

新疆紫草细胞的逐级放大培养试验*

陈士云 侯嵩生 张健 李新明

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

叶和春 李国风

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

摘要 采用两步培养法培养新疆紫(*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst)草细胞以生产紫草色素, 建立了从250 ml 摇瓶放大到9 L和25 L内循环气升式反应器的逐级放大培养程序。第一步细胞生长迅速, 并有少量色素合成; 第二步培养以生产色素为主, 细胞生长明显减缓。研究了摇瓶培养时连续继代培养对细胞生长及色素合成的影响, 以选择继代培养2~3代的细胞接入反应器中培养效果较好。9 L反应器培养中通气率为0.4 vvm时可得到较高色素产量, 对25 L反应器中混合及溶氧对细胞生长及色素合成的影响也进行了讨论。

关键词 新疆紫草; 紫草色素; 气升式反应器; 逐级放大培养

Progressive scale-up culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst cells Chen Shi-Yun, Hou Song-Sheng, Zhang Jian and Li Xin-Ming (Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074), Ye He-Chun and Li Guo-Feng (Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044), *J. Plant Resour. & Environ.* 1994, 3(3): 27~31

A two-stage culture method was developed to culture *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst cells, and established a process of progressive scale-up culture from 250 ml shake flask to 9 L and 25 L airlift bioreactors with concentric draft tube. In the first stage, cells grew very fast, with the formation of a small amount of shikonin derivatives. In the second stage, cell growth was relatively slow, and a large amount of shikonin derivatives was produced. The influence of successive subculture in shake flask and different aeration rate of 9 L bioreactor on cell growth and shikonin derivatives formation was examined. The problem of mixing and oxygen supply on cell growth and product formation in 25 L bioreactor were also discussed.

Key words *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst; shikonin derivatives; airlift bioreactor; progressive scale-up culture

利用植物细胞大量培养技术生产有用次生代谢物的研究在近十年内取得很大进展, 已有成功进行工业化生产的先例。由于这一技术具有周期短, 不受地理、环境等因素的限制, 在植物资源的保护及开发利用方面有广阔的应用前景。我们采用自制的内循环气升式反应器进行多种药用植物细胞的放大培养研究, 均取得较好的效果^[5]。本文报道新疆紫草细胞的逐级放大培养结果。

1. 材料与方 法

1.1 材料 选用新疆紫草(*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston)愈伤组织 A-1高产细胞株,该细胞株系中国科学院植物研究所叶和春教授等经多年筛选所得。

1.2 培养方法

1.2.1 细胞悬浮培养 挑选继代培养15天,生长旺盛,色泽鲜红的愈伤组织,接种到装有100 ml AG-7生长培养基⁽¹⁾的250 ml三角锥瓶中,置PYB普通摇床(中国科学院武汉科学仪器厂生产)培养。10天后将摇瓶细胞分成两部分,一部分于无菌条件下称取25 g鲜细胞于100 ml M-9生产培养基⁽²⁾,培养25天后收获,用于测定细胞及培养液中紫草色素的含量。另称取10 g鲜细胞于100 ml AG-7生长培养基中继代培养,如此共培养20代,观察继代培养对细胞生长及色素合成的影响。培养条件为:摇床转速110 r/min,温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$,无光照。

1.2.2 反应器放大培养 采用自制9 L及25 L内循环气升式反应器,其工作体积分别为5.5 L和20 L。采用两步培养法在同一反应器中进行细胞生长与色素合成研究。先将继代培养2~3代,培养10天的悬浮细胞滤去培养液,接入装有AG-7培养基的反应器培养15天后,经设计于反应器内的过滤装置滤掉生长培养基,再换入M-9培养基培养20天后收获。培养过程中定期取样,用于色素合成动态变化的测定。

1.3 培养过程参数测定

1.3.1 细胞生长 采用沉降体积法⁽²⁾测定。

1.3.2 溶氧 耐蒸汽灭菌溶氧电极(FCY-4型,由华东理工大学生物化学工程研究所研制)自动测定。

1.3.3 pH值 pH电极(为中国科学院上海硅酸盐研究所研制)在线显示。

1.3.4 紫草色素含量测定 细胞紫草色素的测定方法见文献1。培养液中紫草色素的测定是先将一定体积培养液经石油醚(沸程 $30\sim 60^{\circ}\text{C}$)萃取至无色,合并萃取液,定容至一定体积后再按文献1的方法测定。

2. 结 果

2.1 悬浮继代培养对细胞生长及色素合成的影响

在以前的研究中我们观察到,新疆紫草细胞在连续悬浮继代培养4~5代后培养液即变为褐色,培养细胞颜色也变深而不能继代培养下去。这为进入反应器放大规模培养时提供大量高质量的种子细胞带来一定困难,为解决这一问题,我们从掌握悬浮继代每次间隔时间和培养基的配制等方面进行了探索,结果可使细胞连续继代培养达20代以上,每一代细胞生长及色素合成结果见表1。

从表1可以看出,长期连续继代培养对细胞生长影响不大,细胞所含色素量也基本保持稳定,但外泌到培养液中的色素含量随着继代次数的增加下降较多。因此选择培养2~3代的悬浮细胞作为种子接入反应器中放大较好。

表1 连续继代培养对新疆紫草细胞生长与色素合成的影响

Tab 1 Effects of successive subculture on cell growth and pigment formation of *Arnebia euchroma*

继代次数 Subculture time	细胞干重 Cell dry weight (g/flask)	细胞色素量 Pigment in cell (mg/flask)	培养液色素量 Pigment in medium (mg/flask)	总色素量 Total pigment (mg/flask)
1	1.98	215.2	46.5	261.7
2	2.05	223.6	64.3	287.3
3	2.36	256.8	113.0	369.8
4	2.38	267.2	95.5	362.7
5	2.36	263.8	64.0	327.8
10	2.15	22.5	59.8	285.4
15	2.19	227.3	31.7	259.0
20	2.18	225.6	33.7	259.3

2.2 9 L 反应器培养结果

采用两步培养法在9 L反应器中进行新疆紫草细胞的培养,结果见图1。第一步培养(0~15天)细胞生长迅速,细胞干重由接种时的2g/L增加到15g/L,生长速率每天达0.9 g/L,细胞所含色素维持在较低水平,培养液中色素量有所增加。第二步培养细胞生长明显减缓,细胞色素含量迅速增加,第30天时达高峰,含量达细胞干重的10%,按收获的细胞干重计,每升可产色素2.2 g;培养液色素含量在第35天时达高峰,因此选择第35天收获可得到最高色素产量达2.3 g/L,与摇瓶培养最高接近4 g/L比较,色素产量有较大幅度的下降。

由于气升式反应器是通过通气来提供细胞生长所需的氧,并起到混合的作用,因此在不同通气率下植物细胞的生长及次生产物的合成也会受到较大影响^[6,7]。为此,我们比较了在3种不同通气率下9 L反应器细胞生长与色素合成情况。从表2可以看出,通气率过高或过低,对细胞生长及色素合成均有不利影响。据此我们设计的9 L反应器在培养新疆紫草细胞时,通气率控制在0.4 vvm较合适。

表2 不同通气率对新疆紫草细胞生长与色素合成的影响

Tab 2 Effects of cell growth and pigment formation at different aeration rate of *Arnebia euchroma*

通气率 Aeration rate (vvm)	细胞干重 Cell dry weight (g/L)	细胞色素量 Pigment in cell (mg/L)	培养液色素量 Pigment in medium (mg/L)	总色素量 Total pigment (mg/L)
0.2	22.3	2107	67.5	2174.5
0.4	24.2	2378	78.8	2456.8
0.6	18.0	1350	95.2	1445.2

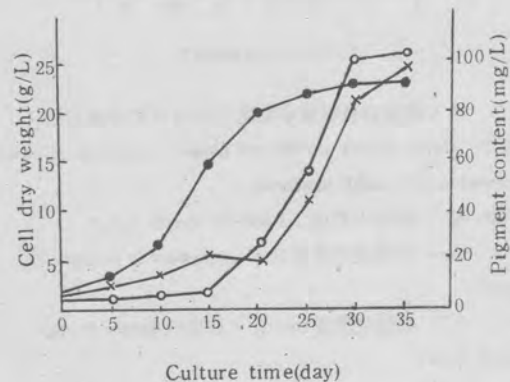


图1 9 L反应器中新疆紫草细胞生长与色素合成曲线

Fig 1 Curve of cell growth and pigment formation of

Arnebia euchroma in 9 L airlift bioreactor

—●—●— 细胞干重(g/L) cell dry weight (g/L)

—○—○— 细胞色素量(mg/g 干细胞) pigment in cells
(mg/g D. W)

—×—×— 培养液色素量(mg/L) pigment in medium
(mg/L)

2.3 25 L 反应器培养结果

图 2,3 分别是 25 L 气升式反应器中细胞生长、色素合成和溶氧、pH 值的变化曲线。其最高细胞产量为 20 g/L, 细胞色素含量为 6.5%, 培养液色素含量为 80 mg/L, 总色素产量为 1.38 g/L, 与 9 L 反应器培养结果比较, 25 L 反应器细胞生长及色素产量均较低。在细胞生长阶段, 溶氧水平下降很快, 色素合成阶段又有所回升, pH 值的变化比较稳定, 培养初期略有上升, 随后下降, 到 15 天时达最高值, 第二步培养开始后则缓慢下降。

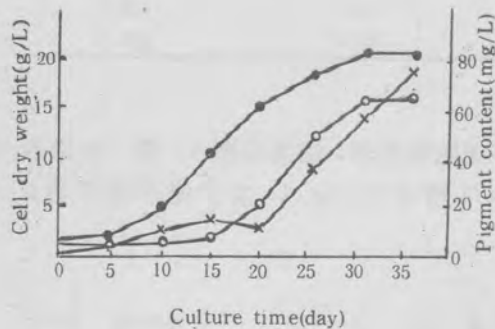


图 2 25 L 反应器新疆紫草细胞生长与色素合成曲线

Fig 2 Curve of cell growth and pigment formation of *Arnebia euchroma* in 25 L airlift bioreactor

- 细胞干重(g/L) cell dry weight (g/L)
- ×—×— 培养液色素量(mg/L) pigment in medium (mg/L)
- 细胞色素量(mg/g 干细胞) pigment in cells (mg/g D.W)

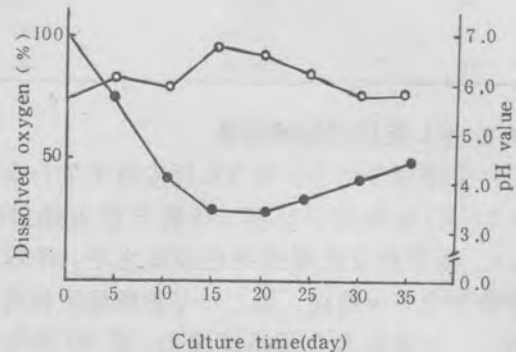


图 3 25 L 反应器中溶氧及 pH 值变化曲线

Fig 3 Curve of dissolved oxygen and pH value in 25 L airlift bioreactor

- pH value
- 溶氧(%) dissolved oxygen (%)

3. 讨 论

根据植物细胞的特点, 研制适合于植物细胞大规模培养的生物反应器, 是植物细胞大量培养技术走向工业化生产所要解决的重要问题之一。气升式反应器与传统的机械搅拌反应器相比, 具有结构简单, 运行成本低, 容易操作等优点。特别是对于剪切应力较敏感的植物细胞而言, 液体有规则环流大大降低了流场对细胞的剪切损害。本文结果也表明, 新疆紫草细胞在自制的气升式反应器中生长迅速, 最高生物量可达 20~25 g/L。

在从摇瓶逐级放大到反应器的培养过程中, 紫草色素的含量有较大幅度的下降, 其原因是多方面的。由于紫草细胞培养采用的是两步培养法, 细胞生长与色素形成两个阶段是相对独立又相互关联的。如果由于操作上的原因, 第一步培养结束后更换生长培养基不彻底, 致使仍留有少量生长培养基在反应器中, 其中所含的 NH_4^+ 等则会抑制紫草色素的合成^[4]。我们在摇瓶培养阶段也观察到, 如果在摇瓶培养结束后采用无菌水冲洗细胞 2~3 次后再加入生产培养基, 其色素产量比未经无菌水冲洗的要高。此外, 在反应器培养后期, 由于细胞密度相当高, 超过 20 g/L, 培养液的粘度也相应增大, 致使反应器的非搅拌区域不断增加, 导致溶

氧及混合性能欠佳, 这也会影响到产物的合成^[8]。因此有必要对现有反应器加以适当改进, 如增加慢速搅拌装置以及改进罐底结构, 以解决逐级放大培养过程中色素含量降低的问题。

参 考 文 献

- 1 陈士云, 侯嵩生, 叶和春等. 1994; 生物工程学报 10(1): 81~86.
- 2 侯嵩生, 陈士云, 李新明等. 1991; 武汉植物学研究 9(4): 387~390.
- 3 叶和春, 尹作鸿, 李国凤等. 1991; 植物学报 33(1): 927~931.
- 4 Fujita Y, Y Hara, T Ogino et al. 1981; *Plant Cell Reports* 1: 59~60.
- 5 Hou S S, S Y Chen. 1992; 6th International Symposium on Chinese Drug, Gifu, Japan, pp 12~17.
- 6 Spteler H. 1985; *Appl. Microb. Biotechnol.* 23: 1~4.
- 7 Smart N J, M W Fowler. 1981; *Biotechnol. Lett.* 3: 171~176.
- 8 Tanaka H. 1981; *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1203~1228.

(责任编辑: 盛国英)

国际植物园协会亚洲分会(IABG-AD)第二次会议 在印度尼西亚召开

国际植物园协会亚洲分会第二次会议于 1994 年 6 月 6~9 日在印度尼西亚塞尔彭(Serpong, 距首都雅加达 45 km)召开。会议代表约 50 人, 其中印尼本国代表 30 多人, 国外代表 16 人。国外代表中日本 10 人, 中国 5 人(其中 3 人迟到)、斯里兰卡 1 人。印尼国家科学院生物研究所领导出席了开幕式。在为期 1 天的科学报告活动中所作的 8 个学术报告, 如斯里兰卡国家植物园主任苏米特拉拉克的“斯里兰卡国家植物园昨天今天和明天的任务”, 印尼茂物标本馆 M. A. Rifai 的“彩虹山生物多样性教育植物园的概念设计”, Elizabeth A. Widjaja 的“Perhutani 竹类种质园的建立”, Harini Sangat 等的“民族化妆品植物园——长期利用的多样原料来源”等均涉及到植物园工作者当前所关注的问题, 受到代表们的欢迎。会议期间参观了举世闻名的印尼茂物植物园(Bogor BG)、契波达斯高山植物园(Tjibodas Mountain Garden)和印尼国家科学院所在地的塞尔彭植物园(Serpong BG)等。在 9 日下午的闭幕式上, 国际植物园协会主席 K. Iwatsuki 教授作了会议总结, 肯定了会议取得的成功。8 日晚召开了国际植物园协会亚洲分会理事会会议, 由 K. Iwatsuki 教授作理事会工作报告, 选出了新的理事会, 并讨论了会后的任务。

新理事会的组成为:

- | | |
|----|--------------------------------------|
| 主席 | 苏米特拉拉克(D. B. Sumithraarachchi, 斯里兰卡) |
| 秘书 | Masahiro Kato (日本) |
| 理事 | Tae-wook Kim (韩国) |
| | 许再富 (中国) |
| | 胡启明 (中国) |
| | 贺善安 (中国, 前任 IABG-AD 主席) |
| | Kiyomi Hashimoto (日本) |
| | W. K. Tan (新加坡) |
| | Thawathai Santisuk (泰国) |
| | Weerachai Nanakorn (泰国) |
| | Mien A. Rifai (印尼) |
| | Ir. Suhirman (印尼) |
| | B. D. Sharma (印度) |
| 编辑 | 顾 烟 (中国) |
| | M. Kato (日本) |
| | Thawatchai Santisuk (泰国) |

今后 2 年内, 将继续加强亚洲植物园和植物园组织间的双边合作。IABG-AD Newsletter 将继续出版, 并将筹备出版国际植物园协会的出版物。

(顾 烟)