

控制植物細胞培養反應器之氣相組成以促進二次代謝產物 L-DOPA 之產量

Enhancement of L-DOPA Production by Controlling the Gaseous Composition in Bioreactor for Plant Cell Culture

計畫編號：NSC88-2214-E-002-017

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：黃世佑 台灣大學化工系

一、中文摘要

植物細胞培養反應器中氣相組成關係細胞生長與二次代謝反應甚鉅。然而在培養過程，因促進氧氣傳送速率，常將重要之代謝氣體（ CO_2 及 C_2H_4 ）驅逐至反應器外，影響植物細胞生理，為有效保持這些重要氣體組成，本研究一方面使用壓克力罐，通以固定氣相組成之氣體，以維持三角錐形瓶中 P_{O_2} , P_{CO_2} 之定常狀態，俾探討不同氣相組成對 *Stizolobium hassjoo* 細胞生長及 L-DOPA 生成之影響，設計含氣相組成分析儀及氧氣濃度控制器，形成循環氣體反應器系統，以探討幾種代謝氣體對植物細胞培養之效應，瞭解 O_2 , CO_2 , C_2H_4 各氣體相互之影響及生產 L-DOPA 之最佳條件。

關鍵詞：植物細胞培養，氣相組成控制，細胞生長，二次代謝產物生產

Abstract

Gaseous composition of a reactor for plant cell culture is an essential factor for cell growth and secondary metabolite production. Forced aeration for enhancing oxygen transfer causes the expel of important gaseous metabolites (CO_2 and C_2H_4). This results in worse plant cell physiology. In order to maintain a constant gaseous composition in shake flask, an acrylic pot which accomodates a shake flask was devised. This will facilitate the constant gaseous composition in the

flask. The gas stream of constant gaseous composition was flushed through the pot and diffused through the closure of flask, thus maintaining the constant gaseous partial pressure in the flask. This kind of configuration favored the investigation on the effect of gaseous composition on the growth of *S. hassjoo* cells and L-DOPA production. For controlling the P_{O_2} and P_{CO_2} in a bioreactor system, a gaseous composition controller consisted a gas analyzer connecting to a gaseous composition controller. The controller controlled the gaseous P_{O_2} in a circulating gas stream. With this circulating gas system, P_{O_2} and P_{CO_2} can be maintained at a constant level. The interactions among the gases and their effects on the cell growth and L-DOPA production were investigated.

Key words: plant cell culture, control of gaseous composition, cell growth, secondary metabolite production

二、緣由與目的

以植物細胞培養生產高價二次代謝產物時，在擴大規模到生物反應器時，常遭遇到產率驟降之困難，其主要原因為在通氣操作下，將反應器當中之重要代謝氣體沖洗出[1-3]。為瞭解氣相組成如何影響植物細胞培養之效率，本研究乃設計能保持培養系（三角錐形瓶及圓底 spinner flask）代謝氣體（ O_2 , CO_2 及 C_2H_4 ）

之控制系統，以利探討 *S. hassjoo* 細胞之生長及 L-DOPA 生產之最佳條件。

三、研究方法及成果

研究方法

3.1 生物反應器

250ml Erlenmeyer flask，加以 70ml 之 Murashige-Skoog 培養基，培養基之調配按 Huang 等之報告[4]。2L 圓底 spinner flask 操作體積 1L，28°C，70rpm。

3.2 三角錐形瓶氣相組成控制

製造一 12.6cm 直徑×22.5cm 高之可通氣密閉壓力罐，可容納三角錐形瓶，並固定於振盪培養器上旋轉，將一定組成之氣體（如 $P_{O_2}=21, 30, 40, 50\%$ 等）。由壓力罐通入氣體，經由錐形瓶封口蓋而由出口流出罐外。在選定良好之封口蓋之下，三角錐形瓶內之氣相組成將不受通氣條件之影響，而維持恆定值。

3.3 具循環氣體設備生物反應器氣相組成之控制

如 Fig.1 所示，生物反應器排氣口接至氣體分析儀 (Model Ex-1562-1, Exhaust Oxygen/Carbon Dioxide Meter, Able Co.) 此分析儀連至氧氣濃度控制器 (Model DPC-2, Albe Co.)，控制器可啟動二個電磁閥，一補充新鮮氣體 ($O_2+CO_2+N_2$) (以 S_2 閥)，另一用以洩逸由代謝氣體之產生而離開控制點組成之氣體 (S_1)。Daglas bag 用以緩衝循環氣流所產生之氣壓，氣體控制器除可控制 P_{O_2} 外，亦可用鹼液吸收由細胞代謝所產生 CO_2 以維持穩定的氣相 CO_2 濃度。

3.4 分析方法

細胞乾、濕重，代謝產物 (L-DOPA, L-tyrosine, total sugar 等) 均按前法[4]。反應器中氣相氧濃度用 oxygen monitor (Model 7003D, Beckman Industrial Corp., Fullerton, CA)，氣相 CO_2 濃度用 Infra-red gas analyzer (Model 880A, Rosemount Analytical Inc., La Habra, CA)， C_2H_4 氣體用 GC (1/16"×8'管柱，

FID)。

四、結果與討論

4.1 氣相氧氣濃度對植物細胞培養的影響

Fig.2(a)-2(c) 示各種不同壓力罐氧氣分壓 P_{O_2} (air, 30%, 40%) 下之 *S. hassjoo* 細胞培養情形，三角錐形瓶中之 P_{O_2} 在 8 天培養過程均保持恆定，培養液中溶氧在培養中期有些微下降，Fig. 2(b) 及 2(c) 示在高 P_{O_2} 下，阻抑細胞生長並使 pH 下降些許，對於培養初期， P_{O_2} 之增加並不影響 L-DOPA 之生成，然而 P_{O_2} 在 0.30 atm 下，在 4 天培養後 L-DOPA 急速增加。Fig. 3 示在 8 天培養期間錐形瓶中氣相 CO_2 及 C_2H_4 之變化。兩種氣體均與細胞生長有密切關係，在對數生長期達最高值之後即下降， C_2H_4 在高 P_{O_2} 下，在培養後期會增加。高 P_{O_2} 下，兩種代謝氣體延遲達最高值，顯示細胞生長受到阻抑。由此結果顯示，增加 P_{O_2} 宜在培養對數生長期中期開始。

4.2 乙烯與二氧化碳之影響

Fig. 4 示 P_{CO_2} (2%, 5%) 與 $P_{C_2H_4}$ (0.3 ppm) 之下，細胞培養所得結果 (第六天數據)，0.3 ppm 之乙烯會阻抑細胞生長，而 3%, 5% 之 CO_2 促進細胞生長、L-DOPA 生產及 FW/DW。由此可知 0.3 ppm 之 C_2H_4 對細胞生長過高，5% 以下之 CO_2 會促成 L-DOPA 之生產[5]。

4.3 以具氣體循環生物反應器培養 *S. hassjoo* 細胞

此自動控制氣體組成系統，經系統壓力穩定化，系統遲滯時間 (lag time) 之估計， CO_2 緩衝液之配備等措施，達成可控制一定 O_2 之培養系統，有利探討各代謝氣體對植物細胞培養之影響及尋求最佳氣體組成。

Fig. 5 示利用氣體循環一氣相組成控制下之生物反應器培養 *S. hassjoo* 生產 L-DOPA 之結果。在兩段式培養 (初段以 0.21% O_2 通氣，後段改以 $P_{O_2}=0.30$ atm 培養)， P_{O_2} 能控制在一定濃度， P_{CO_2} 由於鹼液之吸收及系統之 lag time 故有週期性的減少，但仍能維持在吾

人所欲控制之範圍。

4.4 植物培養系氣相濃度相互關係與細胞生長、L-DOPA 生產之關係

如 Fig. 6 所示在培養初期，高 P_{O_2} 阻抑細胞生長，並促進 L-DOPA 含量及乙稀之合成，適當 P_{CO_2} (1-1.7%) 促進細胞生長， P_{O_2} 在 5% 以下會促進 L-DOPA 之生成。過量之 CO_2 阻滯細胞生長及 PPO 酵素活性， C_2H_4 可刺激 PPO 活性，適當之 C_2H_4 濃度促進 L-DOPA 之合成。在培養後期， CO_2 之增加會抑制 pH，此可影響 PPO 酵素活性。 C_2H_4 雖可促進 PPO 酵素活性，但 C_2H_4 及 CO_2 濃度之失衡，可能會導致 L-DOPA 之生成[6]。

五、參考文獻

1. Smart, N.J. and M.W. Fowler, "Effect of Aeration on Large Scale Culture of Plant Cells", *Biotechnol. Lett.* **3**, 171-176 (1981).
2. Ducos, J.P. and A. Pareilleux, "Effect of Aeration Rate and Influence of P_{CO_2} in Large-Scale Culture of *Catharanthus roseus* Cells". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 101-105 (1986).
3. Hegaty, P.K., N.J. Smart, A.H. Scragg and M.W. Fowler, "The Aeration of *Catharanthus roseus* L.G. Don Suspension Culture in Airlift Bioreactor". *J. Exp. Bot.* **37**, 1911-1920 (1986).
4. Huang, S.Y., S.Y. Chen, K.L. Wu and W.T. Taung, "Strategy for Inducing Pertinent cell Line and Optimization of the Medium for *Stizolobium hassioo* Producing L-DOPA". *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 342-347 (1995).
5. Nesius, K.K. and J.S. Fletcher, "Carbon Dioxide and pH Requirements of Non-photosynthetic Tissue Culture Cells", *Physiol. Plant.* **28**, 259-263 (1973).
6. Takayama, S.Y. and Y. Kobayashi. "Recent

Progress in Plant Tissue Culture". *Kagaku Kogaku* **55**, 111-114 (1991).

六、圖表

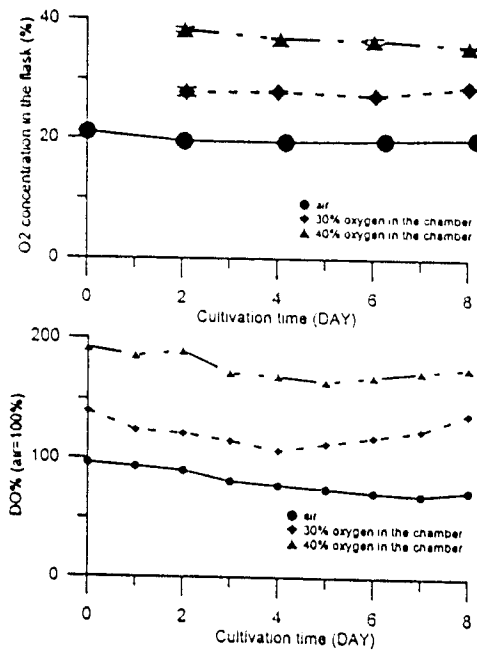


Fig.2(a). Time course of oxygen concentration and dissolved oxygen concentration in suspension culture of *S.hassjoo* in 250ml Erlenmeyer flask with 35ml medium (Inoculum : 5g FW , 8 day old cells. cultivation condition :28°C , 140rpm , 1500 lux .)

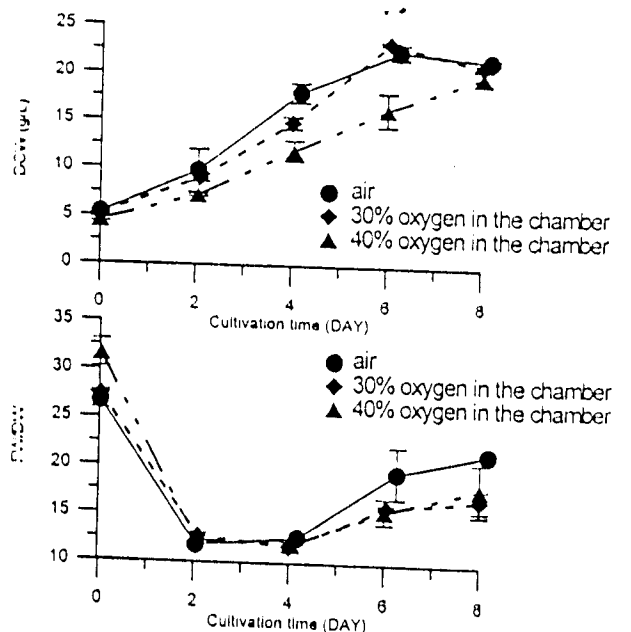


Fig 2(b) Time course of growth in suspension culture of *S.hassjoo* cells in Erlenmeyer flask (cultivation conditions : same as Fig.2(a) .)

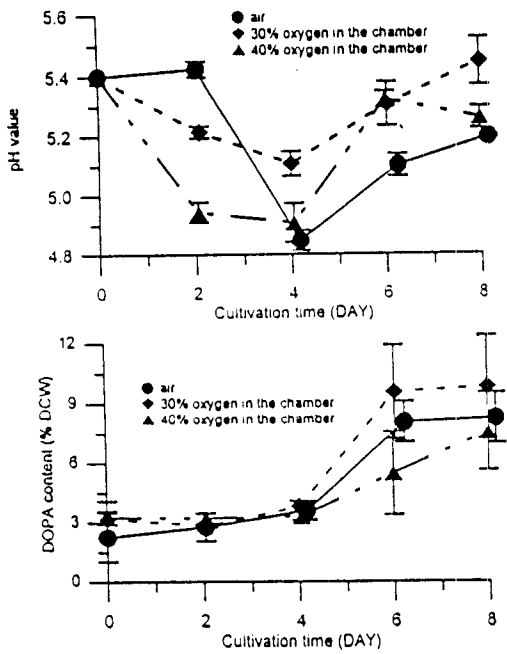


Fig.2(c). Time course of pH and L-DOPA content in suspension culture of *S. hassjo* in Erlenmeyer flask (cultivation condition : same as Fig.2(a).)

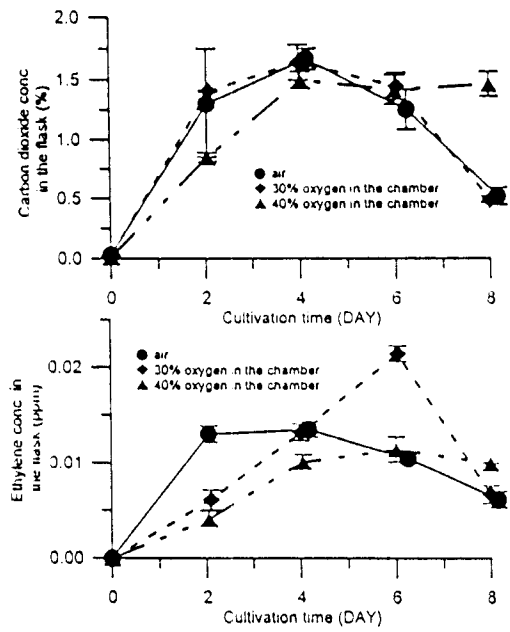


Fig.3. Time course of carbon dioxide and ethylene concentrations in suspension culture of *S. hassjo* cells in Erlenmeyer flask (cultivation conditions : same as Fig.2(a).).

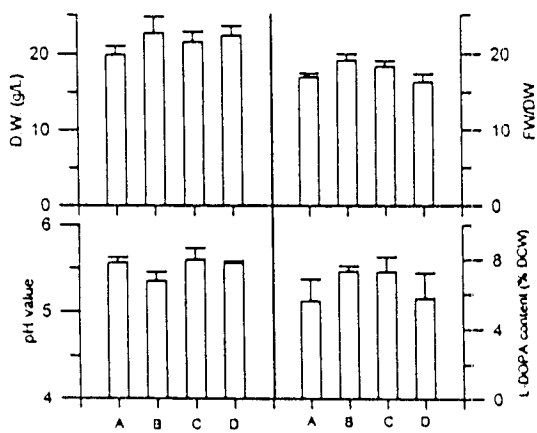


Fig.4. Effect of different gaseous composition on cell growth and L-DOPA content (A : 0.3 ppm C_2H_4 ; B : 2% CO_2 ; C : 5% CO_2 ; D : Air) Closure : silicone form , cultivation condition : same as Fig.2(a).

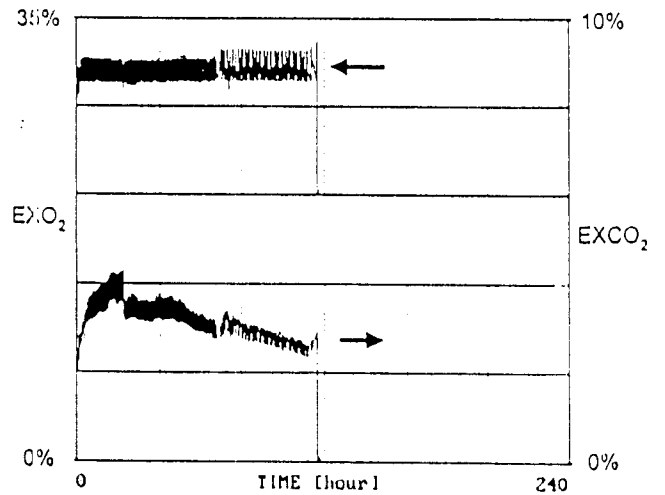


Fig 5. Print out chart of gaseous compositions at exit of bioreactor (1L working volume) controlled at 30% oxygen.

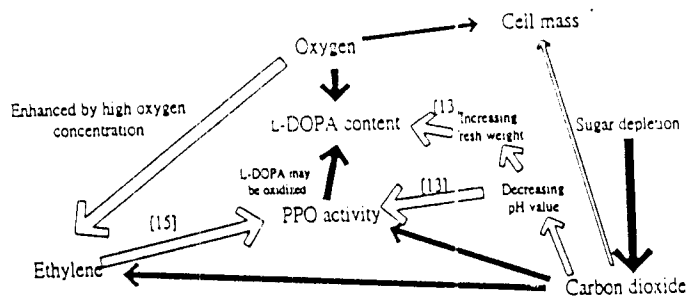
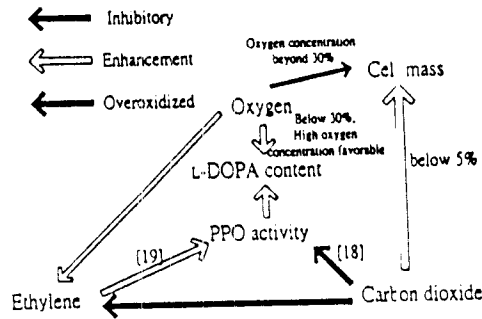


Fig.6. Interactions among the important gaseous metabolites relevant to L-DOPA production for *S.hassjoo* cultivation . (a) Initial stage of cultivation , (b) Later stage of cultivation.

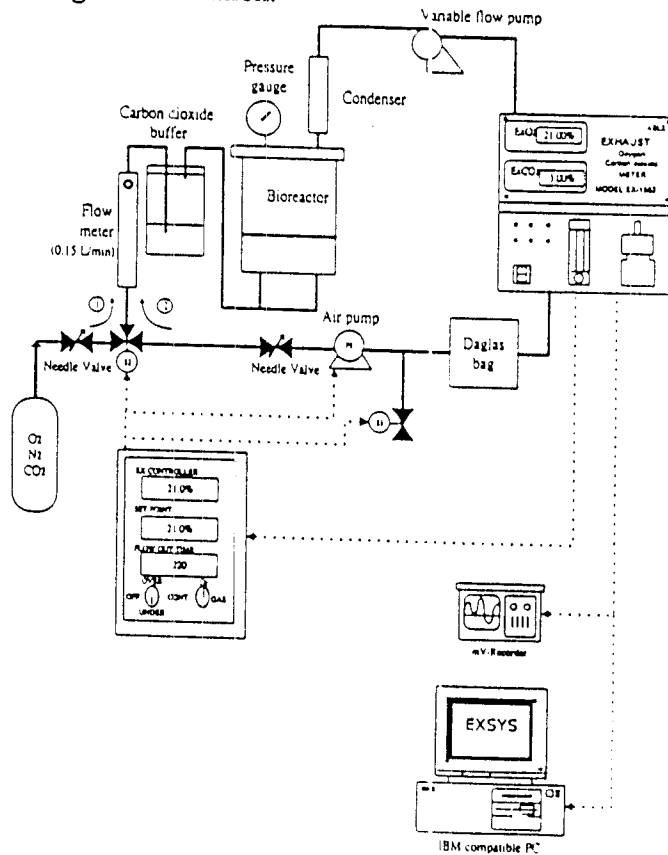


Fig.1. Experimental setup for controlling gaseous composition by incorporation of circulating flow system (solid line : flow of gas ; dotted line : electrical signal)