

植物细胞膜固定化培养及产物释放行为研究[△]

天津大学化工系(300072) 袁其朋* 元英进 胡宗定

摘 要 研究了植物细胞膜固定化培养中各种参数对反应器性能的影响,结果表明:细胞层厚度为 7~8mm 时生产能力可达到较高的水平;孔径为 80 μ m 的不锈钢丝网是合适的固定化长春花细胞膜材料;压力脉冲是促进胞内生物碱释放的有效手段;并在理论上建立计算反应器允许细胞层厚度的方法,计算结果与实验吻合较好。

关键词 膜反应器 长春花细胞 释放

传统植物细胞膜固定化方法如凝胶包埋^[1,2]、自然固定化方法以及多孔载体固定过程^[3],常受到植物细胞对化学物质敏感性的限制。尽管凝胶包埋价格便宜,气相传质阻力也较小,但凝胶颗粒通常可以压缩,在工业化规模的填充床内由于压降大,流动形式不均一而操作困难。在流化床内进行,颗粒磨损又是另一大问题,这些问题不可克服而又特别重要^[4]。膜固定化植物细胞显示了独特的优点:^[5]a)膜设备中流体流动、压降与放大关系不大,从而减化了放大过程;b)膜设备可重复使用,降低了造价;c)利用膜的分离功能,选择性地分离产品,降低了产品抑制,同时又降低了下游处理费用;d)易于连续化生产,有巨大的工业化潜力;e)实验室可作为研究细胞生理的工具。

这里强调指出,对膜反应器培养植物细胞的研究尚不完善,研究的重点往往是合适膜材料的选择、膜固定化植物细胞的活性及对增加次生代谢产物的作用,但有关传质阻力对反应器性能影响的研究尚不多见,还未见有关细胞层厚度对细胞次生代谢产物合成能力影响的研究报道,也没有人从反应扩散方程入手,在理论上建立确定合适细胞层厚度的方法。

气相传质是限制膜反应器操作的主要因

素。为此,在操作过程中让气体直接与细胞接触。细胞表面较干,因而保证了充足的氧气供应,同时,液体中溶解气体减少,也大大减小了液相传质阻力。

1 材料与方法

细胞株系:长春花细胞株系由本实验室从长春花叶子诱导而来。

培养基:MS 培养基附加 6BA, 1mg/L; IAA, 0.2mg/L; 蔗糖, 50g/L; 起始 pH 值为 5.8。

反应器实验:将反应器和培养基在 120℃ 下进行灭菌,在无菌条件下将细胞接种在反应器中。观察细胞的生长情况,一定时间后,取出测细胞与液相生物碱含量。

反应器细胞测定方法:将细胞从反应器中取出,在离心管底部加上能吸潮的物质,离心(4000r/min) 10min,称鲜重,放入烘箱(90℃)中烘 24h,称其干重,同时得到干、鲜比。

生物碱测定:液相与细胞中生物碱的分析方法见参考文献^[6]。

2 实验部分

2.1 实验流程:实验采用两种流程 A 和 B。

流程 A 如图 1-A 所示。气体经管式活性炭空气过滤器,再经孔径小于 0.2 μ m 膜空气过滤器进入培养基储瓶,气体出口由 NaOH

* Address: Yuan Qipeng, Department of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin

[△] 本项目为博士点基金资助项目

碱溶液液封。培养基由储瓶进入反应器,再循环返回培养基储瓶,培养中营养成分通过膜

扩散进入细胞层。

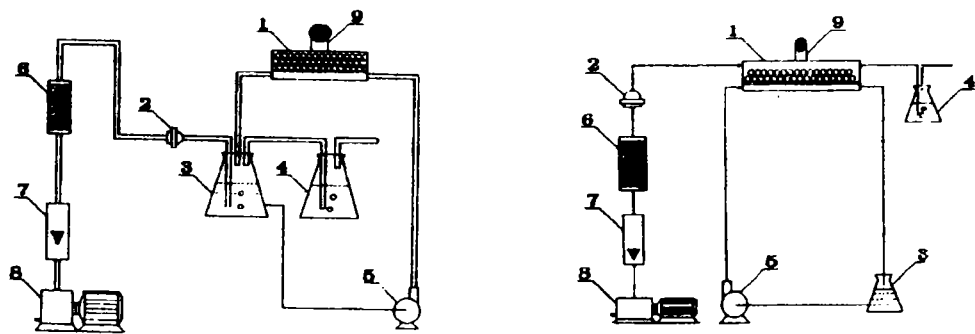


图 1 实验流程 A 和 B

1-膜反应器 2-膜空气过滤器 3-培养基储瓶 4-液封瓶 5-蠕动泵
6-活性炭空气过滤器 7-空气流量计 8-空气压缩机 9-接种口

流程 B 如图 1-B 所示。与流程 A 的差别在于细胞生长所需的氧由扫过细胞表面的气体提供。

2.2 反应器结构:反应器由玻璃制成,可在过程中随时观察细胞的生长状况,上面带有接种口。膜材料有两种,一种是孔径为 $3\mu\text{m}$ 的硝酸纤维素膜,另一种为孔径 $80\mu\text{m}$ (250 目)的不锈钢丝网。膜支承物为大孔钢丝网。膜下部体积为 70ml,上部体积为 130ml。培

养基在膜下流动,提供营养成分。
2.3 操作条件:操作温度为 $25\pm 1^\circ\text{C}$,培养基循环量为 1000ml/h,通气量流程 A 为 $0.15\text{m}^3/\text{h}$,流程 B 为 $0.05\text{m}^3/\text{h}$ 。
2.4 膜反应器培养长春花细胞生产生物碱的结果:由于操作要求在严格无菌条件下进行,整个流程保持密闭,培养过程不取样分析,只在培养结束后进行分析。结果见表 1。

表 1 膜反应器生产生物碱结果

实验流程	流程 A				流程 B	
实验次数	1	2	3	4	1	2
膜材料	硝酸纤维素	硝酸纤维素	硝酸纤维素	不锈钢丝网	不锈钢丝网	不锈钢丝网
膜孔径(μm)	3	3	3	80	80	80
接种量(g)	80	100	150	100	150	120
培养时间(d)	8	8	8	8	8	8
细胞层厚度(mm)	5.6	7.5	11.4	7.5	11.4	9.0
培养后鲜重(g)	110	143	175	150	182	151
干重(g)	3.5	4.3	5.3	4.4	5.40	4.35
干基生物碱含量%	2.05	1.95	1.60	2.00	1.42	1.55
液相生物碱含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	89.88	116.00	112.90	118.00	145	137
培养后培养基体积(L)	0.90	0.86	0.82	0.85	0.781	0.825
反应器生物碱总量(mg)	152.64	183.61	176.64	188.30	190.93	180.45
生产率($\text{mg}/\text{L}\cdot\text{d}$)	95.40	114.76	110.41	117.74	119.35	112.80

表 2 摇瓶悬浮培养 8 天的结果

接种量(%)	培养时间(d)	干重(g/L)	生产率($\text{mg}/\text{L}\cdot\text{d}$)
70	8	17.9	28.0

培养基为含 50g 糖的生产培养基

2.5 结果讨论

2.5.1 细胞层厚度的影响:由表 1 流程 A

的结果知,膜反应器培养植物细胞其生产率与细胞层厚度有很大关系。第一组实验细胞接种量较少,因而其生产能力也相对较低,而第三组实验尽管细胞层厚度远大于其它各组,但其生产率却与第二组相当,说明第二组

的接种量较为合适,再增大接种量已没有益处。从观察也可看出,第三组实验在培养过程中上层细胞生长并不好,说明营养组分所能穿透的最大细胞层厚度为 7.5mm 左右。

2.5.2 膜材料的影响:比较流程 A 第二、第四组的实验结果,说明金属丝网的性能略优于硝酸纤维素膜。从整体上考虑,金属丝网价格便宜,水力流通性好,强度高可反复应用,从而降低了膜反应器的造价。因而金属丝网是较硝酸纤维素更为合适的膜材料。

2.5.3 生产能力与摇瓶培养的比较:从流程 A 第二组与第四组的实验结果,可以看出膜反应培养长春花细胞,生产生物碱的能力远高于摇瓶培养,约为摇瓶培养的 4.2 倍。究其原因,是由于膜反应器中营养成分在细胞层中有一定的浓度梯度,有利于细胞的分化,促

进了生物碱的合成。

2.5.4 流程 B 液相生物碱含量较高的原因分析:从表 1 可以看出,流程 B 在培养结束后,液相生物碱含量明显高于流程 A。分析其原因,可能是由于压缩泵打出的脉冲气体没有经过缓冲瓶而直接吹扫细胞,压力脉冲促进了生物碱的释放而致。为此,我们进行了压力对生物碱释放影响的研究。

2.6 压力对促进生物碱释放行为的研究:50g 细胞置于 100ml 液体中,表压 4kPa 处理 10min,每隔一定时间取样分析,结果如图 2 所示。由图可以看出,经加压处理的样品,在处理 4h 之后,液相生物碱含量明显升高,未经加压处理的细胞则无此现象,从而证明了压力是促进生物碱释放的一种有效手段。

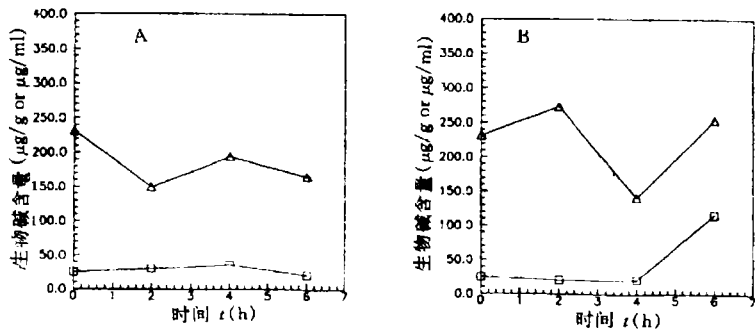


图 2 胞内外生物碱的变化

A-未处理 B-加压处理

3 膜反应器中细胞层厚度的确定

3.1 膜反应器存在的主要问题:膜反应器培养植物细胞,最突出的问题是传质问题——营养物质的传入及抑制性产物的传出。膜所能支持的细胞的量取决于膜的性质、细胞层厚度、细胞的浓度以及细胞的活性。用于固定化植物细胞的膜孔径通常较大(本实验证明孔径为 80μm 的不锈钢丝网是较好的材料),因而膜的传质阻力可忽略不计,这里仅讨论细胞层内部的传质阻力,从而确定膜所能支持的细胞层厚度。

3.2 允许细胞层厚度的确定方法:众所周知,糖是植物细胞生长的主要营养成分,糖通

常占培养基成分的 3%~7%(wt/v)。因而我们以葡萄糖在细胞层内的消耗与传递性质,探讨葡萄糖所能穿透的细胞层厚度。而实验上,此方法具有通用性,当其它组分如氧等为限制性成分时,可用类似的方法进行计算。

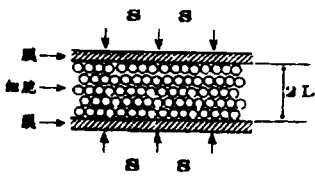


图 3 双膜式平板膜反应器

3.3 模型建立:考虑双膜式平板膜反应器,如图 3 所示,细胞层可以看作是无无限大平板,

培养基营养成分从细胞层的两端面扩散进入,作如下假定:a)系统处于稳态;b)系统恒温;c)扩散可用 Fick 定律描述;d)细胞层内部细胞均匀分布;e)细胞活性取决于细胞层内的葡萄糖浓度;f)与膜平行方向的扩散可忽略,如图 3。进行物料衡算,可得反应扩散方程:

$$\frac{d^2C_s}{dz^2} = \frac{VR_s}{D_e} \tag{1}$$

R_s 为细胞消耗葡萄糖的速率, D_e 是葡萄糖在细胞层内的扩散系数, V 为细胞的活性。

其边界条件为:

$$z=L \quad C_s=C_{ss}$$

$$z=0 \quad \frac{dC_s}{dz}=0$$

从而可得非一级反应的内扩散有效因子为^[7]:

$$\eta = \frac{\sqrt{2D_e}}{LR_{ss}} \left[\int_{C_{ss}}^{C_s} VR_s dC_s \right]^{\frac{1}{2}} \tag{2}$$

其中 C_{ss} 为细胞层中心处葡萄糖的浓度,可由(1)式通过打靶法求解而得,代入(2)式即可得到有效因子 η 、有效扩散系数 D_e 、细胞层厚度 L 之间的关系。

3.4 葡萄糖消耗速率 R_s 的确定:关于植物细胞的动力学模型,已大量见于报道。本文采用文献[8]中的非结构动力学模型,在稳态情况下,葡萄糖的消耗速率:

$$R_s = C_x \frac{C_s}{K_s + C_s} \left(\frac{\mu_{max} + q_p}{Y_{sx}} + m_s \right) \tag{3}$$

细胞的活性与细胞层葡萄糖浓度之间的关系由实验可近似为:

$$V = \left(\frac{C_s}{C_{ss}} \right)^{0.2} \tag{4}$$

3.5 参数估算:葡萄糖在固定化植物细胞内的扩散系数至今尚未见报道。Bailey 和 Ollis^[9]根据温度和膜的形成方式给出了葡萄糖在微生物膜内的扩散系数的值为 5×10^{-7} 至 5.7×10^{-6} 。由于植物细胞远大于微生物细胞,葡萄糖在其中的扩散系数要大一些,计算中取 D_e 为 $5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

在葡萄糖消耗速率表达式中,需要确定的参数有 K_s 、 μ_{max} 、 Y_{sx} 、 q_p 、 m_s 。其参数值见表

3,由于假定为稳态,生物量浓度为 C_x 也变为常数,由实验值确定。

表 3 参数一览表

参数名	数值	单位
Y_{sx}	0.654	$(\text{C} \cdot \text{mol} \cdot (\text{C}) \text{mol}^{-1})$
m_s	0.00833	$(\text{C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$
K_s	0.212	$(\text{C} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
q_p	0.0008	$(\text{C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$
μ_{max}	0.0195	h^{-1}
D_e	5×10^{-5}	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
C_x	1.2	$\text{C} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3.6 结果与讨论:培养基中葡萄糖浓度取实验值 $1.4 \text{ C} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行计算,求解式按文献[9],结果如图 4 所示。对单膜式反应器,当细胞层厚度小于 7mm 时,有效因子变化不大,而当细胞层厚度大于 8mm 时,有效因子迅速降低。因而细胞层厚度为 7~8mm 时,反应器能维持较高的生产能力。结果与实验值吻合。

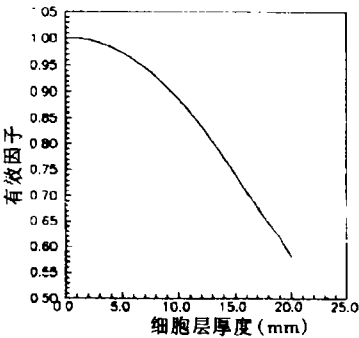


图 4 有效因子与细胞层厚度之间的关系

4 结论

膜反应器培养长春花细胞,适合于细胞的生存,所提供的微环境有利于生物碱的积累,具有较高的生产能力。反应器中,细胞层厚度及膜材料是影响反应器性能的重要因素。同时发现,压力脉冲是促进胞内生物碱释放的有效手段。

符号说明

- C_i 组分 i 的浓度 $(\text{C} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
- D_e 葡萄糖有效扩散系数 $(\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1})$
- K_s 饱和常数 $(\text{C} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
- m_s 与组分 i 相关的维持系数 $(\text{C} \cdot \text{mol} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$
- L 细胞层厚度 (mm)

q_i 组分*i*的比转化速率[(C)mol·C-mol⁻¹·h⁻¹]
 R_i 组分*i*的消耗速率[C-mol·L⁻¹·h⁻¹]
 V 细胞活性
 Y_{ij} 组分*i*转化为组分*j*的收率[C-mol·(C)mol⁻¹]
希腊字母 μ 比生长速率(h⁻¹)
角标 S 葡萄糖;X 生物量

参 考 文 献

1 Brodelius P,et al. FEBS Lett,1979,103:93
2 Rosevear A,et al. Adv Biochem Eng Biotechnol,1986, 31:37
3 Lindsey K,et al. FEBS Lett,1983,155:143

4 Anonymous. Biotechnol Newswatch,1982,2:1
5 McGregor W C, et al. In Membrane Separations in Biotechnol. Inc New York,1986. 303
6 元英进[博士论文]. 天津大学研究生毕业论文. 天津. 天津大学,1991
7 李绍芬. 化学与催化反应工程. 北京:化学出版社,1986
8 Van Gulik W M,et al. Biotechnol Bioeng,1992,40:863
9 Bailey J E, et al. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill, New York,1977. 396

(1995-07-12 收稿)

Study on Immobilization Plant Cell Culture and Release of Intracellular Metabolites

Yuan Qipeng, Yuan Yingjin, Hu Zongding

Membrane immobilization of *Catharathus roseus* (L.) G. Don cell culture was studded. Results showed that the production capacity can attain a higher level when the cell layer was 7~8mm thick. Stainless-steel screen(80μm)was suitable for immobilization of *C. roses* cell. Pressure pulse can enhance the release of intracellular metabolites. A method to determine allowable cell layer thickness was developed. The calculated value agreed well with experimental results.

薄层刮板-荧光分析法在中药复方制剂
质量控制中的应用

第二军医大学药学院(上海 200433) 李 玲* 刘明珠 徐卫明

摘 要 用薄层刮板-荧光分析法检测中药复方制剂之君药丁公藤 *Erycibe obtusifolia* Benth 的有效成分东莨菪亭(scopoletin)的含量,克服了薄层色谱干扰,取得了准确、可靠的结果。本文的研究为中药复方制剂的质量控制提供了一种较好的分析手段。
关键词 丁公藤 东莨菪亭 薄层刮板-荧光分析法 中药复方制剂

如何解决中药复方制剂的质量控制问题,一直是药物分析工作者比较关注的课题。特别是中药制剂组分繁多,成分复杂,如果不经分离或适当处理,很难获得准确可靠的结果。本课题在研究中药制剂藤络宁胶囊的质量标准时,采用薄层刮板-荧光分光光度法,对组方成分之一丁公藤的有效成分东莨菪亭^[1~4]进行了含量监测,克服了用薄层扫描

测定含量误差大、用 HPLC 法直接进样对色谱柱污染大等缺点,排除了复杂组分相互间的干扰,取得了准确可靠的结果。
1 材料与方法
1.1 仪器与试药:日立 3000 荧光分光光度计;XW-80A 旋涡混合器;80-2 离心沉淀器。化学试剂均为分析纯。
藤络宁胶囊由本院植化教研室提供;东

* Address: Li Ling, College of Pharmacy, The Second Military Medical College, Shanghai