



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108949558 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810802922.2

(22)申请日 2018.07.20

(71)申请人 中南大学

地址 410000 湖南省长沙市麓山南路932号

(72)发明人 余润兰 曾伟民 李交昆 吴学玲
申丽 刘元东 邱冠周

(74)专利代理机构 长沙朕扬知识产权代理事务
所(普通合伙) 43213

代理人 钱朝辉

(51)Int.Cl.

C12M 3/00(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

C12N 5/04(2006.01)

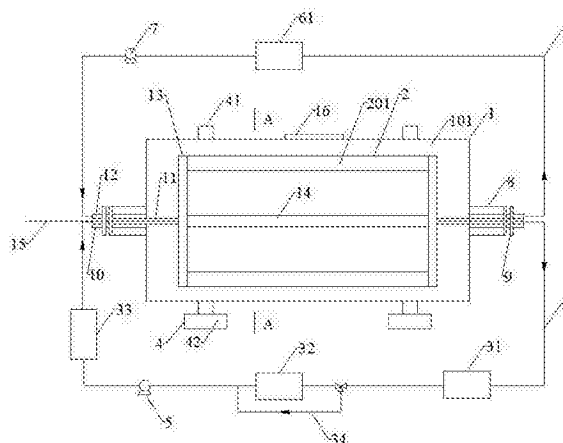
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维
反应器及番石榴叶细胞高密度培养的方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,包括滚筒、中空纤维管、培养液循环管以及用于带动所述滚筒转动的驱动装置,所述滚筒与外界不连通,所述中空纤维管固设于所述滚筒内,所述中空纤维管的数量为至少一根,所述培养液循环管与中空纤维管的管腔相连通,所述培养液循环管上设有培养液循环泵。本发明还相应提供一种利用上述滚筒中空纤维反应器培养番石榴叶细胞的方法。本发明装置在培养细胞时混合性能好、剪切力低且节能。另外,本发明装置由于滚筒转动带动壳腔流体内流动,可大大降低细胞的紧密团聚凝聚并改善其溶氧,改善膜的传质通透性,利于细胞生长代谢,有利于高密度细胞培养。



1. 一种用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,包括滚筒(1)、中空纤维管(2)、培养液循环管(3)以及用于带动所述滚筒(1)转动的驱动装置(4),所述滚筒(1)与外界不连通,所述中空纤维管(2)固设于所述滚筒(1)内,所述中空纤维管(2)的数量为至少一根,所述培养液循环管(3)与中空纤维管(2)的管腔(201)相连通,所述培养液循环管(3)上设有培养液循环泵(5)。

2. 根据权利要求1所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,所述滚筒中空纤维反应器还包括细胞液循环管(6),所述细胞液循环管(6)与中空纤维管(2)和滚筒(1)内壁形成的壳腔(101)相连通,所述细胞液循环管(6)上设有细胞液循环泵(7)。

3. 根据权利要求2所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,所述滚筒(1)的两端面的中心部位设有滚筒旋转连接轴(8),所述滚筒旋转连接轴(8)通过一接合器(9)密封、可旋转的套设于一固定不动的空心套管(10)上,所述空心套管(10)中设有与管腔(201)相连通的第一连接管(11)和与壳腔(101)相连通的第二连接管(12),所述第一连接管(11)和第二连接管(12)分别与培养液循环管(3)和细胞液循环管(6)相连通。

4. 根据权利要求3所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,所述中空纤维管(2)的数量为多根,所述滚筒(1)两端的空心套管(10)中的第一连接管(11)均伸入所述滚筒(1)内,且伸入所述滚筒(1)的第一连接管(11)的端部均设有固定圆盘(13),多根所述中空纤维管(2)通过两个固定圆盘(13)固设于所述滚筒(1)内。

5. 根据权利要求4所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,所述滚筒(1)内固设有用于控制光照时间的灯管(14),所述灯管(14)也固设于两个所述固定圆盘(13)之间,并控制所述灯管(14)与中空纤维管(2)平行且呈等边三角形错位排列,所述等边三角形错位排列是指中空纤维管(2)位于等边三角形的三个顶点上,灯管(14)位于等边三角形的中心。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,所述驱动装置(4)包括设于滚筒(1)表面的转辊(41)以及用于带动所述转辊(41)转动的转辊驱动机构(42)。

7. 根据权利要求2-5中任一项所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,所述细胞液循环管(6)上设有细胞分离装置(61);所述培养液循环管(3)上设有用于实现培养液中氧气与二氧化碳调节的气液交换装置(31)、用于去除培养液中细胞代谢产生的有害物质的吸附分离装置(32)以及用于调节培养液成分调节与温度的控温加料装置(33);所述培养液循环管(3)上还设有一用于控制所述培养液不进入或部分进入所述吸附分离装置(32)的培养液支路(34),所述培养液支路(34)的入口与所述吸附分离装置(32)的入口通过一三通阀与所述培养液循环管(3)连接,所述培养液支路(34)的出口在所述吸附分离装置(32)的出口处与所述培养液循环管(3)连通。

8. 根据权利要求7所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,其特征在于,所述吸附分离装置(32)为吸附柱,所述吸附柱中装设有吸附剂颗粒,所述吸附剂颗粒为活性炭、三氧化二铝、表面经羟基、羧基或氨基修饰的二氧化硅中的一种或几种。

9. 一种番石榴叶细胞高密度培养的方法,其特征在于,利用权利要求1-8中任一项所述的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器培养番石榴叶细胞,包括以下步骤:

(1) 对所述滚筒中空纤维反应器及培养液进行灭菌处理并冷却;

(2) 将灭菌后的培养液加入到经灭菌后的滚筒中空纤维反应器中,并接种番石榴叶细胞至所述滚筒中空纤维反应器的中空纤维管(2)外表面,开启循环泵,开启驱动装置(4)带动滚筒转动;

(3) 控制培养条件培养,即可得到高密度的番石榴叶细胞。

10. 根据权利要求9所述的高密度番石榴叶细胞培养的方法,其特征在于,所述培养条件控制为:培养温度为15-40℃,光照强度为2000-3000Lx,光照时间为6-14h/d,滚筒转速5-50rpm,循环气体流速为200-1000mL/min。

用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器及番石榴叶细胞高密度培养的方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞培养技术领域,尤其涉及一种用于细胞培养的反应器及番石榴叶细胞培养的方法。

背景技术

[0002] 番石榴植物是一种具有良好药用和营养价值的植物。但用其进行大规模生产有价产品时,则存在种植周期长、占地面积大、采收工艺流程长、成本高等缺点。番石榴植物细胞的大规模培养,是实现番石榴有价成分高效、低成本、规模化利用的有效途径。

[0003] 植物细胞培养具有周期长、细胞抗剪切能力弱、易团聚等特点。植物细胞规模培养的目的是生产获得有价的天然产物,即细胞生长的代谢物。植物细胞培养反应器的设计及其工艺方法,既要考虑有利于细胞生长,又要考虑有利于产物的积累和分离,还要求其具有适宜的氧传递、良好的流动性、较低的剪切力、低能耗等特性。目前,用于植物细胞培养的反应器主要有搅拌式、非搅拌式、植物细胞固定化反应器、膜反应器等。

[0004] 机械搅拌式生物反应器有较大的操作范围、混合程度高、适应性广,在大规模生产中得到了广泛应用。但搅拌罐中产生的剪切力大,容易损伤细胞,直接影响细胞的生长和代谢,特别是对次级产物生成影响极大。所以对剪切力敏感的植物细胞,传统的机械搅拌罐不太适用。为此,对搅拌罐的搅拌形式、叶轮结构与类型、空气分布器等进行改进,力求减少产生的剪切力,同时满足供氧与混合的要求,如采用带有双螺旋带状叶轮可以适用于剪切力敏感的细胞培养;以微孔金属丝网作为空气分布器的三叶螺旋桨反应器(MRP)能提供较小的剪切力和良好的供氧及混合状态,优于六平叶涡轮桨反应器。

[0005] 相对于传统搅拌式反应器,非搅拌式反应器所产生的剪切力较小,结构简单,比较适合植物细胞培养,其主要类型有鼓泡式反应器、气升式反应器等。鼓泡式反应器一般优于机械搅拌式反应器,但由于鼓泡式反应器对氧的利用率较低,如果用较大通气量、较大气泡或较高气速会导致较高剪切力,不利于植物细胞培养。气升式反应器广泛应用于植物细胞培养的研究和生产,一般用于多种植物细胞悬浮培养或固定化细胞培养,但其操作弹性小,低气速或在培养后期细胞密度较高时,混合效果较差,要求高径比 H/D 大。如果提高通气量来提高混合效果,又会产生大量泡沫,也易于驱除培养液中的二氧化碳等,对植物细胞生长有阻碍作用,另外,提高通气量带来的过高的溶氧对植物细胞合成次级代谢产物也不利。

[0006] 根据植物细胞的特性,许多有别于传统微生物反应器的新型反应器正用于植物细胞的研究生产,如各种固定化植物细胞反应器和膜反应器等。植物细胞表面固定化培养系统,避免了传统搅拌罐悬浮培养中的流体流动力或剪切力问题,并促进植物细胞凝聚的特性,使次级代谢产物合成和积累增加,而且该系统培养基交换简单,次级产物提取容易。植物细胞膜反应器(即“静”型中空纤维膜反应器)将细胞固定在膜上,培养基在膜下封闭回路循环流动(即中空纤维膜管的管程),营养透过膜扩散至细胞层,次级代谢物分泌透过膜扩散至培养基。但固定化植物细胞反应器和膜反应器存在传质速度慢和传质不均衡问题,当

贴壁依赖型细胞培养密度不断增大时,混合情况变差,膜表面局部或器壁上存在细胞过分凝聚并产生大量泡沫现象,造成细胞凝聚环境内部营养物质和氧的供给不足,导致活细胞量和代谢产物减少,严重时培养过程被迫中止。

[0007] 因此,研究开发出一种膜传质通透性好、利于细胞生长代谢、防止细胞过度团聚凝聚的新型细胞培养反应器具具有广阔的市场前景。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题是克服以上背景技术中提到的不足和缺陷,对现有植物细胞培养的膜反应器及其工艺进行综合改进,提供一种剪切小,能耗低、膜传质通透性好、利于细胞生长代谢、防止细胞过度团聚凝聚的滚筒中空纤维反应器,并相应提供一种番石榴叶细胞高密度培养的方法。为解决上述技术问题,本发明提出的技术方案为:

[0009] 一种用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,包括滚筒、中空纤维管、培养液循环管以及用于带动所述滚筒转动的驱动装置,所述滚筒与外界不连通,所述中空纤维管固设于所述滚筒内,所述中空纤维管的数量为至少一根,所述培养液循环管与中空纤维管的管腔相连通,所述培养液循环管上设有培养液循环泵。

[0010] 上述用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器中,中空纤维管是由聚枫或丙烯的聚合物组成的半透膜,水分子、营养物质、细胞代谢物和气体可以透过,含氧气与营养物质的培养液从中空纤维管的管腔中流过,细胞在中空纤维管外表面生长,细胞生长所需要的水、营养物质等由于浓度差可透过中空纤维管到达细胞处,细胞产生的代谢产物也可透过中空纤维管到达中空纤维管内腔被培养液带走,细胞与培养液之间的营养交换更加充分高效,更加有利于细胞的生长繁殖。

[0011] 常规的“静”型中空纤维反应器有一些固有缺点:在培养后期由于细胞密度急剧增大,会导致粘度增加,混合性能变得较差,细胞团聚凝聚,以致团聚体内溶氧变差,因内部缺氧而造成细胞死亡。本发明中的滚筒中空纤维反应器由于滚筒的低剪切转动可大大降低细胞的紧密团结凝聚,可改善膜的传质通透性,从而有利于高密度细胞培养。

[0012] 上述滚筒中空纤维反应器中,优选的,所述滚筒中空纤维反应器还包括细胞液循环管,所述细胞液循环管与中空纤维管和滚筒内壁形成的壳腔相连通,所述细胞液循环管上设有细胞液循环泵。仅中空纤维膜管内的培养液流动的常规“静”型中空纤维反应器,在培养后期由于细胞密度过大,带来一系列背景中提及的问题,而滚筒转动可以非常有效的解决常规的“静”型中空纤维反应器的这些缺点,同时,设置细胞液循环管,不仅实现细胞液在滚筒滚动下的内流动而且也可以外循环流动,可大大降低高密度时细胞的紧密团聚凝聚,并改善其溶氧和 CO_2 ,更加有利于细胞生长代谢,有利于高密度细胞培养。另外,设置细胞液循环管还可方便从滚筒内分离细胞,达到边培养边分离的效果,以实现连续或半连续操作。

[0013] 上述滚筒中空纤维反应器中,优选的,所述滚筒的两端面的中心部位设有滚筒旋转连接轴,所述滚筒旋转连接轴通过一接合器密封、可旋转的套设于一固定不动的空心套管上,所述空心套管中设有与管腔相连通的第一连接管和与壳腔相连通的第二连接管,所述第一连接管和第二连接管分别与培养液循环管和细胞液循环管相连通。滚筒两端的滚筒旋转连接轴套设于空心套管上时,滚筒旋转连接轴与空心套管之间的接合器采用旋转机械

端面密封,滚筒围绕空心套管转动时,外界的含菌气体也无法进入滚筒。

[0014] 上述滚筒中空纤维反应器中,优选的,所述中空纤维管的数量为多根,所述滚筒两端的空心套管中的第一连接管均伸入所述滚筒内,且伸入所述滚筒的第一连接管的端部均设有固定圆盘,多根所述中空纤维管通过两个固定圆盘固设于所述滚筒内。实际操作中,若中空纤维管与滚筒一起转动,会带来较大的剪切力(相当于一般的搅拌器搅拌),且中空纤维管内(管程)与滚筒内(壳腔)一起转动,则管程和壳腔两个不同的流体不能连续各自出入该设备,不能连续生产,只能间歇生产。采用本发明的上述结构设计,固定圆盘将通过第一连接管固定于滚筒内,中空纤维管将不会与滚筒同步转动,整个装置只有细胞培养液随滚筒转动而流动,而滚筒内部的中空纤维管一直是固定的,这样既可以大大降低剪切力对细胞的影响又可以防止固定化细胞后期紧密堆积而带来的一系列问题。

[0015] 上述滚筒中空纤维反应器中,优选的,所述滚筒内固设有用于控制光照时间的灯管,所述灯管也固设于两个所述固定圆盘之间,并控制所述灯管与中空纤维管平行且呈等边三角形错位排列,所述等边三角形错位排列是指中空纤维管位于等边三角形的三个顶点上,灯管位于等边三角形的中心。设置灯管可方便调控光照及其时间,改善植物细胞生长代谢时获取光源的有效性,以满足细胞对不同光照强度和光照时间的需求,有利于植物细胞的生长。采用等边三角形错位排列可最大限度的利用光照,且光照分布更均匀、更合理。

[0016] 上述滚筒中空纤维反应器中,优选的,所述驱动装置包括设于滚筒表面的转辊以及用于带动所述转辊转动的转辊驱动机构。

[0017] 上述滚筒中空纤维反应器中,优选的,所述细胞液循环管上设有细胞分离装置;所述培养液循环管上设有用于实现培养液中氧气与二氧化碳调节的气液交换装置、用于去除培养液中细胞代谢产生的有害物质(除去有害物质可大大降低抑制性代谢产物对植物细胞生长的反馈抑制作用)的吸附分离装置以及用于调节培养液成分调节与温度的控温加料装置;所述培养液循环管上还设有一用于控制所述培养液不进入或部分进入所述吸附分离装置的培养液支路,所述培养液支路的入口与所述吸附分离装置的入口通过一三通阀与所述培养液循环管连接,所述培养液支路的出口在所述吸附分离装置的出口处与所述培养液循环管连通。气液交换装置、吸附分离装置与控温加料装置的设置可实现培养液中各种工艺参数(如温度、时间、氧浓度、营养物质浓度等)的控制,以满足细胞生长代谢的需求。设置培养液支路可选择性的使培养液进入或部分进入吸附分离装置,需要去除培养液中的抑制性代谢物质时,三通阀关闭培养液支路,使培养液进入吸附分离装置,反之,三通阀关闭吸附分离装置的入口,使培养液沿培养液支路回到培养液循环管中。

[0018] 上述滚筒中空纤维反应器中,优选的,所述吸附分离装置为吸附柱,所述吸附柱中装设有吸附剂颗粒,所述吸附剂颗粒为活性炭、三氧化二铝、表面经羟基、羧基或氨基修饰的二氧化硅中的一种或几种。

[0019] 作为一个总的技术构思,本发明还提供一种番石榴叶细胞高密度连续培养的方法,该方法利用上述滚筒中空纤维反应器培养番石榴叶细胞,包括以下步骤:

[0020] (1) 对所述滚筒中空纤维反应器及培养液进行灭菌处理并冷却;

[0021] (2) 将灭菌后的培养液加入到经灭菌后的滚筒中空纤维反应器中,并接种番石榴叶细胞至所述滚筒中空纤维反应器的中空纤维管外表面,开启循环泵,开启驱动装置带动滚筒转动,(加液及接种均通过滚筒筒身上的密封盖口);

[0022] (3) 控制培养条件培养即可得到高密度的番石榴叶细胞。

[0023] 上述番石榴叶细胞高密度培养的方法中,优选的,所述培养条件控制为:培养温度为15-40℃,光照强度为2000-3000Lx,光照时间为6-14h/d,滚筒转速5-50rpm,循环气体流速(即气液交换装置中采用的二氧化碳和氧气的混合气体)为200-1000mL/min。

[0024] 通过利用滚筒中空纤维反应器培养番石榴叶细胞,可实现番石榴叶细胞的大规模、高密度培养,是实现番石榴叶中有价成分高效、低成本、规模化利用的有效途径。

[0025] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0026] 1、本发明装置在培养细胞时混合性能好、剪切力低且节能,同传统的搅拌通风反应器相比,节能三分之二以上,剪切作用可减少95%,具有对细胞培养液的流变特性变化适应性强的特点。

[0027] 2、本发明装置由于滚筒转动带动壳腔流体内流动,可大大降低细胞的紧密团聚凝聚并改善其溶氧,改善膜的传质通透性,利于细胞生长代谢,有利于高密度细胞培养。

[0028] 3、本发明装置中培养液从中空纤维管的内腔中流过,细胞位于中空纤维管的外表面,可增加细胞与培养液的接触面积,营养交换更加充分高效,更加有利于细胞的生长繁殖。

[0029] 4、本发明的番石榴叶细胞培养方法简单、高效,可适用于大规模连续、工业化生产。

附图说明

[0030] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0031] 图1为实施例中用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器的结构示意图。

[0032] 图2为图1中A-A面的剖切视图。

[0033] 图例说明:

[0034] 1、滚筒;101、壳腔;2、中空纤维管;201、管腔;3、培养液循环管;31、气液交换装置;32、吸附分离装置;33、控温加料装置;34、培养液支路;4、驱动装置;41、转辊;42、转辊驱动机构;5、培养液循环泵;6、细胞液循环管;61、细胞分离装置;7、细胞液循环泵;8、滚筒旋转连接轴;9、接合器;10、空心套管;11、第一连接管;12、第二连接管;13、固定圆盘;14、灯管;15、灯管电源线;16、密封盖口。

具体实施方式

[0035] 为了便于理解本发明,下文将结合说明书附图和较佳的实施例对本发明作更全面、细致地描述,但本发明的保护范围并不限于以下具体的实施例。

[0036] 除非另有定义,下文中所使用的所有专业术语与本领域技术人员通常理解的含义相同。本文中所使用的专业术语只是为了描述具体实施例的目的,并不是旨在限制本发明的保护范围。

[0037] 除非另有特别说明,本发明中用到的各种原材料、试剂、仪器和设备等均可通过市

场购买得到或者可通过现有方法制备得到。

[0038] 实施例：

[0039] 如图1所示,本实施例的用于植物细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器,包括滚筒1、中空纤维管2、培养液循环管3以及用于带动滚筒1转动的驱动装置4,滚筒1与外界不连通,中空纤维管2固设于滚筒1内,中空纤维管2的数量为至少一根,培养液循环管3与中空纤维管2的管腔201相连通,培养液循环管3上设有培养液循环泵5。

[0040] 本实施例中,滚筒中空纤维反应器还包括细胞液循环管6,细胞液循环管6与中空纤维管2和滚筒1内壁形成的壳腔101相连通,细胞液循环管6上设有细胞液循环泵7。

[0041] 本实施例中,滚筒1的两端面的中心部位设有滚筒旋转连接轴8,滚筒旋转连接轴8通过一接合器9密封(通过旋转机械端面密封)、可旋转的套设于一固定不动的空心套管10上,空心套管10中设有与管腔201相连通的第一连接管11和与壳腔101相连通的第二连接管12,第一连接管11和第二连接管12分别与培养液循环管3和细胞液循环管6相连通。

[0042] 本实施例中,中空纤维管2的数量为多根,滚筒1两端的空心套管10中的第一连接管11均伸入滚筒1内,且伸入滚筒1的第一连接管11的端部均设有固定圆盘13,多根中空纤维管2通过两个固定圆盘13固设于滚筒1内。

[0043] 本实施例中,滚筒1内固设有用于控制光照时间的灯管14(灯管14的灯管电源线15通过空心套管10引入滚筒1内部),灯管14也固设于两个固定圆盘13之间,并控制灯管14与中空纤维管2平行且呈等边三角形错位排列,等边三角形错位排列是指中空纤维管2位于等边三角形的三个顶点上,灯管14位于等边三角形的中心。以三根中空纤维管2和一根灯管14为例,布置图如图2所示。

[0044] 本实施例中,驱动装置4包括设于滚筒1表面的转辊41以及用于带动转辊41转动的转辊驱动机构42。本实施例中的驱动装置4不限于上述限定的转辊41与转辊驱动机构42,一般常用的驱动方式,只要能满足本实施例中的驱动效果均可。

[0045] 本实施例中,细胞液循环管6上设有细胞分离装置61;培养液循环管3上设有用于实现培养液中氧气与二氧化碳调节的气液交换装置31、用于去除培养液中细胞代谢产生的有害物质的吸附分离装置32以及用于调节培养液成分调节与温度的控温加料装置33;培养液循环管3上还设有一用于控制培养液不进入或部分进入吸附分离装置32的培养液支路34,培养液支路34的入口与吸附分离装置32的入口通过一三通阀与培养液循环管3连接,培养液支路34的出口在吸附分离装置32的出口处与培养液循环管3连通。

[0046] 本实施例中,吸附分离装置32为吸附柱,吸附柱中装设有吸附剂颗粒,吸附剂颗粒为活性炭、三氧化二铝、表面经羟基、羧基或氨基修饰的二氧化硅中的一种或几种。

[0047] 本实施例的装置具有以下优点:1、本实施例的装置在培养细胞时混合性能好、剪切力低且节能,同传统的搅拌通风反应器相比,节能三分之二以上,剪切作用可减少95%,具有对细胞培养液的流变特性变化适应性强的特点。2、本实施例的装置由于滚筒1转动带动壳腔101流体内流动,可大大降低细胞的紧密团聚凝聚并改善其溶氧,改善膜的传质通透性,利于细胞生长代谢,有利于高密度细胞培养。3、本实施例的装置中培养液从中空纤维管2的管腔201中流过,细胞位于中空纤维管2的外表面,可增加细胞与培养液的接触面积,营养交换更加充分高效,更加有利于细胞的生长繁殖。

[0048] 本实施例还提供一种番石榴叶细胞高密度培养的方法,该方法利用上述用于植物

细胞高密度培养的滚筒中空纤维反应器培养番石榴叶细胞,包括以下步骤:

[0049] (1) 接入125℃蒸汽对5L的滚筒中空纤维反应器进行蒸汽灭菌15min,再将4L植物细胞通用MS培养基的pH值调至5.5-6.5,将其装入高温高压灭菌锅进行灭菌,灭菌条件为0.1MPa、121.5℃、15-30min,灭菌好后取出冷却;

[0050] (2) 将灭菌后的培养基直接通过滚筒1的密封盖口16加入,并接种由果胶酶处理-离心-过滤法获得的番石榴叶细胞至中空纤维管2的外壁,接种量为 1×10^5 cells/mL,开启各循环泵及驱动装置4带动滚筒1转动;

[0051] (3) 控制培养条件如下:培养温度为 $28 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度为2000-3000Lx(上述范围均可),光照时间为12h/d,滚筒1的转速5-50rpm(上述范围均可),循环气体流速为600mL/min,间隙一段时间向培养液补充营养物质并去除培养液中的抑制性物质,培养即可得到高密度的番石榴叶细胞(培养中途可能过细胞液循环管6收集高密度的番石榴叶细胞)。

[0052] 本实施例的番石榴叶细胞培养的方法中,每隔4天观察并调整补充一次培养基,补充激素、微量元素等营养物质并去除抑制性物质(培养液每隔4天经过一次吸附分离装置),培养3周后,番石榴叶细胞密度为 2.3×10^8 cells/mL。每隔1天观察并调整补充一次培养基,补充激素、微量元素等营养物质并去除抑制性物质(培养液每隔一天经过一次吸附分离装置),培养3周后,番石榴叶细胞密度为 7.8×10^8 cells/mL。每隔1天观察并调整补充一次培养基,补充激素、微量元素等营养物质但不去除抑制性物质(培养液不经过吸附分离装置),培养3周后,番石榴叶细胞密度为 3.4×10^8 cells/mL。

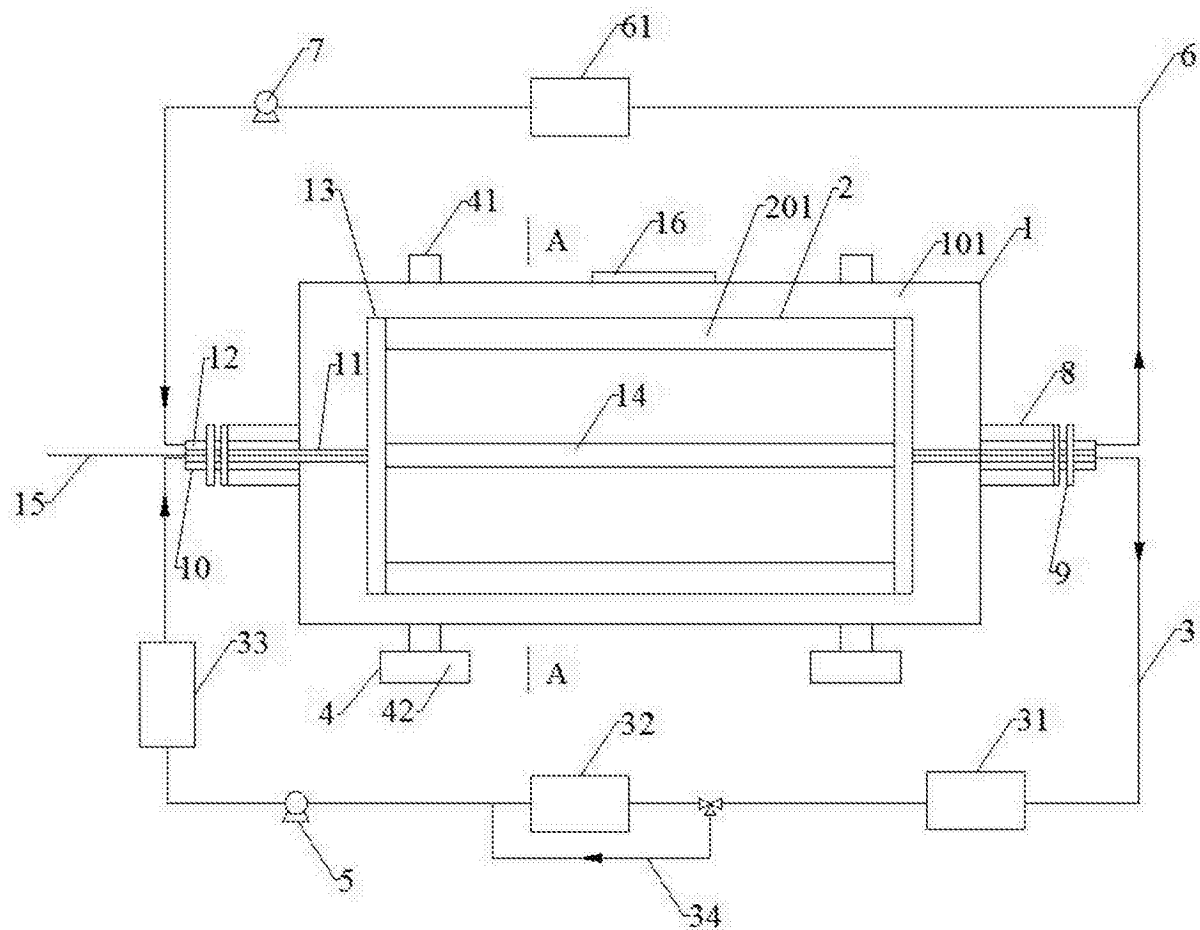


图1

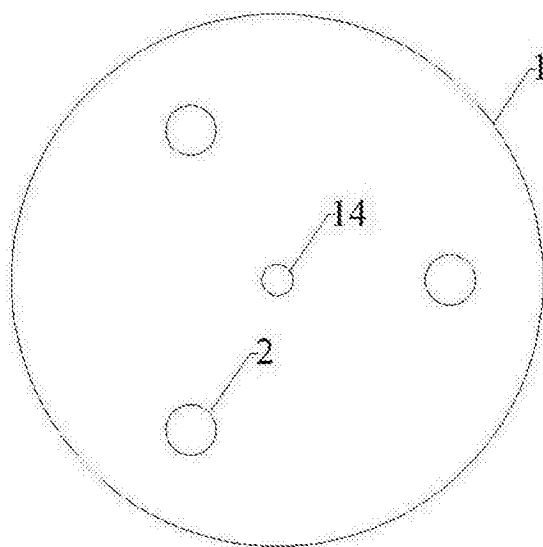


图2