

西洋参细胞液体培养及动力学研究

范代娣 李宝璋

(西北大学化工系, 西安 710069)

本文对西洋参细胞在改良 MS 培养液中发酵过程和发酵动力学进行了研究。结果表明, 细胞生长动力学为: $\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} X$, 式中 $\mu_{max} = 0.1613d^{-1}$, $K_s = 47.59g/L$; 基质消耗动力学为: $-\frac{dS}{dt} = 1.75 \frac{dX}{dt}$ 。西洋参细胞液体培养收获最佳期 23 天以上, 皂甙累积的高峰期为 25 天以后。液体培养时, 细胞中大部分皂甙释放到培养液中, 经薄层层析后仅含 R_{s1} , 而愈伤组织中则含 R_{s1} 、 R_{b1} 、 R_c 、 R_d 、 R_e 五种, 其总皂甙含量比人工栽种西洋参提高 23%。

关键词 西洋参细胞; 发酵培养; 人参皂甙; 动力学

植物组织培养用于植物药生产是当前研究重点之一^[1-9]。在医药工业中, 利用植物细胞培养技术可以进行药用物质的合成及生物转化、甚至产生出新的生理活性物质。西洋参(*Panax quinquefolium*), 是一种名贵药材, 能促进血液循环, 降低血糖, 有一定的抗癌、抗衰老作用, 其某些药理作用是中国人参无法替代的。西洋参原产于美国和加拿大。我国近几年虽有栽种, 但由于受环境、气候及栽培技术的限制, 每年仍需大量进口, 故而西洋参细胞培养受到重视。在这方面张君凯^[10]、郭生桢^[11]、郑光植^[12]都报道过愈伤组织及悬浮培养, 本文对发酵培养过程中细胞生长动力学、基质消耗动力学及环境因子、粘度的变化进行了研究。

材料及方法

(一) 实验材料

1. 材料: 本实验采用陕西省陇县栽种的 2—3 年生植株, 由嫩茎、根诱导产

生愈伤组织, 经 4 次继代培养后用作悬浮培养的种子。

2. 培养基: 采用改良 MS 培养基, KT(激动素) 0.2mg/L, IBA(吲哚乙酸) 5mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 92.5mg/L, 液体培养时 KT 及 IBA 浓度减半。灭菌前调 pH 至 5.8。

3. 培养方法: 分三级培养, 第一级为固体培养, 第二级为摇瓶培养, 第三级为发酵培养, 以上三级培养均为暗培养。固体培养时培养温度为 $25 \pm 0.5^\circ C$, 液体培养时培养温度为 $28 \pm 0.5^\circ C$, 摇瓶培养时采用旋转式生化培养箱(山东大学金工厂生产), 转速 100r/min, 250ml 三角烧瓶装 50ml 培养液。发酵培养采用美国的 Omni-culture fermenter, 通气量 1vvm, 搅拌转速 50r/min, 容积为 2L。

(二) 发酵培养过程中参数的检测

1. 糖的测定: 取不同培养时期的培养液, 用蒽酮法测定其中蔗糖含量^[13],

本文于 1992 年 3 月 11 日收到。

算出蔗糖利用率。

2. 细胞鲜重、干重的测定：取不同培养时期的培养液，离心15min，转速为2000r/min^[13]，收集细胞，称其鲜重，然后在60℃下烘6h后，称其干重。

3. pH的测定：由pH探头自动测定并由Omni-culture fermenter本身的pH测量系统自动记录。

4. 溶氧的测定：由Omni-culture fermenter系统自动测量。

5. 粘度测定：取不同培养时期的培养液，用乌氏粘度计在水浴25℃下测定其流动时间t，取其平均值，然后换算成粘度^[14]， $\mu = Kt$ ，(常数K经校正为0.02694cP/s)。

6. 定量测定总皂甙及分组皂甙的含量：(1)人参皂甙的提取与纯化：称取细胞干粉，每克加甲醇20ml，置索氏提取器中提取36h，先用乙醚脱脂，继用正丁醇萃取，减压回收正丁醇，最后用丙酮沉淀出人参皂甙。(2)细胞总皂甙的紫外分析：配备皂甙标准液，用紫外扫描仪(P-E公司Lambda 17型紫外，可见光分析仪(190—900nm))扫描，波长为192.4nm，对比组织培养细胞提取物的吸收大小，可定量求出总皂甙含量。(3)细胞中分组皂甙的薄层分析：取经过纯化后的皂甙提取物，溶于甲醇中，点样于硅胶G薄层板上，以正丁醇：乙酸乙酯：水(4:1:5)上层上行展开，以10%的硫酸作为显色剂，喷雾，于120℃下加热5min，观察结果，对样品斑点和标准斑点同时进行双波长扫描(日本岛津CS-930薄层扫描仪)测定，波长为535nm，参比波长700nm，线性参数 $S_x = 3$ ，用峰面积法计算组皂甙含量。

结果与讨论

(一) pH值控制与否对发酵过程

的影响

图1—3是在转速为50rpm，通气量为1vvm，图1—2接种量为0.82g·dwt/L，图1发酵过程中不控制pH值时所得到的细胞生长速度、细胞产量及各参数变化曲线；图2控制pH在5.8±0.15。对照两图可知，当控制pH值时：(1)蔗糖利用率最高为80.3%，而不控制pH时仅为65%；(2)细胞产量从6.82g·dwt/L增加到19.4g·dwt/L，产量增大1.84倍；(3)

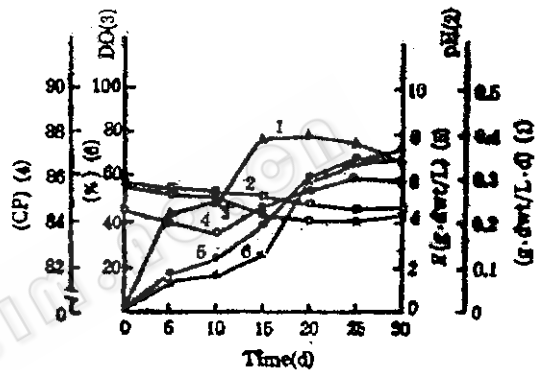


图1 不控制pH时的发酵进程

Fig.1 The fermentation course as pH changed itself

- 1. Growth rate; 4. Viscosity × 100;
- 5. Cell product; 6. Consumption ratio of sugar

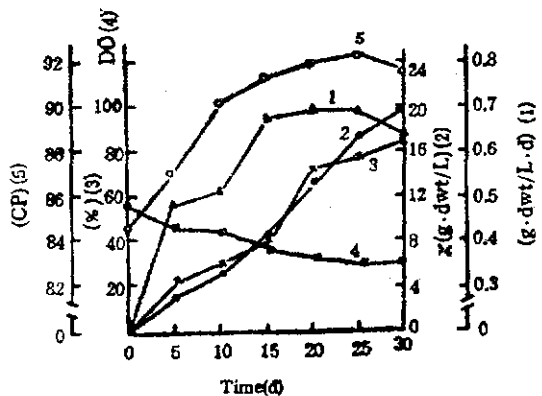


图2 控制pH在5.8±0.15时的发酵进程

Fig.2 The fermentation course as pH controlled in 5.8±0.15

- 1. Growth rate; 2. Cell product;
- 3. Consumption of sugar; 5. Viscosity × 100

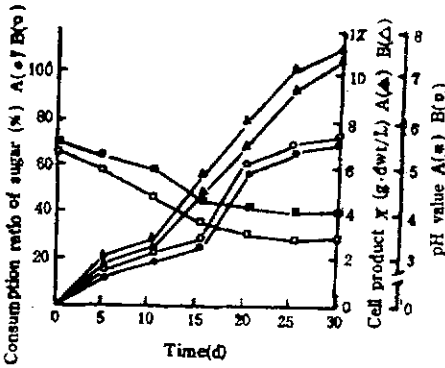


图3 接种量对发酵过程的影响

Fig.3 The effects of inoculum quantity on fermentation process

- A. Inoculum quantity 1.02g dWt/L
B. Inoculum quantity 1.23g dWt/L

细胞生长速度由 $v = 0.298\text{g}\cdot\text{dwt}/\text{L}\cdot\text{d}$ 提高到 $0.646\text{g}\cdot\text{dwt}/\text{L}\cdot\text{d}$, 生长速度增大1.17倍; (4)粘度及溶氧变化幅度均较不控制pH值大。由细胞生长曲线知: 10—15天为加速生长期, 15—23天为对数生长期, 23天后为生长稳定及衰之期, 代谢产物的积累后于细胞生长, 收获时间取30天。

(二) 接种量对发酵过程的影响

由图3知, 随着接种量加大, 糖利用率及细胞产量均增加, 这表明, 加大接种量, 有利于发酵过程的进行。

(三) 培养细胞总皂甙、分组皂甙的定量测定结果

愈伤组织经薄层扫描结果含 R_{b1} 、 R_{e1} 、

表1 人工培养与天然栽培西洋参总皂甙含量比较

Table 1 A comparison of total saponins content between that in cultured and cultivated *Panax quinquefolium* by UV at 192.4nm

Type of materials		Weight of materials (g)	Weight of extracted sediment(g)	Weight of saponins (g)	Content
Cultivated <i>Panax quinquefolium</i>					6.4916% [15]
Callus		6.0332	0.5420	0.4800	7.9573%
pH changed itself during fermentation culture	Liquid cultured cell	5.7264	0.0650	0.0580	1.01%
	Culture liquid	100ml	1.6300	0.1090	1.09g/L
pH fixed during fermentation culture	Liquid suspension cell	6.3462	0.0984	0.0872	1.37%
	Culture liquid	100ml	1.9400	0.1330	1.33g/L

表2 培养细胞与天然栽培西洋参分组皂甙含量比较

Table 2 A comparison of group saponins content between that in cultured cell and cultivated *panax quinquefolium* by thin-layer scanning

Type of materials	Group of saponins	R_{b1} group	R_{e1} group	R_{a2} group	R_{d4} group	R_{o} group	R_{e} group	Total saponins content
		saponin	saponin	saponin	saponin	saponin	saponin	
Callus		0.9365%	1.1909%	0.4311%	0.2643%		0.9854%	7.9573%
Liquid cultured cell			0.3539%					1.01%
Cultivated <i>Panax quinquefolium</i> [15]		1.6106%	0.1697%	0.3074%	1.2702%	0.2748%	1.4654%	6.4916%

R_{e2} 、 R_{d4} 、 R_{e} , 而液体培养细胞仅含 R_{e1} 皂甙。这可能是由于环境条件的改变或酶的缺失造成皂甙不积累或者通过细胞壁释放到培养液中, 这可从表1的分析结果看出,

我们实验条件下所得愈伤组织总皂甙含量比天然栽培西洋参高23%, pH值控制的发酵培养比pH值任其变化的发酵培养总皂甙含量高35%。

(四) 发酵动力学

西洋参细胞生长和皂甙的累积属部分伴随, 即在开始时菌体生长占优势, 基本无皂甙累积, 皂甙累积的高峰在 23 天后, 由于产物量太少, 在此只讨论细胞生长动力学和基质消耗动力学。在实验基础上, 作以下几点简化假设: (1) 把糖消耗作为单一限制性基质; (2) 比生长速率符合 Monod 关系式 $\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$, 其中 μ 为比生长速率 (d^{-1}); μ_{max} 为最大比生长速率 (d^{-1}); S 为糖浓度 (g/L); K_s 为饱和常数 (g/L)。(3) 单位基质消耗的细胞产率 $Y_{x/s}$, 视为常数。

A. 细胞生长动力学

$$dX/dt = \mu X \quad (a)$$

X 为细胞浓度, 单位 (g, dwt/L)

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (b)$$

$$\mu = (\Delta X / \Delta t) / X \quad (c)$$

根据实验所得 X 代入 (c) 式求得 μ , 然后 $\frac{1}{\mu}$ 对 $\frac{1}{S}$ 作图, 由图知 $\frac{1}{\mu} - \frac{1}{S}$ 基本符合直线关系, 即与假设 2 相符。由图求得 $\frac{1}{\mu_{max}} = 6.2$, 因此 $\mu_{max} = 0.1613 [d^{-1}]$;

斜率 $K_s = 47.59 [g/L]$ 、所以细胞生长速度式为:

$$dX/dt = \mu X = 0.1613 \cdot \frac{S}{K_s + S} X \quad (1)$$

由实验求得西洋参细胞干重增加一倍时,

$$\frac{1}{\mu} = 0.0798 \text{ 故倍增时间 } \tau = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{0.0798} = 8.68 [d]$$

B. 基质消耗动力学: 基质消耗用于细胞生长, 细胞维持和产物合成三方面,

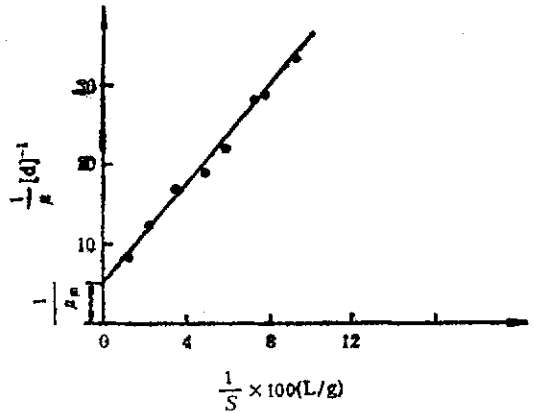


图 4 $\frac{1}{\mu} - \frac{1}{S}$ 关系图

Fig.4 Relationship between $\frac{1}{\mu}$ and $\frac{1}{S}$

$$\text{即 } -\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_G} + mX + \frac{q_P X}{Y_P}$$

- 其中: Y_G ——单纯用于细胞生长的基质消耗系数;
- m ——单纯用于细胞维持生命活动的基质消耗系数;
- Y_P ——单纯用于产物积累的基质消耗系数;
- q_P ——产物的比生长速率。

由于在发酵培养过程中, 细胞生长伴随着产物积累, 无法直接测定 Y_P 、 X_G 及 m , 引入综合得率系数 $Y_{x/s}$ 。 $Y_{x/s}$ 为单位重量的限制性碳源所得到的细胞及产物重量得率, $Y_{x/s} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = -dX/dt /$

$$dS/dt, \text{ 即: } -\frac{dS}{dt} = \frac{dX/dt}{Y_{x/s}}$$

根据实验数据对 $S-X$ 作图 5 得一直线: $S = -aX + b$, 求得 $b = 27$ $a = 1.75$, 故 $S = -1.75X + 27$

$$\text{则 } \frac{dS}{dt} = -1.75 \frac{dX}{dt}, Y_{x/s} = \frac{1}{1.75} = 0.5714; \text{ 因此基质消耗速率为:}$$

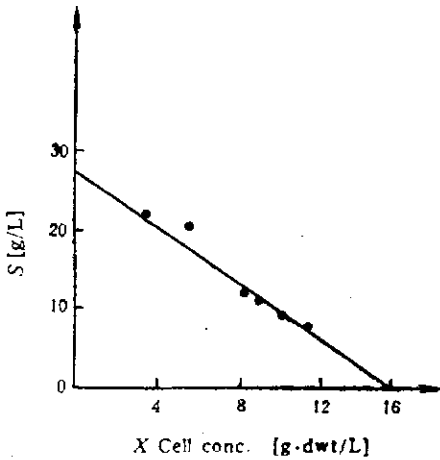


图5 S—X关系曲线

Fig.5 Relationship between X and S
S—Concentration

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX/dt}{0.5714} = 1.75 \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

将(1)、(2)式处理得：

$$-\frac{dS}{dt} = 1.75 \cdot \frac{0.1613 \cdot S}{47.59 + S} X$$

积分并代入边界条件 $t=0$ 时, $S=30$
得: $-47.59 \ln S - S =$

$$0.2822X \cdot t - 192 \quad (3)$$

(3)式关联了西洋参细胞在改良MS培养液中, pH5.8, 搅拌转速50r/min, 培养温度28℃, 通气量1vvm, 常压时的S、X、t的关系, 知道t及测定过程中S或X中任何一个便可求得另一值, 以(3)式求得结果与实测值相比误差不超过3%。

西洋参细胞发酵培养是切实可行的, 它不仅在生长速度方面, 还是皂甙含量方面均优于天然栽种西洋参, 而且培养条件易于控制。本实验采用搅拌式发酵罐, 在发酵培养过程中, 细胞因剪切力破碎较多, 如能采用低剪切力的气升式发酵罐效果可能会更好。由实验表明, 提高接种量, 控制发酵培养过程pH对细胞产量及皂甙含量的增加均有重要的作用。

参 考 文 献

- [1] 刘 涿: 2000年的中国植物生理学, 中国植物生理学会, 上海, pp. 60, 1984.
- [2] 何卓培: 植物生理学通讯, 4:8, 1983.
- [3] Curtin, M. E., *Biotechnol.*, 1:649, 1983.
- [4] Fowler, M. W., *Biotechnol. Genet. Rev.*, 2:41, 1984.
- [5] Fowler, M. W., *Biomass*, 3:172, 1985.
- [6] Fiechter, A., *Biochem. Eng. Biotechnol.*, 8:59, 1985.
- [7] Shargood, P. D., *Biotechnol.*, 3:29, 1985.
- [8] Staba, E. J., *J. Nat. Prod.*, 48:203, 1985.
- [9] Collins, G. B. and Petolino, J. G.: *Applications of Genetic Engineering to Crop Improvement*, pp. 561, 1984.
- [10] 张君凯: 中国生化工程学会第一次学术报告会论文, 1989.
- [11] 郭生楨等: 中药科技, 3:5—6, 1979.
- [12] 郑光植: 生物工程学报, 6:316—321, 1990.
- [13] 上海植化所: 植物生理实验手册, 科技出版社, 1978.
- [14] 工作毛细管粘度计检测规程, 技术标准出版社, 1976.
- [15] 郑友兰等: 中国药学杂志, 24(6):332—334, 1989.

Study on Liquid Culture and Kinetics of *Panax quinquefolium* Cell

Fan Daidi Li Baozhang

(Chemical Engineering Department of Northwest University, Xian 710069)

This paper reports the liquid culture process and kinetics of *Panax-quinquefolium* callus cell in improved MS medium. The cell growth kinetics and substrate consumption kinetics were concluded. The cell growth kinetics based on Monod's rate equation: $dX/dt = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} X$, $\mu_{max} = 0.1613(\text{day})^{-1}$, $K_s = 47.59(\text{g/L})$ and the substrate consumption kinetics equation: $-dS/dt = 1.75dX/dt = \frac{dX/dt}{Y_{X/S}}$, $Y_{X/S} = 0.5714$ were obtained. In the process of suspension and fermentation culture, the formation of saponins lagged behind the cell growth. In liquid cultured cell, only R_{g1} group saponin could be detected, but in the callus, R_{g1} , R_{b1} , R_c , R_d and R_e were detected. The content of total saponins in callus was 23% more than that in cultivated *Panax quinquefolium*.

Key words *Panax quinquefolium* cell; fermentation culture; saponins; kinetics