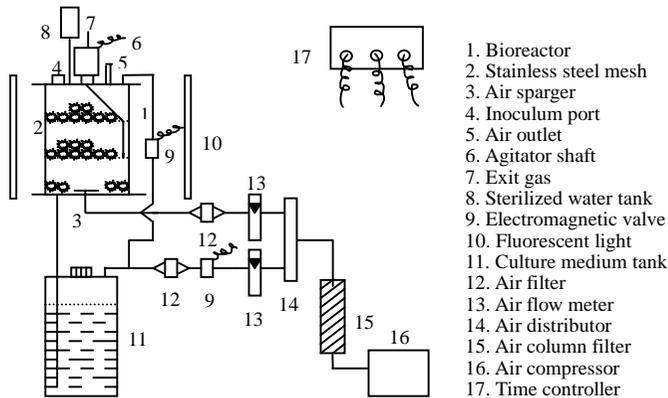


图 1(a) 非浸没静置培养时的反应器系统

Fig.1(a) The bioreactor system during the unsubmerged period

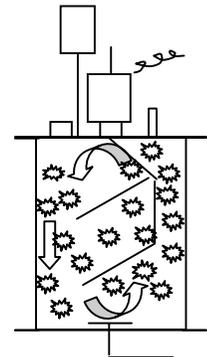


图 1(b) 反应器主体

Fig.1(b) The bioreactor

2.3.2 操作条件

培养基在储液罐中与反应器一起灭菌后, 在超净台中接种, 接种量干重(DW)为 2~3 g/L. 接种后的反应器系统放入培养间进行光照培养, 光照强度 2200 lx, 光照周期 16 h/d, 环境温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 反应器内的通气量为 40 L/h.

2.4 实验测定与分析方法

20 d 培养结束后, 从反应器中取出雪莲细胞, 用水洗净, 以滤纸吸净其表面水, 称得鲜重(FW); 60°C 烘干至恒重, 即干重. 培养过程中伴随碳源的利用, 培养基中大量的无机盐被消耗于细胞的生长, 因而通过电导率仪测量培养液中的离子浓度的变化可以反映细胞生物量的变化, 具体方法参考文献[6]. 培养液的 pH 用 Beckman 酸度计测定, 电导率采用 DDS-11A 型电导率仪测定. 黄酮含量的测定参见沙世炎等[7]的紫外分光光度法, 可溶性糖的测定采用蒽酮法[8], 铵根离子、硝酸根离子的测定分别参见文献[9, 10]. 细胞聚集体分布测定如下: 将细胞聚集体通过一系列不同尺寸的不锈钢筛子, 称量不同部分细胞聚集体干重. 所有图表中的实验数据均为 2 次实验的平均值.

3 结果与讨论

3.1 浸没/非浸没周期对培养结果的影响

实验过程中发现,与反应器内影响细胞生长及黄酮合成的其它控制条件如通气量、接种量相比,浸没/非浸没周期对细胞的影响更为显著.在接种量(DW)为 2~3 g/L、通气量为 40 L/h 时,分别采用不同的浸没/非浸没周期培养雪莲细胞.从表 1 可看出,循环周期对细胞的生长及黄酮的合成均影响很大,当浸没/非浸没周期为 5 min/4 h 时,细胞干重及黄酮产量达到最高,分别为 9.6 g/L 及 338 mg/L.此外,非浸没时间越短,黄酮含量越低.这是因为过频的循环运动造成细胞难以承受由储液灌向反应器上液结束后释放压力所产生的暂时的相对较高的剪切力,细胞聚集体较小,抑制了细胞的生长和次生代谢产物的合成.而当非浸没时间过长时,细胞得到的养份供给不足,细胞长时间的堆积使细胞聚集体体积大,聚集体中的细胞难以得到充足的营养,造成细胞长势下降.

不同浸没/非浸没周期时,培养结束时培养液的 pH、电导率及底物消耗各不相同.当非浸没时间为 4 h 时,培养液中的糖、 NH_4^+ 和 NO_3^- 的利用率最高,培养液的电导率最低,说明在该条件下,细胞长势最好,比生长速率最大.

表 1 20 d 时不同浸没/非浸没周期下的培养结果
Table 1 Culture results at different submerged/unsubmerged periods after 20 d

Submerged/unsubmerged period (min/h)	5/0.5	5/1	5/2	5/3	5/4	5/6	5/8
Cell dry weight (g/L)	8.1	8.5	8.7	9.1	9.6	9.2	8.8
Specific growth rate (d^{-1})	0.09	0.11	0.12	0.14	0.16	0.15	0.12
Flavonoids content (mg/g DW)	10.5	12.8	21.5	25.6	35.2	31.9	27.1
Flavonoids production (mg/L)	85	109	187	233	338	293	238
pH	4.82	4.89	5.06	5.26	5.28	5.20	4.72
Conductivity ($\times 10^3 \mu\text{S}/\text{cm}$)	5.12	4.88	4.70	4.52	4.30	4.34	4.74
Residual sugar (g/L)	15.8	15.0	12.9	10.0	8.2	8.8	12.1
NH_4^+ (mg/L)	136	129	123	116	106	115	121
NO_3^- (mg/L)	1267	1139	1054	735	685	718	788
PO_4^{3-} (mg/L)	51.1	44.1	37.8	28.8	14.8	16.3	29.7

3.2 浸没/非浸没周期对细胞聚集体分布的影响

实验采用的水母雪莲细胞系在较为温和的培养条件下非常容易聚集成大的团块.从固体培养基上接到反应器中的种子细胞聚集体大小在 5~15 mm 之间,它们在反应器内随着培养进程而发生显著变化,小尺度的聚集体逐渐增加,较大尺度的聚集体相应减少.而细胞聚集体大小与黄酮的合成密切相关,5~10 mm 的聚集体中黄酮含量较其它部分高.这是因为剪切力的作用使细胞聚集体分裂,引起细胞的低度裂解,使细胞的再生能力、膜完整性、酶活力降低^[11],不利于细胞生长和黄酮合成;而过大的聚集体表层细胞黄酮含量较高,而里层细胞的黄酮含量较低.由图 2 可见,非浸没培养时间越长,大尺度的细胞聚集体越多.浸没/非浸没周期为 5 min/4 h 时,细胞聚集体分布最佳,3~10 mm 的聚集体居多,此时的黄酮含量最高(表 2).

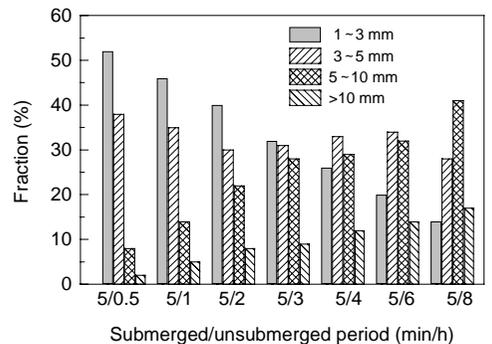


图 2 不同浸没/非浸没周期下的细胞聚集体分布
Fig.2 Size distribution of cell aggregates at different submerged/unsubmerged periods

表 2 20 d 时 5 min/4 h 周期下不同部分细胞聚集体的黄酮含量

Table 2 The flavonoids content of different parts of cell aggregates after 20 d culture at 5 min/4 h period

Aggregate size (mm)	1~3	3~5	5~10	>10
Flavonoids content (mg/g, DW)	29.6	36.7	47.2	40.1

3.3 细胞生长、黄酮合成、底物消耗动力学

选择浸没/非浸没周期为 5 min/4 h, 雪莲细胞在反应器中的生长及黄酮合成结果示于图 3, 4. 由图可知, 细胞在反应器中经过 7 d 左右的延迟期后, 第 8~16 d 进入对数生长期, 之后生长较为缓慢, 但仍在逐渐增长. 黄酮在细胞中的累积也是从第 8 d 左右开始, 与细胞的生长基本平行, 说明雪莲细胞内次代谢产物黄酮的合成属于生长偶联型, 这与邢建民等^[12]的研究结果是一致的. 反应器培养过程中, 黄酮在干细胞中的含量呈缓慢下降的趋势, 这可能是由于反应器内的气流量相对于细胞正常生长代谢的需氧量来说仍旧较高, 导致细胞表面吸收的培养液蒸发较快, 不利于细胞内养份的传输, 引起聚集体表面的细胞营养缺乏而褐化; 此外反应器内的气流量较高也会导致有利于细胞生长和代谢的气体如二氧化碳、乙烯的丧失.

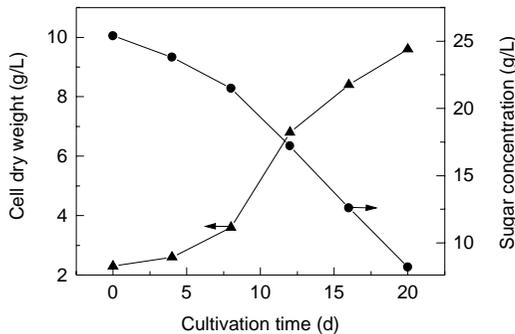


图 3 反应器中细胞的生长及总糖的利用

Fig.3 Time course of cell growth and residual sugar in bioreactor

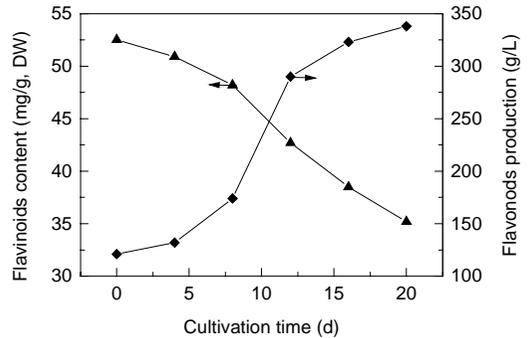


图 4 黄酮含量及黄酮产量随时间的变化

Fig.4 Time course of flavonoids content and production in bioreactor

从图 3 所示细胞对糖的利用可见, 经过 20 d 培养后, 反应器中的糖从 25.4 g/L 下降到 8.2 g/L, 剩余 32%; 邢建民等^[12]在 2 L 搅拌式反应器中进行的雪莲细胞的培养也有类似的结果. 细胞对氮源(NH_4^+ 和 NO_3^-)的利用与糖的利用有相似的规律(图 5). 雪莲细胞培养过程中, 培养液的 pH 先降后升, 而培养液的电导率则一直为下降的趋势(图 6), 这是因为培养液中各种离子被逐步利用掉.

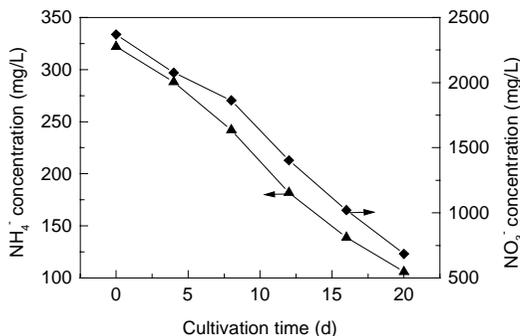
图 5 反应器中 NH_4^+ 和 NO_3^- 的利用

Fig.5 Residual ammonium and nitrate in bioreactor

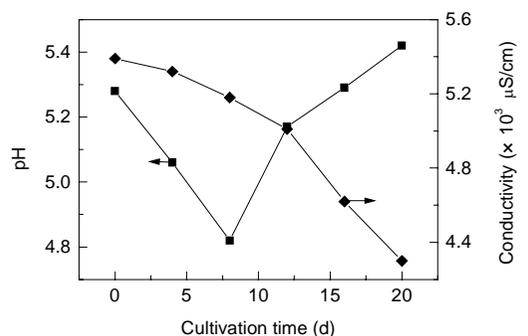


图 6 反应器中 pH、电导率随时间的变化

Fig.6 pH and conductivity changes in bioreactor

邢建民等^[12]的搅拌式反应器中, 雪莲细胞经 12 d 的培养, 生物量达到 10.4 g/L, 为摇瓶培养的 46%, 黄酮产量为 428 mg/L, 为摇瓶培养的 32%; 由于本文中使用的水母雪莲细胞系与邢建民等使用的雪莲细胞系不同, 细胞培养时间较长(20 d)且生物量(9.6 g/L)及黄酮产量(338 mg/L)较低, 但与此细胞系的摇瓶培养结果相比, 生物量为摇瓶培养(16.8 g/L)的 57%, 黄酮产量为摇瓶培养(1004 mg/L)的 34%, 说明本反应器的效果比搅拌式反应器稍好。这是因为气升式反应器内的剪切力比搅拌式反应器的小, 细胞受到剪切损伤较小, 长势良好; 加上反应器中浸没与非浸没培养交替循环, 且非浸没培养的时间较长, 因而细胞聚集体较大, 有利于黄酮的合成。进一步改进反应器的操作及雪莲细胞培养条件后, 细胞及黄酮产量有望再提高一些。

参考文献:

- [1] Noguchi M, Matsumoto T, Hirata Y, et al. Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1977. 85–94.
- [2] Ulrich B, Wiesner W, Arens H. Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures [M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1985. 293–303.
- [3] 董敬望, 叶和春, 吴新, 等. 新疆紫草细胞悬浮培养和发酵培养的研究 [J]. 植物学报, 1993, 35(1): 57–61.
- [4] McCown B, Zeldin E, Pinkalla H, et al. Genetic Manipulation of Woody Plants [M]. New York: Plenum Press, 1988. 149–166.
- [5] Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures [J]. Physiol. Plant, 1962, 15: 473–497.
- [6] 刘春朝, 王玉春, 叶和春, 等. 电导法在线测量青蒿毛状根的生长过程 [J]. 化工冶金, 1998, 19(1): 57–60.
- [7] 沙世炎. 中草药有效成分分析法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 232.
- [8] 薛应龙. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 136–138
- [9] Weatherburn M V. Phenol–Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia [J]. J. Anal. Chem., 1967, 39: 971–974.
- [10] 王令今, 张振宇. 分析化学 [M]. 北京: 北京化学工业出版社, 1988. 351–353.
- [11] Pradyumna K N, Eric H D. Shear Sensitivity of Plant Cells in Suspensions: Present and Future [J]. Appl. Biochem. Biotech., 1995, 54: 109–131.
- [12] 邢建民, 赵德修, 叶和春, 等. 水母雪莲细胞生物反应器悬浮培养 [J]. 植物学报, 2000, 42(1): 98–101.

Effect of Submerged/Unsubmerged Period on Cell Culture of *Saussurea medusa* in a Novel Air-lift Bioreactor

YUAN Xiao-fan, CHEN Shu-an, ZHAO Bing, WANG Yu-chun, LIU De-ming

(State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The alternant submerged/unsubmerged cell culture of *Saussurea medusa* in a novel 1.8 L periodically submerged air-lift bioreactor was investigated. The bioreactor contains two layers of meshes. They provide support for cells in unsubmerged culture, but when being pulled slant the culture can be released by circulating medium from the meshes for submerged culture. The effects of the submerged/unsubmerged period on cell growth, biosynthesis of flavonoids and cell aggregate were studied. It was found that 5 min/4 h was the optimum submerged/unsubmerged period when the culture was carried out at air flow rate of 40 L/h and an inoculum (DW) of 2~3 g/L. After 20 d culture, the maximum biomass and production of flavonoids reached 9.6 g/L and 338 mg/L respectively, and the distribution of cell aggregates was the optimal as well.

Key words: air-lift bioreactor; submerged/unsubmerged period; *Saussurea medusa*; flavonoids