

攪拌式生物反應器生產植物細胞二次代謝之操作策略

Operation Strategy for Agitated Bioreactors Producing Secondary Metabolite from Plant Cell Culture

計畫編號：NSC 89-2214-E-002-008

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：黃世佑 台大化工系教授

一、中文摘要：

本計畫研究大規模培養 *Stizolobium hassjoo* 細胞系統中，影響細胞生長與二次代謝產物之重要參數，以決定較佳之操作策略。

以 5 L 規模之攪拌式反應器為研究系統，藉由不同之攪拌翼及操作條件來改變培養環境，並對其所產生之混合效應、剪應力、氧氣質傳等物理量做一探討，結果顯示 Maxblend 有最佳的混和效果，及較低之剪應力，但氧氣質傳速率不佳。具徑向攪拌效果的 flat-blade 與 flat-blade 在下方、pitched-blade 在上方之攪拌翼組合 (dual impeller) 有較高之氧氣質傳係數。

由不同操作條件下之培養結果，發現在可操作範圍內混合及剪應力的影響不如通氣量改變來的大。在剪應力較低之環境中，初期有較高之生長速率，但易造成氧氣限制；若提高通氣量 (0.08 vvm 或 0.1 vvm)，則生長受到抑制，過高之通氣量 (0.1 vvm) 甚至造成 L-DOPA 含量下降；而混和較均勻之 Maxblend 與 dual impeller 則在培養後期維持較高之 L-DOPA 含量。所得結果應以通氣所帶來之溶氧與代謝氣體的洗出影響最為重要。

關鍵詞：植物細胞培養、二次代謝產物、生物反應器、攪拌翼、動力消耗、混和、氣液質傳

Abstract

The key parameters for scaling up a plant cell culture system producing secondary metabolite were investigated.

Using a 5 L stirred reactor as an investigating system, the mixing intensity, shear stress, oxygen transfer rate and other

physical factors generated from different impeller configurations and operation conditions were studied. The result shows that Maxblend impeller had the best mixing effect, and lower shear stress, but the oxygen transfer rate is not satisfactory. The impellers generating radial flows, flat-blade turbine and the flat-blade turbine coupled with pitched blade impeller installed beneath the former impeller had higher oxygen transfer coefficient.

Based on the result of different controlling factors, we observed that within the controllable range, the effect of mixing and shear stress was not as great as that of aeration. In a lower shear stress environment, the growth rate was higher at the beginning, but it was easier to cause oxygen limitation. If we increased the aeration rate to 0.08 vvm or 0.1 vvm, the growth rate was retarded. When the aeration rate was higher than 0.1 vvm, the concentration of L-DOPA was decreased. Therefore, the most important factors for scale-up was dissolved oxygen and the stripping-off effect of aeration.

Keywords: Plant cell culture, Secondary metabolites, Bioreactor, Agitators, Power consumption, Mixing intensity, Gas-liquid mass transfer rate.

二、緣由與目的

於錐形瓶中行植物細胞之懸浮培養可得高密度細胞濃度及二次代謝產物，但在擴大規模時往往無法得到類似之結果，植物細胞反應器的設計往往依據微生物發酵槽的經驗來設計，唯兩者之間物種差異性頗大，如剪應力敏感、細胞絮聚等，此差異足以影響到反應器的設計。本研究將以

5 L 攪拌式反應器為系統，從不同操作條件下大規模培養植物細胞，一方面從工程角度探討其所造成之物理因素，一方面從生化觀點觀察此物理因素所反應出的細胞生理狀態，以期能找出擴大規模之較佳策略。

三、實驗方法

(1)植物細胞材料及培養基：

所使用之 *S. hassjoo* 細胞，為繼代培養 5 年之細胞株，接種時皆使用由 250 ml 錐形瓶培養 7-8 天之細胞。使用之培養基為 MS 培養基[1]。

(2)生物反應器：

採用四種不同特性之攪拌翼，直徑 6 cm 徑向 6 葉平板攪拌翼(6-flat blade)與軸向 3 葉 30° pitched-blade，及直徑 10 cm 之 Maxblend 攪拌翼，最後則是 flat-blade 在下方、pitched-blade 在上方之雙攪拌翼組合。於 7 L 之反應器中操作，操作體積為 5 L。

(3)生長量度與分析：

每隔兩天由反應器取出約 30 ml 之樣品分析，取樣時宜提高轉速待反應器中混和均勻，以避免取樣不均的情況。一般量測包括細胞乾重、濕重、培養液之 pH 值、導電度等，另外 L-DOPA 及醣類使用 HPLC 分析[1]。出口氣相組成則以氣相分析儀連續偵測之。

(4)Mixing time、 $K_L a$ 與動力消耗：

Mixing time 利用酸鹼中和法：到達平衡 95% 之 pH 時間定為 mixing time。 $K_L a$ 則採用 N_2 - gassing out method。動力消耗為利用高感度電阻式扭力計 (Libra Automate Co., Ltd. Taiwan) 測量範圍：0-500 g-cm；感度：2 g-cm，依下式求得：

$$P=2\pi N(\tau-\tau_0)$$

其中 P 為動力消耗，N 為轉速， τ 為實際量測之扭力， τ_0 為空轉時測得之扭力。

四、結果討論

(1)攪拌翼動力曲線

Fig. 1. 為攪拌翼動力數對雷諾數做圖，由於所操作的範圍雷諾數約在 10000 以上，在此範圍流動屬於紊流，由圖中可看出 Maxblend 大致維持水平，而 flat-blade 與 pitched-blade 則有略微下降的趨勢，此下降之趨勢應是反應器無擋板，在此範圍間易形成漩渦，使得重力對動力消耗的影響增加。另外 flat-blade 攪拌翼在前段有較不規則的現象，可能因所測得的轉矩值太小，易受整體裝置之震動或淨摩擦的影響所致。

(2)動力消耗與混和、氣液質傳的關係

植物細胞培養的要求需在低剪應力（動力消耗）下達到混合與質傳的效果，Fig. 2. 顯示了混合時間與氣液質傳對動力消耗的關係，由圖中可清楚看出 dual impeller system 在氣液質傳上表現最佳，Maxblend 則混和最好，但兩者往往無法同時達到，更進一步說，植物細胞培養所要求的混合佳、低剪應力、高氣液質傳係數在設計上常會相抵觸衝突，在培養上仍須針對不同的植物種類於其中取得平衡。

(3)生物反應器培養結果

1. 錐形瓶與反應器之差異（反應器操作條件：flat-blade turbine, 300rpm, 0.06 vvm；錐形瓶：140 rpm）：

從生長曲線來看 (Fig. 3-1, 3-2.)，反應器操作時有明顯的遲滯期，在第二天細胞乾重及濕重甚至有下降的趨勢，且在第二天起觀察到細胞有褐化的現象，這些在錐形瓶並無發現，因此細胞於反應器中所受之剪應力應較錐形瓶為大，而造成傷害或死亡的現象，另外亦顯示細胞有很強適應環境的能力，即使有較長遲滯期，但在適應後生長卻更為快速而能達到與錐形瓶相當的平均生長速率。在二次代謝產物生成能力來看，兩者的趨勢大致相同，在接種後下降，而大約在進入對數生長期後，二次代謝產物含量開始增加；但在增加量上，錐形瓶明顯勝過反應器，其可增加至接種時含量的兩倍以上，但反應器則只增加幾天便不再產生，最高生成量只在 1.5 倍左右。

2. 改變通氣量的影響：

Fig. 4. 為不同通氣下細胞生長及代謝的情形（操作條件之選擇以之前所做之較佳結果為基準：flat-blade turbine, inoculum: 75g/L, 300rpm），通氣量增加至 0.1 vvm 時，可明顯看出遲滯期增長了，細胞最終密度也不及 0.06 vvm 的結果，而在二次代謝產物方面，雖然接種時初始之含量較高（約 7 %），但其變化之趨勢並無如 0.06 vvm 般於第四天起有向上攀升的情況，其持續下降至培養末期，因此整個培養過程二次代謝產物之總量亦不及於 0.06 vvm 操作下所得之結果。在其他條件皆相同的情形下，增高通氣量時，將更易驅散影響植物細胞生長之代謝氣體如二氧化碳、乙烯等，因此反應器內之氣相組成的劇烈改變將嚴重影響植物之生長代謝。

3. 改變攪拌翼形式之影響

當改變攪拌翼的同時，包括混合效應、剪應力、氧氣質傳速率等物理性質亦隨之改變，Fig. 5. 比較了三種攪拌翼於不同操作條件下之培養結果，由於接種初期所受剪應力的影響較大[2]，一段時間後細胞將逐漸適應，因此接種初期之變化常常反映剪應力的大小，在剪應力最低之 Maxblend 攪拌翼於 50 rpm、0.06 vvm 下操作，生長曲線顯示在前兩天有明顯較快之生長速率，且無遲滯期的現象出現，因此所受之剪應力之大小仍可在看出明顯之差異；但相對的其氧氣質傳效率並不佳，第六天起便停止生長，在此條件下 $K_L a$ 只在 2.9 hr^{-1} 左右，且 $K_L a$ 又會因培養過程黏度增加而降低，推測氧氣為此條件之限制基質。而在此氧氣限制的情況下，二次代謝產物亦隨之降低。

使用 Maxblend 在 100 rpm、0.08 vvm 下操作時，OTR 已大到足夠整個培養過程所需的氧氣，但與 flat-blade 相較，其剪應力雖較小，但提供之氧氣並不如 flat-blade ($K_L a$ 略差)，且通氣量增大的結果亦影響了有益於生長之氣相組成，因此仍有較慢之生長速率，最終密度只達約 19 g/L (flat-blade, 300 rpm, 0.06 vvm 下為 21.3g/L)，而在二次代謝產物方面則遲至

第六天才開始增加，但在生成倍數上優於 flat-blade 攪拌翼。

而 dual impeller 於 300 rpm, 0.06 vvm 下，生長速率略遜於 flat-blade，可能是因為多一段攪拌翼，造成受攪拌翼直接碰撞及其附近較大紊流造成細胞傷害的機率增加的緣故。二次代謝產物方面在後期與 Maxblend, 100 rpm, 0.06 vvm 有相似的表現，因此在後期混和均勻與否似乎變的格外重要，在混合均勻的情形下，反應器局部位置不會因溶氧、養分傳遞困難影響部份細胞生長代謝，進而降低整體之產量。

綜觀上述現象，在維持足夠氧氣消耗情形的前提下，所伴隨的剪應力將不可避免，所幸此時之剪應力尚未大至讓細胞無法自行修補調適，因此在經過遲滯期後仍能快速生長。混合效應在細胞濃度增多時雖對細胞生長並無顯著影響，但卻有可能反應在代謝產物的下降。而通氣量則在本研究中包含了兩個意涵，它提供了細胞生長所需的氧氣，當氧氣限制時，不僅生長停止，且二次代謝產物亦隨之下降，因此溶氧對生長及二次代謝產物皆有正面之影響；另一則因強制通氣洗出了對生長有益的代謝氣體，增加通氣量 (0.08 vvm、0.1 vvm) 皆使得生長速率變慢，在過高的通氣量 (0.1 vvm) 甚至使二次代謝產物下降，這足以顯示此高通氣量所洗出之代謝氣體扮演了極關鍵的角色，因此通氣量在本系統 5 L 操作規模下中所產生之氧氣質傳與強制通氣之雙重效應似乎是本系統中影響最巨之參數。

(4) 反應器之操作策略

由於溶氧及氣相組成為造成反應器結果不如錐形瓶之主因，故在 *S. hassjoo* 系統擴大規模的策略上，宜先估算出適當之通氣量以維持氣相組成，在此通氣量下去維持所需要的溶氧濃度，在提高溶氧的方法上，可增加固定通氣量下之氧氣分壓，或調整轉速、改變反應器形式來達成。另一方法為以大通氣量增加氧氣質傳速率配合出口氣體循環[3][4]的方式操作，以達到提高溶氧並避免代謝氣體遭洗去的困

擾。在達到兩項重要參數下，選擇有最低剪應力與最佳混合之攪拌翼形式與轉速，如此細胞生長與二次代謝產物當有較佳之表現。

五、參考文獻：

[1]. Huang, S.Y., S.Y. Chen, K.L. Wu, and W.T. Taung, Strategy for inducing pertienet cell line and optimization of the medium for *Stizolobium hassjoo* producing L-DOPA. *J.Ferment.Bioeng.* **79**, 342-347(1995).

[2]. Ho, C.H., K.A. Henderson, and G.L. Rorrer, Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, **11**, 140-145(1995).

[3]. Schlatmann, J.E., A.M. Nuutila, W.M. van Gulik, H.J.G. ten Hoojen, R. Verpoorte, and J.J.Heijnen, Scaleup of Ajmalicine Production by Plant Cell Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 253-262 (1993).

[4]. 周崇榮(1999) 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, 國立台灣大學化學工程研究所碩士學位論文.

六、附圖：

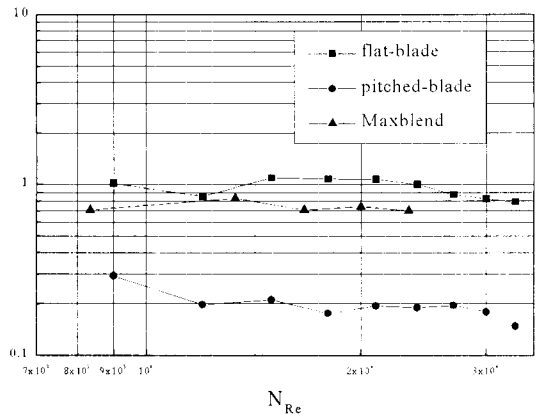


Fig. 1. Power curve for different impellers.

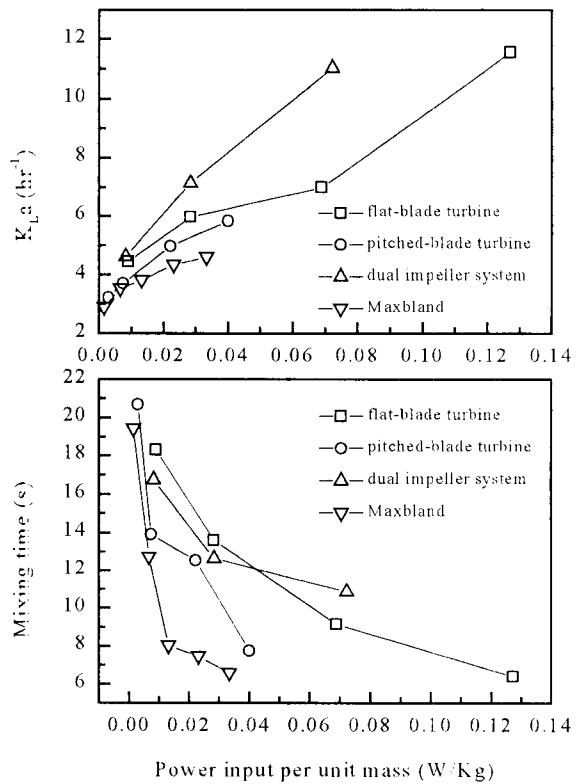


Fig.2. Relationship between K_{La} 、mixing time and power consumption with different impeller geometry in 5 L stirred-tank reactor.

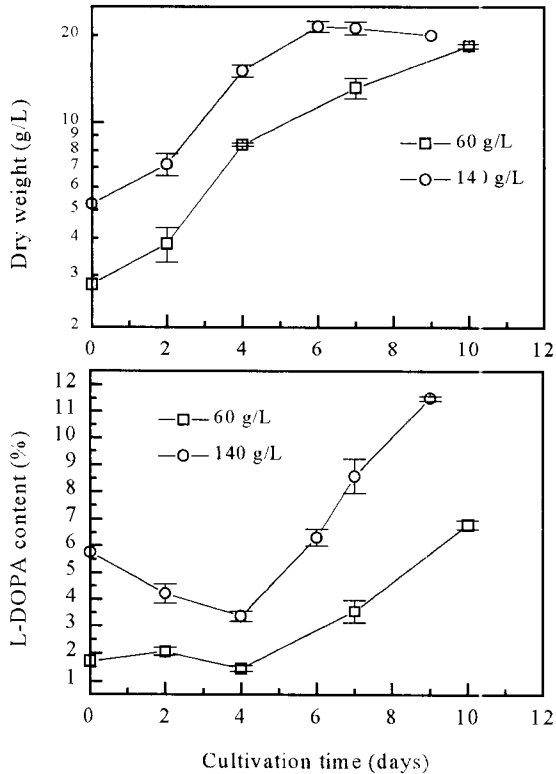


Fig. 3-1. Time course of cell growth and L-DOPA content for *S. hassjoo* suspension culture in 250-ml Erlenmeyer flasks with different inoculum size (fresh weight).

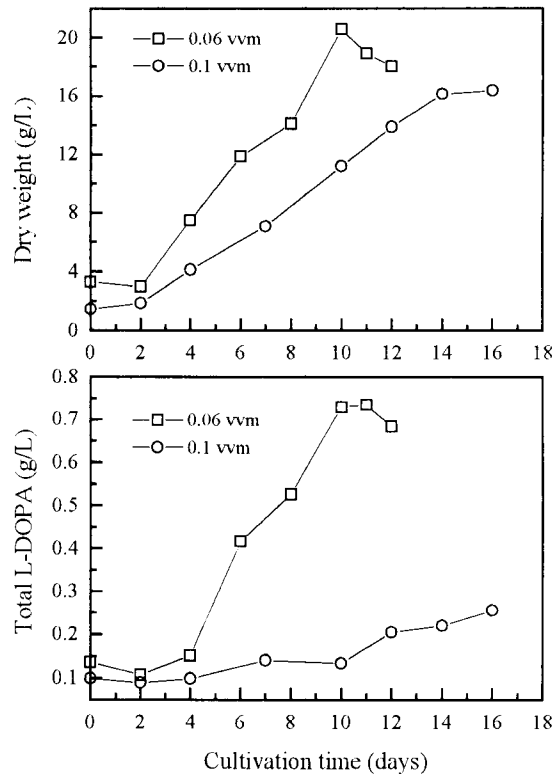


Fig. 4. Time course of cell growth and L-DOPA content for *S. hassjoo* suspension culture in 5 L stirred reactor with different aeration rates.

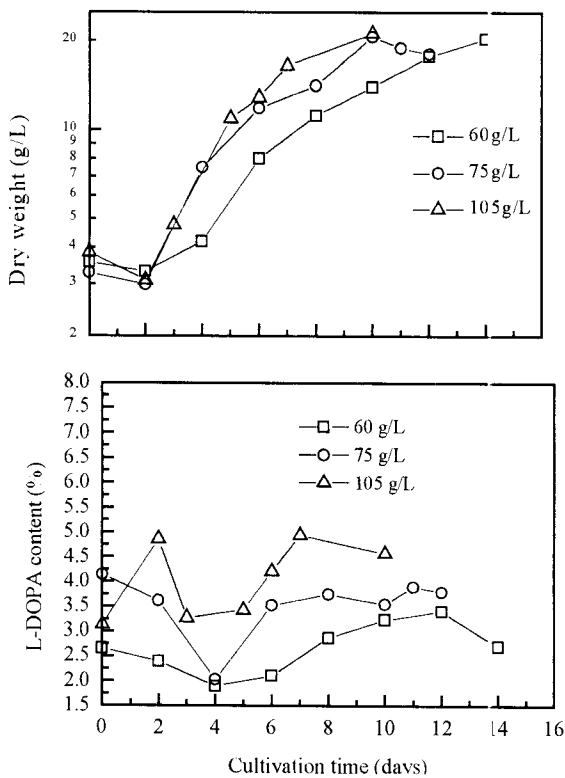


Fig. 3-2. Time course of cell growth and L-DOPA content for *S. hassjoo* suspension culture in 5 L stirred reactor with different inoculum sizes.

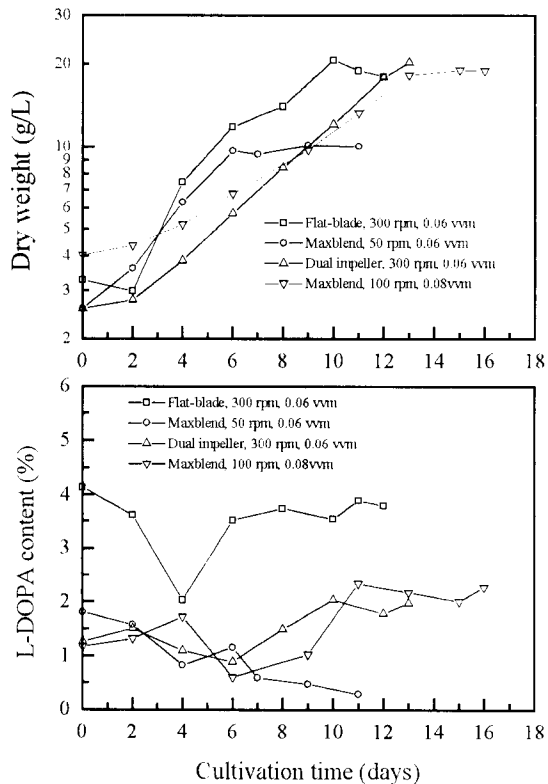


Fig. 5. Time course of cell growth and sugar consumption for *S. hassjoo* suspension culture in 5 L stirred reactor with different conditions.