

霍山石斛类原球茎二步法培养细胞生长和多糖合成的动力学研究 Study on Kinetics of Two-stage Cultivation of Protocorm-like Bodies from *Dendrobium huoshanense* for Cell Growth and Synthesis of Polysaccharides

魏 明, 姜绍通*, 罗建平

WEI Ming, JIANG Shao-Tong* and LUO Jian-Ping

合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009

School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

摘 要 磷是调控类原球茎细胞生长和多糖积累的有效因素。为了获得较高的多糖产量, 根据霍山石斛类原球茎生长和多糖积累的动力学特性, 提出了二步培养方式, 采用了补料策略, 研究了其培养过程的动力学特性, 并建立了相关模型。结果表明, 采用二步法培养, 生物量从 28.7g DW/L 提高到 44.2g DW/L, 多糖产量从 1.86g/L 提高到 5.22g/L, 多糖含量从 6.4% 提高到 11.9%。建立的模型基本反映了类原球茎生长和多糖积累的动力学机制。

关键词 霍山石斛, 类原球茎, 二步法培养, 动力学, 多糖

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)01-0079-06

Abstract Phosphate is an effective factor in the regulation of cell growth and accumulation of polysaccharides. The method for higher polysaccharide production has been obtained through feeding cultivation. The two-stage cultivation was proposed according to the characteristic of cell growth and the accumulation of polysaccharides in the suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense*. A kinetic model was developed to describe the cultivation process. The results indicate that the production of biomass and polysaccharides increases from 28.7g DW/L and 1.86g/L to 44.2g DW/L and 5.22g/L, respectively, and the content of polysaccharides increases from 6.4% to 11.9%. With the evaluated model parameters, the model appears to provide a description for the cultivation process.

Key words *Dendrobium huoshanense*, protocorm-like bodies, two-stage cultivation, kinetics, polysaccharides

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C.Z.J.cheng)属于兰科石斛属,是名贵中草药,产于安徽霍山及临近地区,其含有水溶性活性多糖、生物碱等化学成分^[1],具有滋阴、清热、生津、润肺、止咳、清音明目等功效^[2]。现代药理研究证明,石斛的药用活性强弱与多糖含量高低相关,石斛多糖具有调节机体免疫

功能^[3]、显著提高机体杀伤肿瘤细胞的能力^[4]。查学强等^[5]观察到霍山石斛类原球茎总多糖能显著促进小鼠脾细胞产生干扰素 IFN- γ 和腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 TNF- α 。由于霍山石斛自然繁殖能力很低,在自然条件下生长非常缓慢、生长周期长,加上人工大量采集,其自然资源已濒临灭绝。类原

Received: April 28, 2006; Accepted: September 8, 2006.

This work was supported by the Key Project for Science and Technology Research from Ministry of Education of China (No.03098).

* Corresponding author. E-mail: jiangst@hfut.edu.cn

教育部科学技术研究重点项目 (No.03098).

球茎是霍山石斛的体细胞胚胎,由分化的细胞构成,可由植株的不同部位诱导产生,具有和植株同样的物质代谢和形态发育潜能^[6]。类原球茎在液体培养中呈分散的颗粒状,容易实现规模化生产^[7],多糖主要存在类原球茎细胞内,用类原球茎合成多糖比细胞培养合成多糖产量更稳定,而且可以用类原球茎来代替原药材^[8]。

细胞培养的动力学研究可以提供细胞生长、营养成分消耗、产物积累等相关信息,对培养过程的优化、代谢产物的调控和扩大培养必不可少。我们在前期的工作中,对固体培养和悬浮培养^[9],对培养基组成^[10]、生长调节剂^[11]以及金属离子^[12]的作用进行了研究。本工作在此基础上,确定了以最佳生长培养基为基本培养基,提出了二步培养策略,通过改变磷酸盐的浓度来调控培养基中碳源流向和多糖的合成,提高多糖含量和产量,并建立了相关动力学模型。根据模型进一步了解悬浮培养过程中类原球茎增殖和多糖积累的内在规律,为扩大培养与调控多糖合成提供新的方法和理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

霍山石斛类原球茎由本实验室诱导保存,在无激素固体 MS 培养基中继代培养,继代周期为 30d,液体培养基为改良的 MS 培养基,其中微量元素、有机元素减半,大量元素:KNO₃ 30mmol/L, MgSO₄·7H₂O 1.5mmol/L, KH₂PO₄ 2.5mmol/L 和 CaCl₂·2H₂O 4.5mmol/L,蔗糖浓度为 30g/L。

1.2 类原球茎悬浮培养条件

取生长 30d 的类原球茎接种于装有 60mL 液体培养基(pH 为 5.8)的 250mL 三角瓶中,接种量为 100g/L(鲜重),置于摇床上(110r/min),25±2℃下悬浮培养。光照周期为 14h/d,日光灯,光强约为 80μmol/(m²·s)。做补料培养研究时,第一步培养基为生长培养基,培养时间为 24d,第 24 天一次性加入合成培养基,培养基体积保持不变,第二步培养时间为 24d,每隔 6d 取样进行分析。

1.3 分析方法

收获类原球茎,用蒸馏水洗 2 次,然后用滤纸吸干类原球茎表面的水分后称重,记为鲜重,把类原球茎置于 60℃烘箱中烘至衡重记为干重。提取多糖前,研碎类原球茎后,用蒸馏水在 50~60℃水浴上提取 3 次,收集水提液,加 95% 乙醇至乙醇浓度 80% 过夜沉淀,最后收集沉淀。沉淀溶于蒸馏水中

用 savage 法脱蛋白,并用苯酚-硫酸法测定多糖^[13]。培养基中的多糖提取方法同上,培养基中的残糖用蒽酮-硫酸法测定^[14],磷酸根离子用磷钼蓝法测定^[15](考虑到培养过程中水分的蒸发对测定的影响,在测定培养基中的各种成分时,保持培养基的体积为接种时的体积)。

类原球茎生物量 = 收获类原球茎的总干重/接种时培养基体积(g/L),类原球茎增量 = 类原球茎总干重-接种时类原球茎干重(g/L),多糖总产量为多糖总提取量(g/L),多糖含量 = 胞内多糖提取量/类原球茎干重(%),单位时间类原球茎增量 = 类原球茎增量/培养时间(g/L·d),单位时间多糖产量 = 多糖总产量/培养时间(g/L·d), Y_{CS} = 类原球茎增量的质量(干重)/消耗蔗糖的质量(g/g), Y_{PS} = 生成多糖的质量/消耗蔗糖的质量(g/g)。所有实验至少重复 2~3 次,实验数据以平均值附标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 霍山石斛类原球茎悬浮培养的动力学特性

为了进一步了解霍山石斛类原球茎细胞生长和多糖积累的相互关系,分别用 30g/L 和 50g/L 的蔗糖,磷酸盐浓度为 2.5mmol/L 的培养基考察了霍山石斛类原球茎悬浮培养的动力学过程。图 1、图 2、图 3 分别表示了霍山石斛类原球茎悬浮培养过程中,细胞生长、多糖积累和碳源的消耗情况。由图 1 可知,在 30g/L 的蔗糖浓度下,类原球茎在 6~24d 之间生长较快,24d 后开始减慢,30d 左右生物量最大,干重为 28.7g DW/L,然后进入稳定期,而在 50g/L 的蔗糖浓度下,类原球茎增殖缓慢,培养 30d 时,生物量只有 21.7g DW/L。由图 2 可知,在 30g/L 的蔗糖浓度下,在快速生长初期,多糖合成速度较快,21~24d 左右多糖产量达到最大,之后开始下降,培养 30d 时,多糖产量为 1.86g/L,多糖含量为 6.4%。这是由于培养基中的蔗糖浓度降低到一定值时,不能同时满足类原球茎细胞生长和多糖合成,细胞内的多糖降解速度大于合成速度,而导致多糖产量降低。在 50g/L 的蔗糖浓度下,和生长相对应,多糖合成速度也较慢,由于培养基中的碳源能同时满足类原球茎的生长和多糖合成,使细胞内多糖不断积累,最终多糖产量和多糖含量都较高,培养 30d 时,分别为 2.46g/L 和 11.3%。图 3 表示了不同蔗糖浓度下碳源消耗情况,在 30g/L 的蔗糖浓度下,培养 30d 时,碳源已被耗尽,而在 50g/L 浓度下,碳源未被耗尽(碳的利用率只有 45% 左右)。多糖合成是伴随着

类原球茎细胞的生长而进行的,细胞内多糖的积累不仅与类原球茎的生长有关,而且与培养基中的碳源浓度有关。相对高的生物量是有多糖产量的基础,提高培养基中的碳源浓度虽然有助于细胞内多糖的积累,但不利于类原球茎的增殖,从碳源的利用角度来讲也是不经济的。在保持蔗糖浓度不变的情况下,通过改变磷酸盐浓度也可调控类原球茎的增殖和多糖的积累^[16]。根据霍山石斛类原球茎细胞生长和多糖积累的特性,采用二步法培养,第一步用适合类原球茎增殖的培养基,即在30g/L的蔗糖浓度下获得较高的生物量,第二步只改变培养基中磷酸盐的浓度来调控细胞生长和多糖合成,即蔗糖浓度为30g/L,磷酸盐浓度为0.312mmol/L,使类原球茎增殖和多糖积累协调进行。

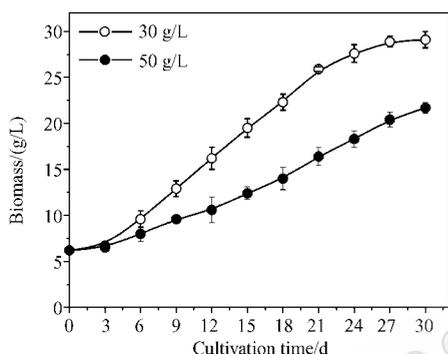


图1 霍山石斛类原球茎悬浮培养过程中细胞生长动态
Fig.1 Kinetics of cell growth in suspension cultures of protocorm-like bodies from *D. huoshanense*

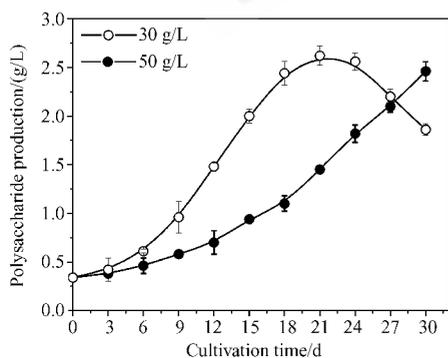


图2 霍山石斛类原球茎悬浮培养过程中多糖积累动态
Fig.2 Kinetics of accumulation of polysaccharides in suspension cultures of protocorm-like bodies from *D. huoshanense*

2.2 两步法培养的动力学模型建立

2.2.1 模型的假设条件:

第一步培养:

(1) 细胞生长动力学:蔗糖为唯一限制性底物,蔗糖浓度影响类原球茎细胞的生长速率。(2) 蔗糖消耗主要用于细胞生长、细胞维持和多糖合成。(3)

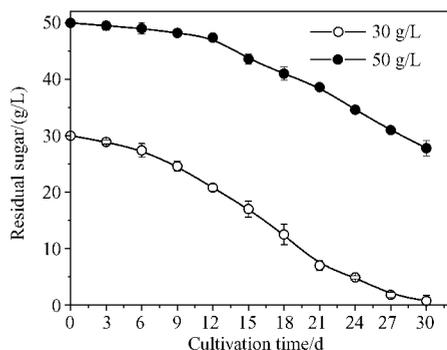


图3 霍山石斛类原球茎悬浮培养过程中碳源消耗
Fig.3 The depletion of carbon source in in suspension cultures of protocorm-like bodies from *D. huoshanense*

多糖合成动力学:多糖的合成成为生长偶联型,多糖大部分存在细胞内,只有少数分泌到培养基中,为了简化起见,将胞内外多糖综合起来考虑。在细胞快速生长期,多糖合成速度大于降解速度,多糖不断增加,当培养基中碳源浓度降低到一定值时,多糖的合成速度变慢,细胞内多糖降解速度大于合成速度,多糖不断减少。

第二步培养:

蔗糖不是限制性因素,而磷是限制性因素^[17],磷限制着类原球茎细胞的生长,类原球茎细胞的生长速率与细胞内游离的磷酸盐浓度有关^[18],磷酸盐的消耗主要用于类原球茎细胞的生长。培养基中的蔗糖足以维持类原球茎细胞生长和多糖的合成。

根据以上假设,得出动力学模型为:

第一步培养:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{ml} \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) X \quad (1)$$

μ_{ml} 为最大比生长速率; X 为生物量; X_m 为最大生物量。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha_1 \frac{dX}{dt} - \beta_1 X \quad (2)$$

$$- \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{CS}} \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

P 为多糖产量; α_1, β_1 为系数; Y_{CS} 为类原球茎对碳源的得率系数; $Y_{P/S}$ 为多糖对碳源的得率系数; m 为细胞维持系数。第二步培养:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m2} \frac{X[S_p]}{K_s + [S_p]} \quad (4)$$

μ_{m2} 为最大比生长速率; K_s 为饱和常数; S_p 为磷酸盐浓度。

$$\frac{dp}{dt} = \alpha_2 \frac{dX}{dt} - \beta_2 X \quad (5)$$

$$- \frac{dS_p}{dt} = \frac{1}{Y_{CIP}} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

Y_{CIP} 为类原球茎对磷的得率系数; α_2, β_2 为系数。

2.2.2 数学模型中参数的确定: 根据摇瓶中培养的实验数据, 采用多元最小二乘法回归模型中的参数, 结果如表 1。

表 1 模型参数
Table 1 Model parameters

Parameters	Values	Units
μ_{m1}	0.142	d^{-1}
α_1	0.29	$g(L \cdot d)$
β_1	0.011	$g(g \cdot d)$
Y_{CS}	0.78	g/g
Y_{PS}	0.096	g/g
m	0.053	$g(g \cdot d)$
μ_{m2}	0.032	d^{-1}
K_s	0.039	mmol/L
α_2	0.21	$g(L \cdot d)$
β_2	0.0084	$g(g \cdot d)$
Y_{CIP}	307.5	$g/mmol$

2.2.3 模型求解: 根据数学模型, 第一步培养求解的初始条件和积分时间区域为: $X(0) = 6.2g/L$; $X_m = 28.7g/L$; $S(0) = 30g/L$; $S_p = 2.5mmol/L$; $P(0) = 0.34g/L$ $0 \leq t \leq 24d$ 。

第一步求解所得公式

$$X = \frac{X_0 e^{0.142t}}{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{0.142t})} \quad (0 \leq t \leq 24d) \quad (7)$$

$$P = \frac{0.29 X_0 e^{0.142t}}{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{0.142t})} - 0.029 X_m \ln \left[1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{0.142t}) \right] \quad (8)$$

$$S = S_0 + \frac{X_0}{0.78} + \frac{P_0}{0.096} - 4.31 \frac{X_0 e^{0.142t}}{1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{0.142t})} - 0.373 \ln \left[1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{0.142t}) \right] \quad (9)$$

由第一步培养动力学数学模型的计算结果得出第二步培养动力学模型的初始条件和积分时间区域为: $X = 25.9g/L$; $P = 2.24g/L$; $S_{10} = 0.312mmol/L$; $24 \leq t \leq 48d$ 。

第二步求解公式只能用四阶 Runge-Kutte 法数值积分进行求解, 求解公式用微分方程的形式表达:

$$\frac{dX}{dt} = 0.032 \frac{X[S_p]}{0.039 + [S_p]} \quad (24 \leq t \leq 48d) \quad (10)$$

$$\frac{dP}{dt} = 0.21 \frac{dX}{dt} - 0.084X \quad (11)$$

$$\frac{dS_p}{dt} = - \frac{1}{307.5} \frac{dX}{dt} \quad (12)$$

2.2.4 模型验证: 由数学模型得到的 X, S, S_p, P 计算值与对应的实验值进行比较, 其最大相对误差、各参数的计算值与对应的实验值的比值作为目标函数的数学期望和标准偏差见表 2。表 2 表明各参数模型值与实验值能较好地吻合, 因此模型能较好地描述霍山石斛类原球茎第二步培养过程的动力学。

表 2 模型值与实验值的比较

Table 2 Comparison between model prediction and experimental data

Parameters	Maximum relative error/%	Calculated value/experimental value	
		Mathematical expected value	Standard variance
X	17.6	1.011	0.0062
S	18.4	1.023	0.0071
S_p	14.5	0.985	0.0054
P	15.3	1.006	0.0058

2.2.5 类原球茎细胞生长和多糖积累的变化规律: 图 4 表示了细胞生长和多糖积累的模型值与实验值的比较, 生长模型的最大相对误差为 17.6%, 平均误差为 5.8%, 多糖积累的动力学模型最大相对误差为 15.3%, 平均误差为 5.9%。模型值与实验值吻合较好, 模型基本描绘了第二步培养类原球茎细胞生长和多糖积累的基本规律, 第一步培养类原球茎增殖较快, 第二步培养类原球茎增殖较慢, 但多糖积累较多。通过第二步培养, 类原球茎的生物量达 44.2g DW/L, 多糖产量达 5.22g/L, 多糖含量为 11.9%, 单位时间类原球茎增量和多糖产量分别为 0.79g DW(L·d) 和 0.1g(L·d), 而原药材、固体培养^[9]和一步法液体培养的多糖含量分别为 3.45%、3.94% 和 6.4%, 刘咏等^[11]在优化的培养基中添加激素使类原球茎的多糖含量达到 8.3%。一步法培养, 单位时间类原球茎增量和多糖产量分别为 0.76g DW(L·d) 和 0.051g(L·d)。可见, 利用第二步培养, 类原球茎的多糖含量显著提高, 单位时间类原球茎增量不明显, 但单位时间多糖产量显著提高。

2.2.6 模型实用性考察: 在第二步培养中, 改变培养基中磷酸盐浓度, 对模型的适用性进行了考察。磷酸盐浓度取 2.5mmol/L 时, 最终生物量为 53.2g DW/L, 多糖产量为 4.2g/L, 多糖含量为 7.5%。从图 5 可以看出, 在这个条件下, 实验值与模型值拟合良好, 由此可知, 通过改变磷酸盐的浓度可以实现对类原球茎细胞生长和多糖合成的有效调控。

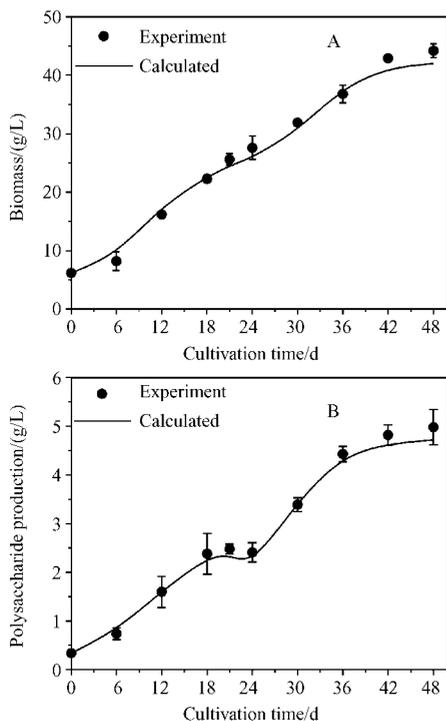


图4 模型计算值与实验值的比较(生物量 A 多糖 B)

Fig. 4 Comparison of calculated result with tested result

A : biomass ; B : polysaccharide.

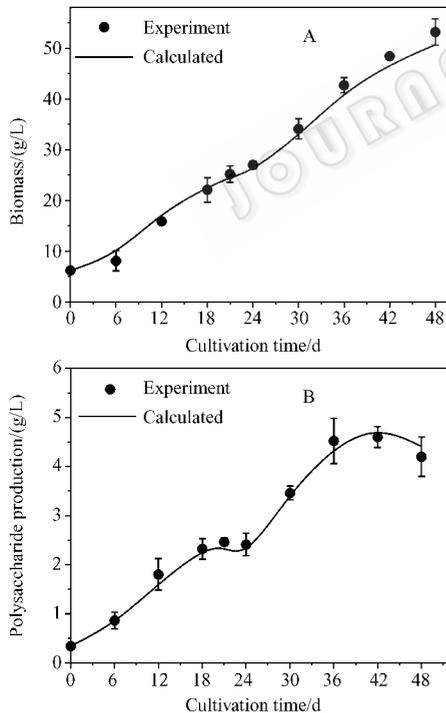


图5 模型计算值与实验值的比较(生物量 A 多糖 B)

Fig. 5 Comparison of calculated result with tested result

A : biomass ; B : polysaccharide.

的增殖和多糖的积累受多种因素影响,包括培养基组成、培养条件等。磷是霍山石斛类原球茎细胞生长和多糖合成的有效调控因素,通过改变培养基中的磷酸盐浓度来调控类原球茎的增殖和多糖的积累,可以在适合类原球茎细胞生长的蔗糖浓度下,使碳源更多地流向多糖合成,利用二步法培养,多糖产量为 5.22g/L,多糖含量达 11.9%,明显高出其它方法。建立的模型基本反映了霍山石斛类原球茎细胞生长和多糖积累的变化规律,该模型的建立为调控类原球茎增殖和多糖积累协调进行提供了方法。

符号说明

 X —生物量(g/L) μ_{m1} —第一步培养最大比生长速率(d^{-1}) μ_{m2} —为第二步培养最大比生长速率(d^{-1}) X_m —为第一步培养的最大生物量(g/L) S —为蔗糖浓度(g/L) $\alpha_1 \alpha_2 \beta_1 \beta_2$ —为系数(g/L·d) S_p —磷酸盐浓度(mmol/L) $Y_{C/S}$ —类原球茎对碳源的得率系数(g/g) K_S —为饱和常数(mmol/L) $Y_{P/S}$ —多糖得率系数(g/g) $Y_{C/P}$ —类原球茎对磷的得率系数(g/mmol) m —为细胞的维持系数(g/g·d) t —时间(d)

REFERENCES(参考文献)

- [1] Cheng XM(陈晓梅), Guo SX(郭顺星). Study progress of the *Dendrobium* plants in chemicals constituents and pharmaceutical activity. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 2001, 13(1): 70-74.
- [2] Bi ZM, Wang ZT, Xu LS. Chemical constituents of *Dendrobium monili forme*. *Acta Botanica Sinica*, 2004 46(1): 124-126.
- [3] Huang MQ(黄民权), Cai TY(蔡体育), Liu QL(刘庆伦). Effects of polysaccharides from *Dendrobium candidum* on white blood cells and lymph cells moving inhibition factory of mice. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 1996, 8(3): 39-41.
- [4] Luo HL(罗慧玲), Cai TY(蔡体育), Chen QL(陈巧伦), et al. Enhancement of *Dendrobium candidum* polysaccharide on killing effect of LAK cells of umbilical cord blood and peripheral blood of cancer patients in vitro. *Chinese Journal of Cancer* (癌症), 2000, 19(12): 1124-1126.
- [5] Zha XQ, Luo JP, Jiang ST. Induction of immunomodulating cytokines by polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*.

3 讨论

霍山石斛类原球茎悬浮培养过程中,类原球茎

- [6] Huang MQ(黄民权), Lu YJ(卢应京). Prospect on cultures of *Dendrobium Candidum* used as drugs. *J Chin Med Mater* (中药材), 1998, **21**(11): 543 - 545.
- [7] Ilan A, Ziv M, Halevy AH. Propagation and corm development of *Brodiaea* in liquid cultures. *Scientia Horticulturae*, 1995, **63**: 101 - 112.
- [8] Gao JP(高建平), Jin RM(金若敏), Wu YP(吴耀平), et al. Comparative study of tissue cultured *Dendrobium* protocorm with natural *Dendrobium candidum* on immunological function. *J Chin Med Matr* (中药材), 2002, **25**(7): 487 - 489.
- [9] Luo JP(罗建平), Zha XQ(查学强), Jiang ST(姜绍通). Suspension culture of protocorm-like bodies from endangered medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2003, **28**(7): 611 - 613.
- [10] Zha XQ(查学强), Luo JP(罗建平), Jiang ST(姜绍通). Studies on the synthesis of active polysaccharide in suspension cultures of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. *Chinese Food Science* (食品科学), 2005, **26**(4): 41 - 44.
- [11] Liu Y(刘咏), Luo JP(罗建平). Optimization conditions for liquid culture of PLBs of *Dendrobium huoshanense*. *Chinese Food Science* (食品科学), 2005, **26**(9): 84 - 87.
- [12] Hang L(黄鹂), Zha XQ(查学强), Luo JP(罗建平). Effect of metal ion on the polysaccharide synthesis in PLBs of *Dendrobium huoshanense* in suspension cultures. *Journal of Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2006, **34**(9): 1910 - 1902, 1909.
- [13] Zhong JJ, Wang DJ. Improvement of cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Cu²⁺ effect. *J Biotechnol*, 1996, **46**: 69 - 72.
- [14] Zhang ZL(张志良). Experiment Guide of Plant Physiology. Beijing: Higher Education Press(高等教育出版社), 1993.
- [15] Li WA(李文安), Luo SW(罗士伟). Cultivation Technology of Plant Tissue and Cell. Beijing: Science Press, 1988.
- [16] Jiang ST(姜绍通), Wei M(魏明), Luo JP(罗建平). Effect of phosphate on cell growth and production of polysaccharides by suspension cultures of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22**(4): 613 - 618.
- [17] Curtis WR, Hasegawa PH, Emery AH. Modeling linear and variable growth in phosphate limited suspension cultures of *Opium Poppy*. *Biotechnology & Bioengineering*, 1991, **38**: 371 - 379.
- [18] Liu S, Zhong JJ. Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Process Biochemistry*, 1998, **33**(1): 69 - 74