

搅拌式生物反应器悬浮培养水母雪莲细胞的研究

黄 艳^{1,2} 赵德修^{1*} 吕东平¹ 颜 芳¹ 李佐虎² 陈洪章² 赵 乔³

¹(中国科学院植物研究所 北京 100093)

²(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)

³(中国农业大学 北京 100094)

摘 要 应用 2L 通气搅拌式生物反应器一步批式培养水母雪莲细胞。采用倾斜式搅拌桨代替透平桨,研究了搅拌转速、通气量和接种量对细胞生长和黄酮合成的影响,发现在 75r/min、700 ~ 1000L/min 和 4.0 ~ 5.0g DCW/L 接种量下细胞生长和黄酮合成比较好。经过 12d 培养细胞干重达 13.8g DCW/L,黄酮产量 416mg/L,黄酮含量占细胞干重的 3.0%。水母雪莲细胞生长及黄酮合成的进程表明,黄酮积累与细胞生长呈正相关。对细胞聚集体分布的研究发现,流变压力使细胞聚集体分裂,使反应器中细胞生长受到影响,黄酮产量较摇瓶中降低。

关键词 水母雪莲, 生物反应器, 植物细胞, 悬浮培养, 黄酮

中图分类号 Q5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0561-05

利用植物细胞大规模悬浮培养为生产植物有用代谢产物提供了有效的生产方法。但由于植物细胞固有的性质如细胞容易聚集、细胞分化、细胞剪切力敏感性、代谢产物与细胞生长的不一致性以及代谢途径的复杂性使扩大化培养受到限制。迄今为止,只有为数不多的植物细胞培养实现了工业化。如二步法生产紫草宁^[1]和迷迭香宁酸^[2](Rosmarinic acid)以及肉桂酰丁二胺^[3](Cinnamyl putrescines)。因而需对扩大化培养过程中细胞生长、代谢产物形成动力学以及物理条件如剪切力对细胞代谢产物合成的影响进行研究。

水母雪莲(*Saussurea medusa Maxim*)为我国传统的中草药,含生物碱、黄酮等多种有效成分。本文采用 2L 通气搅拌式生物反应器培养水母雪莲细胞,此反应器具有倾斜式搅拌桨和微孔气体喷射器,因而比较适合植物细胞培养。本文研究了该细胞在通气搅拌式生物反应器中的培养特性,分析了流体压力对细胞聚集体的影响,初步探讨了反应器内黄酮产量下降的原因,为该细胞大规模悬浮培养奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 植物细胞培养和培养基

材料选用水母雪莲(*Saussurea medusa Maxim*)愈

伤组织红色系,本实验室经筛选而得。悬浮培养基采用 Murashige 和 Skoog(MS)^[4]培养基附加 0.5mg/L 6-苄基腺嘌呤(BA)、2mg/L 萘乙酸(NAA)、30g/L 蔗糖、10g/L 葡萄糖。高压灭菌前用 1mol/L KOH 调 pH 至 5.8 ~ 6.0。将约 3g 的愈伤组织转入装有 30mL MS 培养基的 100mL 三角瓶中,经过 3 ~ 4 代的悬浮培养得到稳定的悬浮培养体系。培养过程中采用连续白光照射,室温控制在 25 ± 2℃,摇床转速 100r/min,每 10d 传代 1 次。500mL 三角瓶用于反应器的接种,装液量为 150mL。

1.2 细胞生长测量

细胞干、鲜重:细胞真空抽滤,用蒸馏水洗涤,得细胞鲜重(FW)。再放入 60℃烘箱中干燥至恒重,称量所得细胞干重(DCW)。

1.3 存活率

采用染色排除法测量膜完整性。取少量培养物,用 1% 的酚藏红花染色 30s,显微镜下观察,被酚藏红花染成红色的是死细胞,不被染色的是活细胞,计数大约 800 个细胞(100 ×)。

1.4 可溶性糖分析

可溶性糖的测定采用蒽酮法^[5]。总糖:取 0.1mL 样液,混合 3mL 蒽酮试剂,90℃加热 15min,于紫外可见光分光光度计(Hitachi 557)在 620nm 测光

收稿日期:2001-01-15,修回日期:2001-04-10。

基金项目:国家自然科学基金(39570862)项目资助。

* 通讯作者。Tel:86-10-62591431-6201; Fax:86-10-62590833; E-mail: zhaodx@ns. ibcas. ac. cn

密度,根据标准曲线得出糖含量。蔗糖:取 0.05 ~ 0.1mL 样液,加 0.1mL 30% KOH,沸水浴 10min,冷至室温,加入 3mL 蒽酮,40℃ 10 ~ 15min,在 620nm 下测光密度。

1.5 聚集体分布测定

将细胞聚集体通过一系列不同尺寸的不锈钢筛子,称量不同部分细胞聚集体干重(W_i)。不同部分聚集体所占百分比(Frequency) = 各部分细胞干重(W_i)/总细胞干重($\sum W_i$) \times 100%。

1.6 总黄酮含量测定^[6]

将 5g FW 细胞用 20mL 95% 的乙醇室温振荡 24 h,过滤,吸取滤液 0.5mL,加重蒸水至 5 mL,再加 0.3 mL 5% NaNO_2 ,摇匀,放置 6 min,加 0.3 mL 10% AlCl_3 ,摇匀,放置 6 min,再加 4 mL 4% NaOH ,定容至 10 mL,放置 10 min,510 nm 下测光密度。测定含量时用芦丁标准品作对照品。

1.7 生物反应器

采用 2 L 机械搅拌式生物反应器(LH Series 210, England 公司)悬浮培养水母雪莲细胞,工作体积是 1.4 L。空气由空气泵通过转子流量计经由空气滤器(Gelman, ACRO 50 0.2 μm)进入反应器(图 1)。操作前反应器在 121.0℃ 高压灭菌 35 min,培养基 121.0℃ 18 min 单独灭菌。待反应器冷至室温,种子和培养基由顶部接种口倾倒入反应器内,设置好通气速率和搅拌转速,温度自动控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,外部用 1 只 40W 白炽灯及荧光灯连续光照。反应器构型见表 1。

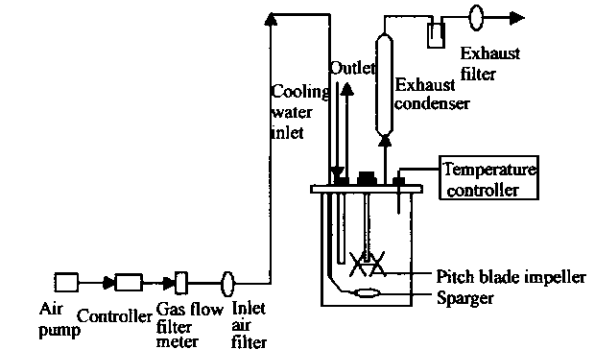


图 1 反应器系统

Fig.1 The configuration of the stirred bioreactor system

2 结果与讨论

2.1 搅拌型的改进

由于植物细胞尺寸较大并具有脆弱的细胞壁,对剪切伤害较敏感,因而桨型的选择很重要。本实验采用 4 片倾斜式搅拌桨代替传统的透平桨。在

表 1 通气搅拌式反应器构型

Table 1 Dimensions of aeration-agitated bioreactor system

Bioreactor	Dimensions
Diameter	11 cm
Height	20 cm
Total volume	2 L
Working volume	1.4 L
Impeller diameter	5.5 cm
Impeller width	6.0 cm
Baffle plate no.	0
Sparger	$\Phi 0.5 \text{ mm} \times 10$

75r/min(末端速度 21.58cm/s)时,接种后并未观察到雪莲细胞受到剪切力的显著伤害。流体切变力是由流体离开搅拌桨从切向到法向速度梯度变化产生的。这种倾斜叶片式搅拌器的特点是增大了搅拌桨宽度 W 与直径 D 之比(1.09,透平桨 0.40)和叶片与轴呈 30 度倾斜。当 W/D 增加,速度纵剖面变得迟缓,速度梯度变化减小^[7]。实验证明采用倾斜式搅拌桨培养,细胞和黄酮产量可分别达 13.8g DCW/L 和 416mg/L,高于用透平桨培养(分别是 12.5g DCW/L 和 312mg/L)。

2.2 搅拌转速和通气对细胞生长及黄酮合成的影响

植物细胞培养是一个需氧的过程,因此在放大过程中提供充足的氧对植物细胞的生长和代谢非常重要。在接种量(DCW)为 2 ~ 3g/L、通气量 700L/min 时,分别采用不同搅拌转速培养水母雪莲细胞。如表 2 所示,转速在 75r/min 时细胞及黄酮产量达到最

表 2 不同搅拌转速下细胞生长和黄酮产量的比较

Table 2 Cell growth and flavonoids production at different agitator speed

Agitator speed/(r/min)	50	65	75	85
Specific growth rate/(d^{-1})	0.21	0.25	0.26	0.25
Dry weight/(g/L)	7.5	9.7	11.4	9.2
Doubling time/d	3.2	2.7	2.7	2.7
Flavonoids production/(g/L)	0.20	0.27	0.32	0.25
Flavonoids content/($\mu\text{g/g}$)	26.7	27.8	28.1	27.2

高,分别为 11.4g/L 和 0.32g/L。与微生物相比,植物细胞有较低的氧需求,最大比摄氧速率一般为 $0.2 \sim 0.6 (\text{mmol}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{h}^{-1})$ ^[8]。但由于植物细胞易形成聚集体,高密度培养下培养液粘度增大,影响了反应器内氧的传质和吸收,增大搅拌转速和通气量可以增加容积氧传质系数 $K_L a$,加强溶氧^[9],但过高搅拌转速和通气量反而使产量降低。Smart 和 Fowler 在对长春花的培养中也发现类似规律^[9]。搅拌和通气

一方面促进了传质,但另一方面会增加剪切力对植物细胞的损害,同时造成培养体系内二氧化碳和乙烯等对细胞生长代谢有利气体的丧失和导致泡沫大量生成,从而抑制植物细胞生长和代谢产物合成^[10]。如何协调这两方面是优化反应器培养的重要方面。

2.3 接种量对细胞和黄酮产量的影响

我们对不同接种量(图 2)的研究发现,细胞接种量(DCW)在 4~5g/L 的范围内,细胞生长良好,在这一范围内黄酮产量随接种密度增大明显增加,细胞内黄酮含量提高。在低密度(<1.5g/L)培养时细胞增长几乎停止。而当接种量大于 6g/L,细胞产量和黄酮产量下降较快,细胞出现褐化死亡。这些结果说明植物细胞培养有一个生理问题,在一定密度之上细胞生长才能启动。另一方面高密度培养下培养液粘度增大,引起氧和营养物质的传输受限,细胞会因缺乏养料而衰竭^[11]。

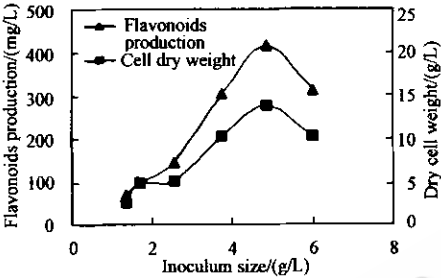


图 2 细胞干重和黄酮产量随接种量的变化
Fig.2 Changes of dry cell weight and flavonoids accumulation as a function of inoculum size

反应器内细胞接种量高于摇瓶(2.5~4.0g/L)。由于通气的影响,植物细胞在反应器中容易粘附成团浮在液面或粘在器壁、搅拌轴上,这些粘附的细胞中黄酮含量在每克干细胞中只有 19.3mg/g,明显低于溶液中的细胞。摇瓶中培养并不发生细胞的粘附,这可能是摇瓶培养高于反应器的原因之一。

2.4 雪莲细胞生长和黄酮生物合成动态

图 3 所示的是水母雪莲细胞在 2L 机械搅拌式反应器和在摇瓶中的培养结果,搅拌转速和通气量在培养期间维持在 75r/min 和 700~1000L/min。从图 3 可以看到,细胞经过 4d 的延迟期后,第 4~9d 进入对数生长期,12d 时细胞生长达到高峰,随后进入静止期。黄酮在细胞中的积累发生在第 5 天前(图 3(B)、图 4),与细胞生长基本平行。可见,黄酮积累与细胞分裂正相关,与紫草宁及其衍生物的生物合成发生在细胞停止生长的静止期不同^[12]。在摇瓶和反应器中细胞生长速率分别是 0.36d⁻¹和

0.18d⁻¹,最高黄酮含量是 35.1mg/g 和 30mg/g,最大细胞浓度达到 23.3g/L 和 13.8g/L,黄酮产量分别是 789mg/L 和 416mg/L。摇瓶中细胞及黄酮产量比反应器高出 40.5% 和 47.5%。

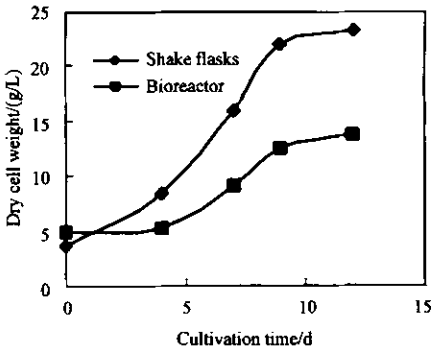


图 3(A) 摇瓶及反应器中细胞的生长
Fig.3(A) Time course of cell growth in shake flasks and in bioreactor

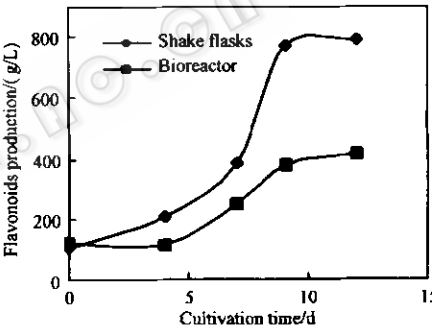


图 3(B) 摇瓶及反应器中黄酮的合成
Fig.3(B) Time course of flavonoids production in shake flasks and in bioreactor

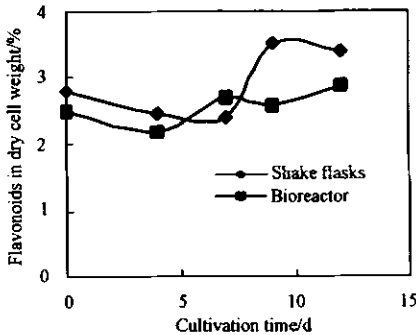


图 4 干细胞中黄酮含量随培养时间的变化
Fig.4 Variation of flavonoids content in dry cell in shake flasks and in bioreactor in the course of culture

从细胞对糖的利用可以看到(图 5),在反应 0d 初始蔗糖浓度有所降低,这是因为小部分初始蔗糖经过高温灭菌能分解为葡萄糖和果糖^[13]。培养开

始后蔗糖浓度迅速下降,到第3天只有约5g/L,第5天后培养基中已检测不到蔗糖,葡萄糖在3d后才得到快速利用。培养基中蔗糖浓度的迅速降低在许多植物中被观测到,如白蓬草(*Thalictrum rugosum*)^[10]。Enaksha^[14]认为细胞在其表面分泌或含有过多的转化酶(Invertase),导致蔗糖分解产生的己糖大于细胞所能吸收的。

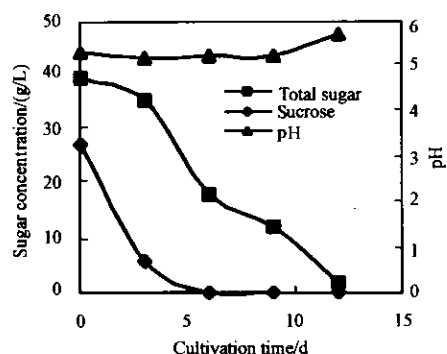


图5 培养过程中糖及pH变化

Fig.5 Time course changes of sugar and pH during a batch culture in bioreactor

2.5 聚集体分布

植物细胞的一个重要特点是形成聚集体。反应器内聚集体分布随培养进程而发生变化(图6):1~2mm的聚集体含量在培养后期明显增加,而2~3mm的聚集体含量却相应减少。这种聚集体分布

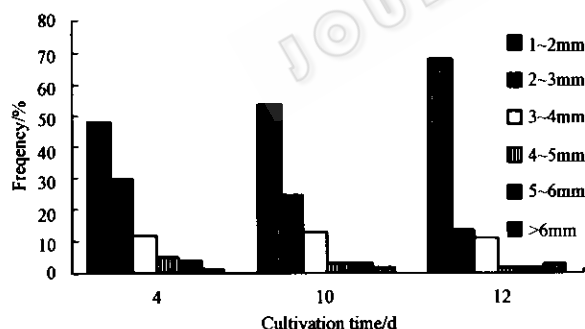


图6 细胞聚集体分布柱型图

Fig.6 Time course changes of cell aggregates size distribution in bioreactor

与Toshiya^[15]报道的长春花细胞经反应器培养的分分布相似:细胞聚集体分布集中在较小尺寸。通过比较12d时摇瓶和反应器细胞聚集体分布发现(图7),摇瓶中1~2mm的聚集体含量低于反应器,其它部分则高于反应器。由于聚集体大小与黄酮合成密切相关(表3),2~3mm和3~4mm的聚集体中黄酮含量较其它部分高,可以认为反应器培养产量下降的部分原因可能是由于剪切力作用使细胞聚集体分

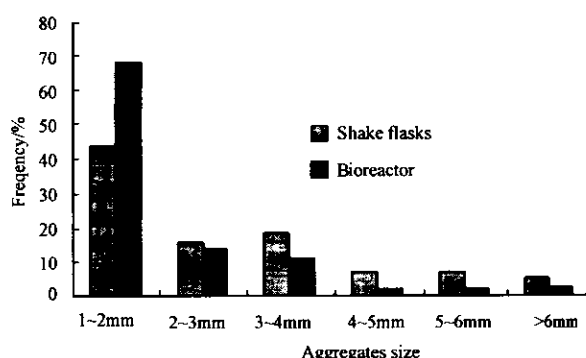


图7 12d时摇瓶及反应器中聚集体分布

Fig.7 Cell aggregates size distribution at 12d in shake flasks and bioreactor

表3 12d时不同部分聚集体的黄酮含量

Aggregates size/mm	1~2	2~3	3~4	4~5	5~6	>6
Flavonoids content in dry cell/(mg/g)	32.1	39.2	36.9	33.6	32.7	27.0

裂,不利于细胞生长和黄酮合成。根据KeBler^[16],反应器内聚集体主要受到涡流影响。反应器内存在高浓度的小尺寸涡流,这意味着当聚集体被迫从一个涡流运动到另一个涡流时,其运动方式发生的迅速改变会对细胞聚集体施加显著压力而破坏聚集体。虽然流变压力引起了反应器与摇瓶培养聚集体尺寸分布的差异,但细胞存活率在培养过程中维持在80%以上。Pradyumna^[17]认为流变压力对植物细胞的影响作用并不是导致细胞死亡,而是引起细胞的低度裂解(Sublytic),使细胞的再生能力、膜完整性、酶活性降低。

植物细胞培养在放大过程中往往产量下降,次级代谢产物合成能力降低^[3,18],其原因可能是(1)通气和搅拌引起的流体压力对细胞聚集体产生影响,致使产量降低;(2)由于通气的影响使反应器体系的气相成分与摇瓶不同,过量的通气导致有利于细胞生长和代谢的气体如二氧化碳、乙烯的丧失;(3)蛋白质及多糖物质的分泌产生大量泡沫,细胞容易粘附成团聚集在液面、器壁和搅拌轴上影响传质。因此为了提高细胞和黄酮产量,需从水母雪莲细胞生物合成调控和反应器构型设计两方面进行研究,调整培养基成分,促进黄酮合成;改进反应器构型,减小剪切力,并建立反应在线控制系统,使各种外部条件得到良好控制。经过这两方面的研究,以实现植物细胞大规模高密度(大于18g/L)的悬浮培养。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Noguchi M, Matsumoto T, Hirata Y *et al*. Improvements of growth rates of plant cell cultures. In: *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Springer-Verlag, Berlin, 1977, pp. 85 ~ 94
- [2] Ulrich B, Wiesner W, Arens H. Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumen*. In: *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-verlag, 1985, pp. 293 ~ 303
- [3] Schiel O, Berlin J. Large scale fermentation and alkaloid production of cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1987, 8: 153 ~ 161
- [4] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473
- [5] XUE Y L(薛应龙). Plant Physiology Laboratory Manual (植物生理学实验手册). 1st, Shanghai: Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1985, pp. 136 ~ 138
- [6] Sha S Y(沙世炎). The effective analysis method for traditional Chinese medicinal herbs(中草药有效成分分析法), Beijing: People Hygiene Press(人民卫生出版社), 1982, pp. 232
- [7] Hooker B S, Lee J M, An G. Cultivation of plant cells in a stirred vessel: Effect of impeller design. *Enzyme Microb Technol*, 1989, 53: 744 ~ 751
- [8] Ronald A T, Murray M Y. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell Tiss Org Cul*, 1991, 24: 139 ~ 158
- [9] Smart N J, Fowler M W. Effect of aeration on large-scale cultures of plant cells. *Biotechnol Lett*, 1981, 3: 171 ~ 176
- [10] Kim D L, Pederson H, Chin C K. Cultivation of *Thalictrum rugosum* cell suspension in an improved airlift bioreactor: Stimulatory effect of carbon dioxide and ethylene on alkaloid production, 1991, 38: 331 ~ 339
- [11] Tanaka H. Oxygen-transfer in broths of plant cells at high density. *Biotech and Bioeng*, 1982, 24: 425 ~ 442
- [12] DONG J W(董教望), YE H C(叶和春), WU X(吴新) *et al*. Studies on cell suspension culture and fermentation culture in *Arnebia Euechroma*. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 1993, 35: 57 ~ 61
- [13] Singha s, Oberly G H, Townsend E C. Changes in nutrient composition and pH of culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1987, 11: 209 ~ 220
- [14] Enaksha R M W, Richard N A. Taxus cell suspension cultures: Optimizing growth and production of Taxol. *J Plant Physiol*, 1994, 144: 183 ~ 188
- [15] Toshiya T, Minoru S, Shintaro F. Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus Tinctorius* in a stirred tank reactor. *J Chem Eng Jpn*, 1993, 27: 315 ~ 466
- [16] KeBler M, Hens J G, Hoopen T *et al*. The effect of the aggregate size on the production of ajmalicine and tryptamine in *Catharanthus roseus* suspension culture. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 30: 18 ~ 25
- [17] Pradyumna K N, Eric H D. Shear sensitivity of plant cells in suspensions: Present and future. *Appl Biochem and Biotech*, 1995, 54: 109 ~ 131
- [18] Schlattmann J E, Nuutila A M, Gulik V W M *et al*. Scaleup of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotech and Bioeng*, 1993, 41: 253 ~ 262

Studies on the Cell Suspension Culture of *Saussurea medusa* in a Stirred Tank Bioreactor

HUANG Yan^{1,2} ZHAO De-Xiu¹ LU Dong-Ping¹ YAN Fang¹ LI Zuo-Hu² CHEN Hong-Zhang² ZHAO Qiao³

¹(Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

²(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

³(China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The cell suspension culture of *Saussurea medusa* in a 2L aerated and agitated bioreactor with a four-pitch-blade impeller was investigated. The effects of agitation speed, aeration and inoculum size on cell growth and flavonoids production were studied and it was found that cells had optimum growth and flavonoids production when cultivated at 75r/min, 700 ~ 1000L/min and an inoculum of 4.0 ~ 5.0g /L. A high cell biomass of 13.8g/L and flavonoids production of 416 mg/L were achieved after 12 days of cultivation. Time course study revealed that flavonoids biosynthesis was growth-associated. The studies on aggregates size distribution in the bioreactor showed that the aggregates break-up caused by hydrodynamic stress might adversely affect cell growth and lead to significant reduction of cell biomass and flavonoids production.

Key words *Saussurea medusa*, bioreactor, suspension culture, flavonoids

Received: January 15, 2001

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China(39570862).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62591431-6201; Fax: 86-10-62590833; E-mail: zhaodx@ns.ibcas.ac.cn