

外循环气升式反应器培养新疆紫草细胞

陈士云¹ 侯嵩生¹ 叶和春² 李国凤²
张健¹ 李新明¹ 陈路¹ 董教望²

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)¹

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)²

摘要 采用两步培养法进行新疆紫草细胞悬浮培养及 5L 外循环气升式反应器扩大培养, 探讨了培养过程中细胞生长、紫草色素合成与培养液的电导率、可溶性糖含量变化之间的关系。第一步培养时细胞生长迅速, 但也有一部分色素合成, 电导率及可溶性糖含量迅速下降; 第二步培养初期电导率也开始下降, 但当色素合成达到高峰并有一部分外泌到培养基后, 电导率又开始回升。可溶性糖消耗很快, 到后期已测不出其存在。因此通过监测培养液中电导率及可溶性糖的变化情况, 可以为新疆紫草细胞大规模培养与色素合成提供有用的参数指标。

关键词 新疆紫草, 悬浮培养, 反应器培养, 电导率, 可溶性糖

研制适合于植物细胞大规模培养的生物反应器, 已成为这一技术走向实用化的重要问题之一。由于植物细胞本身具有的一些特性, 如耐剪切力低, 对氧的需求不是很高等原因, 因此一般用于微生物细胞培养的反应器难以适合植物细胞的大量培养^[1]。我们以新疆紫草细胞为材料, 采用两步培养法, 研究细胞在悬浮培养及 5L 外循环气升式反应器中细胞生长、色素合成与某些参数变化之间的关系, 为反应器的放大设计提供依据, 也为今后的大规模培养提供一些参考指标。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

实验采用新疆紫草 (*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston) 愈伤组织 A-1 高产系, 其来源参见文献 [2]。

1.2 方法

1.2.1 细胞悬浮培养: 将培养 15 天左右的愈伤组织转至含有 AG-7 液体生长培养基^[3] 的 250ml 三角锥瓶中, 在摇床上培养 2—3 代后倒入 1L 三角瓶中, 混匀, 经 18 目筛网过滤, 于无菌条件下称取 5g 鲜细胞, 接种到装有 100ml AG-7 生长培养基的 250ml 三角瓶中于摇床上培养, 定期取样, 用于各种参数的测定。第一步培养结束后, 将剩下的三角瓶中的细胞经 18 目筛过滤, 用无菌水冲洗后, 再接入装有 100ml M-9 培养基^[4] 的 250ml 三角瓶中培养, 定期取样, 过滤, 滤液用于各种参数测定。培养过程中无光照, 培养温

度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 摇床转速 110r/min。文中所得结果为三次重复实验的平均值。

1.2.2 反应器培养: 所用 5L 外循环气升式反应器, 系英国 Sheffield 大学 Smart 博士, Fowler 教授设计并赠送, 其结构参数见文献 [5]。将悬浮培养 2—3 代的细胞接入反应器中, 反应器工作体积为 3.75L, 通气率为 0.25vvm, 接种量为每升 3g 干细胞。培养 12 天后, 滤去生长培养基, 加入 M-9 生产培养基, 培养 16 天后收获。培养过程中定期取样, 用于生物量及其他参数的测定。

1.2.3 各种参数的测定: (a) 细胞干重、鲜重: 过滤后称取细胞鲜重, 细胞在 50°C 烘干后得细胞干重。细胞干重增加倍数 = (细胞干重 - 接种量) / 接种量。(b) 电导率、可溶性糖: 过滤后的滤液采用 DDS-11A 型电导率仪 (天津第二分析仪器厂生产) 测定电导率; 可溶性糖的测定按蒽酮比色法^[6]。根据不同培养时期培养液含糖量的不同适当稀释, 取 100 μl 样液, 加 5ml 蒽酮试剂, 摇匀后煮沸 5 分钟, 取出后立即冷却, 于 7520 型分光光度计 (上海第二分析仪器厂) 在 620nm 处比色, 根据标准曲线得出可溶性糖含量。(c) 紫草色素含量测定: 称取一定量烘干的细胞研磨后, 于索氏提取器中用石油醚 ($30-60^\circ\text{C}$) 提取至无色, 定容后于 7520 型分光光度计在 520nm 处测定吸光值, 根据标准曲线, 得出紫草色素含量。外泌至培养液中紫草色素含量根据培养液的吸光值确定。

2 结果与讨论

2.1 悬浮培养细胞生长与紫草色素的合成

悬浮培养细胞生长曲线的测定, 对于反应器扩大培养具有指导意义。图 1 是两步培养一个周期内新疆紫草悬浮培养细胞生长与紫草色素合成曲线。可以看出第一步培养细胞生长迅速, 到第 16 天培养结束时, 细胞干重达 18g/L, 与接种量 (约 3g/L) 相比, 干重增加 5 倍, 细胞生长速率达 0.93g/L·d, 这一阶段色素合成较少, 外泌至培养基中的色素量为 58mg/L, 细胞内色素含量只有 134mg/L。换入 M-9 培养基后, 细胞生长明显减缓, 到第 30 天收获时, 细胞干重为 28g/L, 整个培养周期干重增加 8.3 倍, 细胞生长速率为 0.83g/L·d。第二步培养细胞内色素含量上升很快, 到培养结束时, 细胞内色素含量为 1300mg/L, 培养液中色素含量为 60mg/L。从图 1 还可以看出, 细胞生长的高峰先于色素合成的高峰出现, 到第 28 天生物量达最大时, 色素含量仍呈直线上升趋势。色素合成从第 20 天开始是一个转折点。因此在进行新疆紫草细胞大量培养时, 应掌握好第一步培养结束时更换培养基的时间, 以及第二步培养结束时的收获时间, 使紫草色素的含量尽可能提高。

2.2 新疆紫草细胞生长、色素合成与培养液电导率及可溶性糖含量变化之间的关系

由于植物细胞培养周期长, 靠取样来判断细胞生长与产物合成情况, 极易引起污染而造成损失。目前还没有建立起可靠的植物细胞大量培养过程中生物量的在线监测方法^[7]。我们以前在九连小檗 (*Berberis julianae*) 悬浮培养细胞生理生化特性的研究中, 观察到细胞生长与培养液电导率的变化曲线呈镜像关系, 认为电导率可以作为细胞生长的重要指标^[8]。为此, 我们测定了新疆紫草悬浮培养细胞电导率的变化以及可溶性糖的消耗曲线, 其结果见图 2。可以看出随着培养时间的延长, 各种无机离子被消耗, 电导率因此

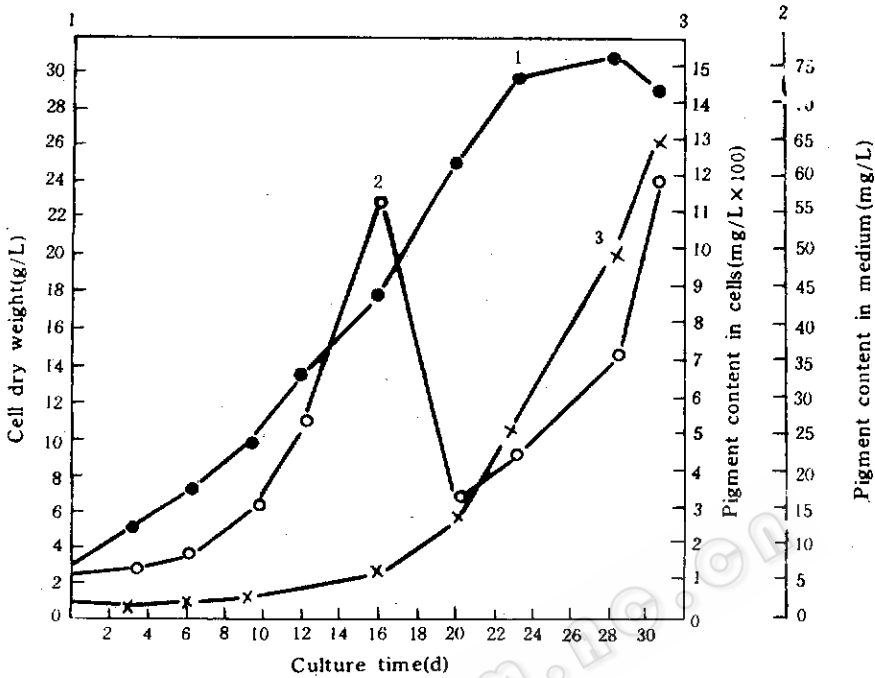


图 1 新疆紫草悬浮培养细胞生长与色素合成曲线

Fig. 1 Time-course of cell growth and pigment formation in suspension cultured cells of *Arnebia euchroma*

逐渐下降。到第 16 天更换培养基后,电导率最初也开始下降,但到第 22 天细胞生长达到高峰后,电导率又开始回升。这与我们对九连小檗悬浮培养细胞的研究结果是不大一致的。是什么原因促使电导率下降较慢到后期又回升呢?综合图 1 及图 2 不难发现,由于紫草细胞属外泌型,有相当一部分紫草色素外泌到培养基中,到第 16 天和第 30 天时,培养液中紫草色素含量分别达 58mg/L 和 60mg/L,而此时对应的电导率分别是 $3.4 \times 10^3 \mu\text{V}/\text{cm}$ 和 $3.3 \times 10^3 \mu\text{V}/\text{cm}$,两者基本相当,说明电导率的缓慢下降与后期回升乃是外泌至培养液中的紫草色素的影响所致。而九连小檗细胞培养液中药根碱的量相当少^[9],因此对电导率的变化几乎没有影响。电导率的变化在第 22 天是一个转折点,而此时细胞生长已达高峰,色素合成与外泌量迅速增加。因此电导率的变化不仅可以指示细胞的生长情况,还可以反映色素的合成情况,这一点如果能够能够在反应器中体现出来,将对指导新疆紫草细胞的工业化生产起重要作用。

可溶性糖在第一步培养时下降很快,到更换培养基时几乎测不出其存在,加入 M-9 培养基后,由于重新补加了 3% 的蔗糖,可溶性糖的曲线又开始从高往下降,到培养结束时,已测不出可溶性糖。

2.3 5 L 外循环气升式反应器培养结果

图 3 所示是新疆紫草细胞在 5L 外循环气升式反应器中的培养结果。第一步培养 12 天结束时生物量为 20g/L,相对于接种量约 3g 干细胞,干重增加 5.7 倍,生长速率为 $1.4\text{g}/\text{L} \cdot \text{d}$ 。第二步培养 16 天收获后,细胞干重达 25g/L,整个培养周期干重增加 7.3 倍,

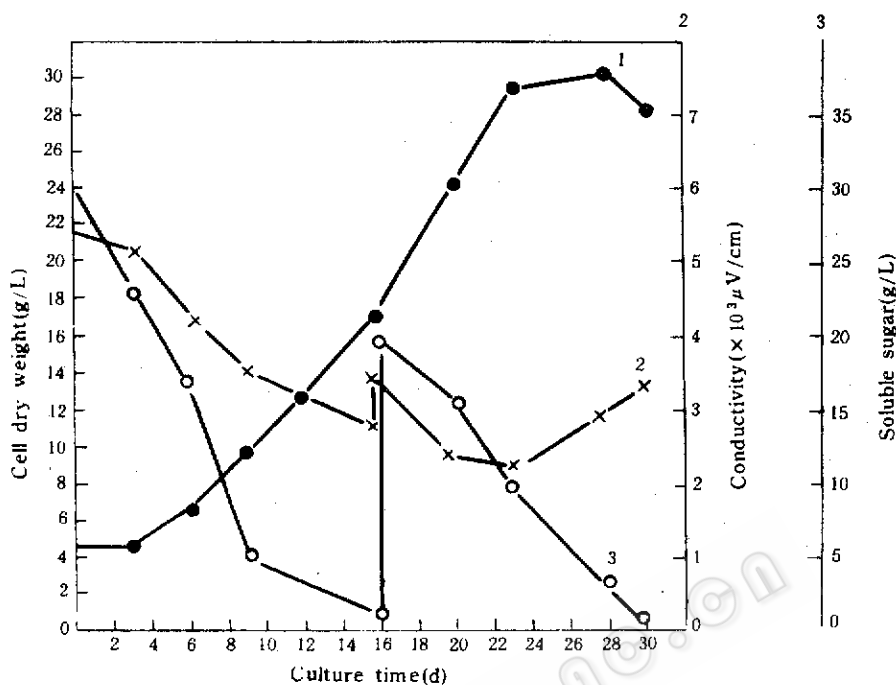


图2 新疆紫草细胞生长与培养液电导率及可溶性糖变化之间的关系
Fig. 2 Relationship between cell growth and changes of conductivity, soluble sugar in cultured medium

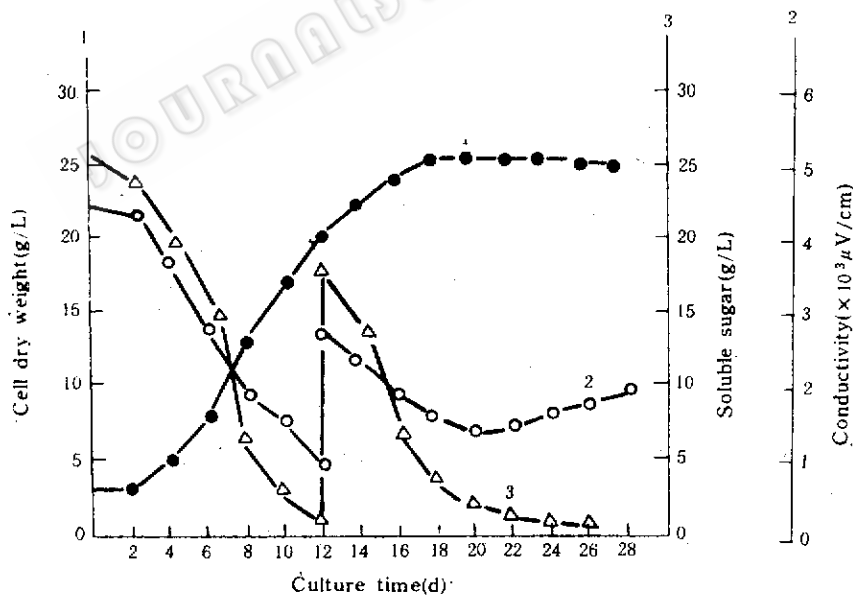


图3 5L外循环气升式反应器新疆紫草细胞生长与培养液电导率、可溶性糖变化曲线
Fig. 3 Relationship between cell growth and changes of conductivity, soluble sugar in 5L outloop bioreactor

生长速率为 $0.8\text{g/L} \cdot \text{d}$, 这说明外循环气升式反应器适合于新疆紫草细胞的大量培养。但由于在培养后期细胞密度相当高, 加上有不少色素外泌到培养液中, 致使培养液粘度较

高，混合及溶氧存在一定困难，因此色素含量比悬浮培养的要低。

从图 3 可以看出，电导率及可溶性糖的变化曲线与悬浮培养细胞相似。可溶性糖在两步培养后期都几乎测不出来，电导率在第 22 天时开始回升，此时细胞生长进入静止期，色素合成与外泌量都迅速增加。因此我们设想通过监测插入反应器中的电导电极所记录的变化情况，并综合其它电极（如 pH 电极，溶氧电极）所记录的变化曲线，为第一步培养何时结束，第二步培养何时收获提供依据，使紫草色素产量尽可能提高。

参 考 文 献

- [1] Panda A K. *Enzyme Micro Technol*, 1989, **11**: 386.
- [2] 叶和春等. 植物学集刊, 第六集, 科学出版社, 1991, p. 163.
- [3] 叶和春等. 植物学报, 1991, **33**: 927.
- [4] Fujita Y *et al.* *Plant Cell Reports*, 1981, **1**: 61.
- [5] Smart N J and Fowler M W. *J Exp Bot*, 1984, **35**: 531.
- [6] Van Handel E. *Analytical Biochemistry*, 1968, **22**: 280.
- [7] Taya M *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1989, **11**: 170.
- [8] 李新明等. 生物工程学报, 1993, **9** (1): 93.
- [9] 侯嵩生等. 生物工程学报, 1991, **7** (1): 92.
- [10] Tanaka H. *Process Biochem*, 1987, **8**: 106.

Large-scale Culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston Cells in 5L Outloop Airlift Bioreactor

Chen Shiyun¹ Hou Songsheng¹ Ye Hechun² Li Guofeng²

Zhang Jian¹ Li Xinming¹ Chen Lu¹ Dong Jiaowang²

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074)¹

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)²

Abstract A two-stage culture method was established to culture *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston cells in suspension and 5L outloop airlift bioreactor. Relationship between cell growth, shikonin formation and changes of conductivity, soluble sugar in cultured medium were studied. At the first stage, cells grew very fast, with the formation of a small amount of shikonin derivatives, and conductivity and soluble sugar decreased sharply. After cultured the cells in the second stage, conductivity decreased at first, and then grew up after a large amount of shikonin derivatives formed and secreted into the medium. By monitoring the changes of conductivity and soluble sugar, cell growth and shikonin derivatives formation were estimated in situ during the large-scale culture of *A. euchroma* cells.

Key words *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, suspension culture, bioreactor culture, conductivity, soluble sugar