

生物反应器中芹菜体胚发生的大规模培养

闭静秀 欧阳藩 刘德华

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

郭仲琛 桂耀林 杨映根

(中国科学院植物研究所形态室 北京 100040)

摘要 通过固体-液体培养方式筛选得到的芹菜胚性愈伤组织悬浮物接种于低剪切力的搅拌通气式反应器中。在MS附加KT 0.5mg/L + CH500mg/L的分化培养基中,24d后获大量正常芹菜体胚。对芹菜愈伤组织培养物在反应器分化培养过程中通气与搅拌速率,pH值的调节控制,反应器中溶解氧(DO)及生长曲线和生长动力学参数均作了研究,以2.0%(鲜重)的接种培养时,较佳的初始pH值为5.3~5.8,控制pH值在5.8上下波动,通气量及搅拌浆速率操作范围分别为600~800cm³/min及40~60r/min,随着不同生长时期的不同需要在此范围内调节。培养24d后,获得正常子叶期体胚为102个/ml,用海藻酸钠包埋后获得的人工种子在无菌条件下的萌发率为64%,接近摇床培养结果。

关键词 芹菜,体细胞胚,生物反应器,大量培养

人工种子技术是当前细胞工程研究中的一个重要课题,在农业生产上的应用也有十分巨大的潜力,通过无性繁殖获得大批高质量的成熟体胚是保证人工种子制作及用于农业生产的必要前提。应用生物反应器进行体胚发生大规模悬浮培养研究,正是为了适应这种需要而提出的任务之一。有关在反应器中进行体胚发生的研究工作国内外均起步较晚,在国外,目前已有利用生物反应器成功诱导出苜蓿、胡萝卜、甘薯体胚发生的报道^[1~3],但仍存在体胚变异百分率高,萌发率较低等问题,在国内,有关利用生物反应器来研究体胚大批量生产的工作还未见报道。为了对芹菜体胚发生进一步开展反应器培养的探索^[4~6],我们在对芹菜悬浮培养基础上^[7],又采用生物反应器对反应器剪切力、培养基溶解氧、pH值的调控等操作条件对体胚分化的影响作了系统工作,现将所得结果报导如下。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

所用植物材料为美国芹菜(*Apium graveolens* L.)外植体为无菌苗下胚轴。

1.2 悬浮细胞体系的建立

胚性愈伤组织的诱导与筛选均如前文^[7]。按常规消毒方法将芹菜自然种子经表面

本文于1995年1月3日收到。

消毒后,均匀洒播于固体发苗培养基中($MS + 1.0\text{mg/L GA}_3 + 3.0\%$ 蔗糖 + 0.68% 琼脂)培养一个月后,取下无菌苗下胚轴切成 $5 - 10\text{mm}$ 小段,置于诱导培养基中($MS + 1.0\text{mg/L 2,4-D} + 3.0\%$ 蔗糖 + 0.68% 琼脂),诱导愈伤组织。一个月后,将诱导获得的松散、细粒状愈伤组织挑入液体诱导培养基中,在转速 100r/min 下振荡培养,继代频率为 $8 \pm 2\text{d/time}$,一个月后转入固体诱导培养基中,如此反复多次后,用 80 目筛网过筛,用不含 2,4-D 的分化培养基($MS + 500\text{mg/L}$ 水解酪蛋白 + $0.5\text{mg/LKT} + 500\text{mg/L PRO} + 2.0\%$ 蔗糖)反复冲洗 2-3 次,这样就建立起胚性愈伤组织悬浮体系。

1.3 生物反应器系统

反应器采用英国 LH 发酵设备有限公司生产的 210 系列中 2.0L 机械搅拌罐,罐体总体积为 2.5L,工作体积为 2.0L。控制系统有 5 个控制单元,分别控制搅拌浆转速、温度、溶解氧、pH 值和消泡。其中前 3 个参数为 PID 控制调节,通气用手动控制调节转子流量计,蠕动泵可流加酸、碱、消泡油。自行设计了一个接种罐和一个培养基储备罐,其结构,连接图如图 1:

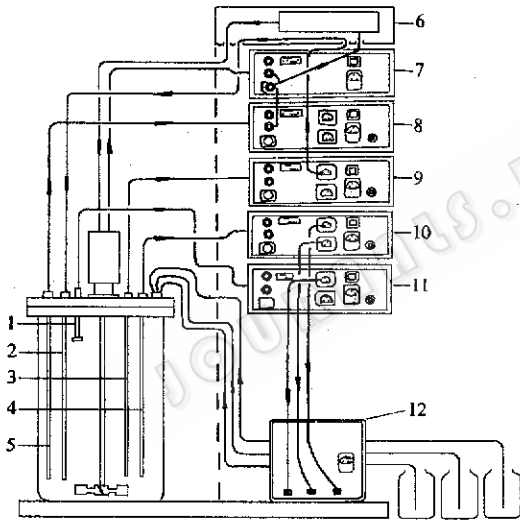


图 1 用于芹菜体胚大规模诱导的反应器系统示意图

Fig. 1 Figure of bioreactor used in celery embryos

1. Foam probe, 2. Heatcr resistance,
3. Thermoneter, 4. pH electrode,
5. Oxygen electrode, 6. Mainframe top box,
7. Speed/Agitation module, 8. Oxygen module,
9. Temperature module, 10. pH module,
11. Foam module, 12. Peristaltic pump

1.4 操作条件

1.4.1 培养对象: 芹菜体细胞胚胎的发生。

1.4.2 接种量: 实消罐内有培养基 1.5L, 种子罐内装有培养基 0.5L 及 50.0g(fresh Weight) 的胚性愈伤组织, 故接种量约为 2.5%。

1.4.3 反应器温度控制: 由内部循环自来水控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 范围, 自来水温度为 $13 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

1.4.4 反应器 pH 值控制: 由蠕动泵流加 0.1mol/L NaOH , 控制范围 $\text{pH}5.3 \sim 6.0$ 。

1.4.5 溶氧值 DO 控制: 根据不同生长阶段氧量不同, 分别调节通气量及搅拌速率, DO 控制范围 40% ~ 60% 氧分压。

1.4.6 搅拌速率及通气量: 搅拌速率 $0 \sim 60\text{r/min}$, 通气量 $600 \sim 800\text{cm}^3/\text{min}$

1.4.7 反应器实验结束指标: 双子叶型胚状体出现。

1.5 体胚的包埋及人工种子的萌发

参考文献[8,9]报道将低温干燥后的子叶时期,长度约为 $7 \sim 12\text{mm}$ 体胚放入 2% 海藻酸钠溶液中摇匀。再用吸管将胚状体逐个吸出,滴入 2% CaCl_2 溶液中, $5\text{min} - 20\text{min}$ 后,捞出,即获得包埋好的人工种子。将制成人工种子播种于灭菌的蛭石和土壤各 1/2 花盆

里,或播种于固体发苗培养基中,隔天观察其萌发情况。

2 结果与分析

2.1 通气,搅拌操作与 DO 值的变化

为了保证细胞生长所需氧气的供给充分,而又不致使剪切力过大,采用不同生长时期,搅拌、通气交替变化和配合的方法,其操作曲线如图 2 所示:

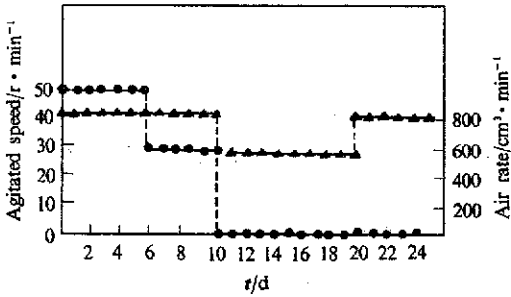


图 2 芹菜体胚在反应器分化时通气和搅拌操作曲线

Fig. 2 Operated curve of air rate and agitated speed

● Curve of agitated speed
▲ Curve of air rate

由图 2 可知,培养刚刚开始时,通量为 $800\text{cm}^3/\text{min}$,搅拌为 $60\text{r}/\text{min}$,以满足培养期细胞分裂快,对氧气需求量大的要求;第 6d 后,将搅拌降至 $40\text{r}/\text{min}$;10d 以后,停止搅拌,通气下调至 $600\text{cm}^3/\text{min}$;第 20d 以后,由于形成胚状体个体及比重的增加,将通气增至 $800\text{cm}^3/\text{min}$ 。

DO 值的变化曲线如图 3 所示:实验结果表明,要维持在 $40\% \sim 70\%$ 的空气饱和度,在细胞刚刚进入反应器时(第 1 至第 3d),搅拌和通气都比较大,这说明此阶段细胞生长快,耗氧量大,DO 值从 60% 下降至 43% ;在第 3d 至 6d,DO 值的下降速度比前 3d 缓慢,说明细胞的繁殖速度减慢,第 6d 将搅拌速度下降至 $40\text{r}/\text{min}$,在第 6d 至第 10d,DO 值维持在较高的值,且下降的趋势越来越慢;在第 10d 时停止搅拌,

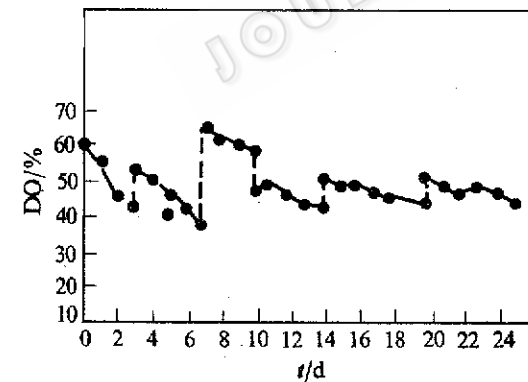


图 3 芹菜体胚在反应器中分化时 DO 值变化曲线

Fig. 3 Curve of the value of DO

●—● Replace media
●····● Decrease air or agitated speed

在第 10d 至第 20d,DO 值除了刚刚加入新鲜培养基时有些较大的波动之外,其变化比较平稳,基本维持在 $43\% \sim 49\%$ 之间;第 20d 之后,在胚胎分化的后期,由于出现鱼雷胚及双子叶胚,胚状体的个体和比重均增大,需氧量上升,将通气增大至 $800\text{cm}^3/\text{min}$,而 DO 值的上升并不明显,这说明在体胚的后熟阶段,耗氧量增加。

2.2 反应器中 pH 值的控制

反应器中流加 $0.1\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 和 $0.1\text{mol}/\text{L}$ NaOH 控制溶液 pH 值,控制范围在 5.3 至 6.0 之间,图 4 是培养过程中的 pH 值的波动范围。

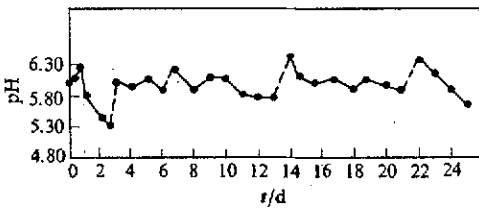
由图 4 可知,在刚刚进入反应器的第 1d,pH 值由初始时的 5.8 上升至 6.0 ,随后的和 2d 至第 3d,pH 值迅速下降,流加的 NaOH 量增加,随着底物的消耗,细胞分裂速度减慢,相应地 pH 值上降速度减慢, NaOH 的流量减少,在第 3d 更换新鲜培养基之前,pH

值稍有上升才开始下降。底物浓度减少至一定范围时。pH 值开始上升,此时,应该更换培养基。

所以说,加入新鲜营养物时,细胞生长快,pH 值下降速度快,当营养物消耗将尽时,细胞生长进入静止期或衰退期时,pH 值不再下降甚至于上升,pH 值的变化规律与细胞的生长代谢过程密切相关。

2.3 底物消耗曲线及生物量的变化

每天从反应器中取样 2ml,测定培养在中残糖含量及生物量结果如图 5 所示:由底物消耗曲线可知,反应器中各种培养条件控制在有利于细胞生长和分化的较佳范围内,底物消耗相应比摇床中消耗快,平均每天 $3 \pm 1d$ 更换一次培养基。在体胚分化后期,底物浓度下降较平缓,说明体胚分化后期,主要是胚胎的成熟和长大,对碳源消耗不大,呼吸不旺盛。相反,较低的底物浓度有利于体胚的成熟和长大。



4 芹菜体胚在反应器中分化时 pH 值变化曲线

Fig.4 The operated value of pH in bioreactor

- The natural change of pH
- Replace media of fluid-add NaOH

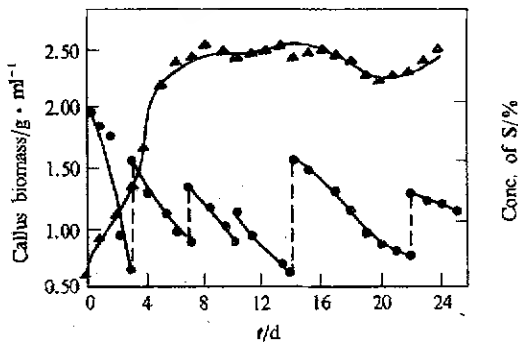


图 5 底物消耗曲线及生物量变化曲线

Fig.5 Substrate depletion and the change of

biomass culture in bioreactor

- Substrate depletion
- Replace media

由反应器中生物量鲜重的增加曲线可知,在培养前期(2~5d),生物量迅速增多,至第 5d、第 6d 时,生物量增加的速度减慢,在第 14d 开始,由心形胚发育至鱼雷胚阶段,生物量增加不太明显。由镜检可知,长细胞及大液泡细胞大多数破裂、自溶,所以,即使在从心形胚发育至鱼雷形胚的物质积累过程中,生物量的增加并不明显。在培养 20d 以后,随着双子叶胚的出现,体胚个体的增大及部分早熟胚的萌发,生物量稍有增多。所以,在生物反应器中通过人为控制条件,有利于细胞的分化。

总之,生物反应器中培养体细胞的分化时,细胞倍增时间为 55.5h,生物量从 50.0g 增至 255.8g,是原来的 5 倍多,比生长速率为 0.30/d。

2.4 在生物反应器中培养与摇床中培养结果比较

与反应器中培养条件相同,即接种量 2.0%(鲜重)平均转速 100r/min,初始 pH 值 5.85,培养过程中不控制 pH 值,一个星期更换一次培养基,用摇床培养直到长出大量双子叶胚,挑选出长度约为 7~12mm 的子叶期胚状体 60 个,分成 3 组,同时也从反应器中挑选相同数目、相同时期及大小的胚状体,参考文献[9]报道中的干燥包埋方法,获得的人工种子在 1/2MS 培养基中萌发,

一个月后统计其萌发率,同时还比较以两种方法培养胚胎发生所需的时间、生物量增加量、细胞生长的倍增时间、比生长速率。结果如表 1 所示。

表 1 摇瓶和罐培养结果的比数

Table 1 Comparison of the result culture in bioreactor and flask shake

Comparison item	Flask shake	Bioreactor
Inoculum/g·ml ⁻¹	2.0×10 ⁻²	5.0×10 ⁻²
Double time/h	104	55.5
Yield of biomass/g(L·d) ⁻¹	1.30	5.03
Defferatuation time of embryos/d	30	25
Normal number of embryos(No./ml)	130	102
Time of replace medium/d	8±2	3±1
Frequency of normal embryos/%	68	46
Frequency of germinate/%	80	64

在反应器中,培养 24d 以后,生物量从 50.0g 增加至 255.8g,增加了 4 倍多,倍增时间为 55.5h,比生长速率为 0.3d⁻¹,所获胚状体数目为 102no/ml,胚状体萌发率为 64%;相比之下,在摇瓶中培养,转速为 100r/min,接种量为 2.0%,培养 30d 后,生物量从 2.0×10⁻²g/ml 增至 5.8×10⁻²g/ml,增加了 2 倍多,倍增时间为 104h,比生长速率为 0.16d⁻¹,所获胚胎数目为 130no/ml,胚状体萌发率为 80%。

所以,在反应器中培养条件控制在有利于细胞生长的较佳范围之内,细胞生长快,所需培养时间短,生物量的增加量大,倍增时间短,比生长速率大,但是,由于在反应器中培养时,剪切力比较大,植物细胞对剪切力很敏感,所以在反应器中,分化的胚胎易变异或受损伤;同时,由于在反应器中培养时,细胞生长快,底物消耗快,继代频繁,也是细胞易丧失分化能力的原因。故在反应器中培养时所获得的胚胎数目较少,胚胎萌发率低。有待于进一步改进反应器搅拌系统。

3 讨 论

通过研究生物反应器中各种培养环境因素对芹菜体胚分化的影响,深入研究了营养条件,搅拌与通气及培养基中溶氧值(DO)对体胚的分化率的影响,控制好这些条件,可提高体胚分化率及降低体胚的变异,为今后体胚的大规模生产提供重要的依据。对人工种子的研究用于生产有着十分重要的意义。

植物细胞对剪切力非常敏感,且耗氧量较小^[10],Hegarg 认为,植物细胞能在反应器中不受损害较好生长的量大液固传质系数为 4.38×10⁵m/s^[11]。我们的实验中搅拌速率范围为 40~60r/min,实验证明,此条件下,供氧充分,细胞几乎不受损害,且体胚分化前期,耗氧大,DO 值下降快,随着体胚个体增大,特别是进入心形胚期后,DO 值几乎维持不变。体胚分化率亦受培养基中 pH 值及底物浓度的影响,较佳的 pH 值范围是 5.3~6.0 之间。培养基中初始 pH 值为 5.8,随着体胚生长分化和底物消耗,pH 值是不断变化的,及时调节反应器中培养基 pH 值以利于体胚的分化。同时底物浓度也影响体胚分化速率,当蔗糖浓度小于 6.0g/L 时,体胚分化受阻,应及时更换新鲜培养基。

本实验中对芹菜体胚在生物反应器中的分化培养作了探索性的研究工作。与摇床培养结果相比分化率及萌发率均稍低些。原因是搅拌通气式反应器机械剪切力较大,使对剪切力敏感时植物细胞容易变异。同时培养条件有待于进一步优化。但是应该认识到利用反应器培养可以一次获得大量正常的体胚,做到省时、省力、省空间。

参 考 文 献

- [1] Mc William A A, Smith S M, Street H E. *Ann Bot*, 1974, **38**: 1077~1088.
- [2] Nomura K, Komamin A. *Plant Physiol*. 1985, **79**: 988~991.
- [3] Daniel J C, Marie E B, Roy C. In: Harrell Woon Young Soh. (ed), *Korean Soc. of Plant Tissue Culture*, 1993, pp. 160~196.
- [4] Redenbaug K J, Fujii D S. In: Green D A, Hackelt W (eds), *Plant Tissue and Cell Culture*, New York, 1986, pp. 476-493.
- [5] Williams L, Collin H A. *Ann Bot*, 1976, **40**: 325~322.
- [6] 金翼义, 郭仲琛, 植物细胞工程应用基础研究新进展, 北京: 学术期刊出版社, 1989, pp. 84~89.
- [7] 闭静秀, 欧阳藩, 郭仲琛, 植物学报, 1996, **38**(6).
- [8] 崔江, 郭仲琛, 桂耀林, 植物学报, 1993, **35**(增刊), 94~100.
- [9] 桂耀林, 郭仲琛主编, 植物体细胞胚胎发生和人工种子. 北京: 科学出版社, 1990, pp. 1~19.
- [10] 俞俊棠, 顾其丰, 叶勤, 等编著, 生物化学工程, 北京: 化学工业出版社, 1990, p. 112~113.
- [11] Hegarty P K N J, Smart M W F. *J Exp Bot*, 1986, **37**: 1911~1920.

Scale-up Culture of Celery Somatic Embryogenesis in Bioreactor

Bi Jingxiu Ouyang Fan Liu Dehua

(*Institute of Chemical Metallurgy, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Gou Zhongchen Gui Yaoling Yang Yinggen

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100040*)

Abstract The suspension of embryogenic callus of celery obtained from subculture and selection by the replacement of solid-liquid medium, were in-oculated to the low-shear stress stir bioreactor (LH Series 210, England). A large number of normal embryos were produced in the differentiation medium (MS+KT0.5mg/L+CH500mg/L) after 24 days culture. In our research work, we mainly researched the operating conditions of bioreactor, it included that: the air flow rate and agitator rate, the value of pH and DO and their controllings, we also described the growth curve and obtained growth kinetics parameters from them. the results were that under the inoculum of 2.0% (Fresh Weight) the better scope of the initial value of pH was within 5.3~5.8, it was controlled about 5.8 by fluid-adding NaOH and HCl during culture; the scope of air flow rate and agitator rate was separately 600~800cm³/min and 40~60r/min. The number of normal embryos was 102No./ml after 24 days culture, the germinated frequency of artificial, wrapped by Na-alginate was about 64%, this result in bioreactor was closed to the result of shake flask.

Key words Celery, somatic embryogenesis, bioreactor, scale-up culture