

高山红景天愈伤颗粒组织悬浮培养动力学及工艺的研究

许建峰 韩爱明 冯朴荪*

(大连理工大学生化工程研究所 大连 116012)

摘 要 研究了高山红景天愈伤组织颗粒悬浮培养过程的生长及红景天甙合成的规律,发现红景天甙合成与细胞生长偶联,两者之间的关系表示为 $q = 5.38 \times 10^{-3} \mu$ 。其产率系数 $Y_{N/S}$ 及维持系数 m 分别为 $0.66 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.033 \text{ g} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 。在 3.5L 气升式反应器中研究了培养过程的操作特性,发现“发泡”现象几乎不存在,氧传递系数 $K_L a$ 的变化不同常规植物细胞的悬浮培养,愈伤组织颗粒在培养过程中经历一个由小变大,后又变小的过程。

关键词 高山红景天, 红景天苷, 愈伤组织, 悬浮培养

高山红景天 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor) 为一珍稀药用植物, 内含以红景天甙 (salidroside) 为代表的有效成分具有抗疲劳, 抗缺氧, 抗辐射及抗衰老等显著功能, 在军事医学、航天医学及运动医学上具有十分重要的价值^[1]。目前该植物资源严重匮乏, 故研究高山红景天细胞规模培养技术以开辟新的资源途径意义重大。

常规悬浮培养的植物细胞, 在培养过程中, 有趋于成团的特性^[2], 尤其在培养后期最大粒径可达 2mm 以上^[3], 这在工程操作上引起诸多麻烦。试图改变细胞成团特性以满足工程操作需要的研究未见成效。而从生物学意义而论, 细胞的成团和细胞的分化往往是次生代谢物产生的基本条件^[4]。在苦茄 (*Solanum dulcamara*) 细胞悬浮培养中, 直径为 5mm 或更大的青色细胞团其类固甾碱含量为小细胞团的 4 倍^[5]。而在三角叶薯蓣 (*Dioscorea deltoidea*) 培养中, 有意使细胞成团可使薯蓣皂甙元含量提高 40%^[6]。另外, 有的植物种类, 例如三尖杉 (*Cepalotaxus*), 其目标次生代谢物只在固体培养的愈伤组织中存在, 一旦转入液体进行单细胞悬浮培养, 目标产物就消失或含量极低。愈伤组织颗粒由于其内部细胞接触致密, 营养物质形成一定的梯度, 有利于细胞组织化及分化, 因此可能更适合于次生代谢物的生产^[7]。针对植物细胞的这个特性, 有必要研究以愈伤组织颗粒为代表的成团细胞的生长规律。本文正是从这些方面考虑, 研究高山红景天愈伤组织颗粒悬浮培养过程的动力学及其在气升式反应器进行大规模培养的工艺特性。

1 材料与方 法

1.1 材料

1990 年采自吉林长白山海拔 1700m 以上的高山红景天, 从其茎诱导出的愈伤组织。

1.2 培养方法

1.2.1 愈伤组织悬浮系的建立: 诱导的愈伤组织在含蔗糖 3%, 并附加 2, 4-二氯苯氧乙

国家自然科学基金资助项目 (No. 29376227)。

* 通讯联系人。

本文于 1995 年 5 月 5 日收到。

酸 (2,4-D) $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-苄基嘌呤 (BA) $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Murashige-Skoog (MS) 琼脂培养基上培养, 每 4 周继代一次, 并不断筛选, 半年后得到由直径为 $1 \sim 2\text{mm}$ 的红色颗粒组成的愈伤组织。将培养 20d 左右的生长旺盛的愈伤组织转入液体培养, 培养基同上, 不加琼脂。20d 后, 愈伤组织团块开始褐化, 这时开始每隔 3d 换一次培养基, 于是褐化愈伤组织块上重新长出新的愈伤组织, 而且很快离散到培养基中快速生长, 不断分散成小颗粒, 这时再改为 5d 换一次培养基, 同时将大块褐化愈伤组织去掉, 1 个月左右即可建成绝大多数颗粒直径在 $1 \sim 2\text{mm}$, 均匀稳定的愈伤组织悬浮系。以后每隔 10d 继代一次, 继代时将原培养基全部倒光, 加入 3 倍体积的新鲜培养基, 然后再分装成 3 个瓶, 并及时将大块愈伤组织挑走。

1.2.2 愈伤组织悬浮培养: 分别进行摇瓶培养和反应器培养, 渐度均为 24°C , 光照时间为每天 12h。MS 培养基附加 $0.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘乙酸 (NAA), $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 及 3% 蔗糖。摇瓶培养转速为 $120\text{r}/\text{min}$, 250ml 三角瓶中装液 50ml, 接入用无菌水冲洗干净的愈伤组织颗粒。所得的结果为 3 个平行试样的平均值。反应器培养采用美国 New Brunswick Scientific Co 的 Celligen 细胞培养系统, 将其罐体改造为气升式反应器, 工作体积为 3.5L, 通气量采用 $0.833\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3 测定方法

1.3.1 愈伤组织生长的测定: 愈伤组织的生长用生物量作为指标。即将过滤得到的细胞组织置于 60°C 烘箱中烘至恒重称量, 生物量 = 最终干重 / 培养体积 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.3.2 红景天甙含量测定: 取约 1.0g 愈伤组织干粉用 70% 乙醇于索氏提取器中回流 5h, 提取液浓缩后, 经 10% Pb (OAc)₂ 沉淀, 过 Al_2O_3 柱, 滤液于 7320 型分光光度计上比色测定^[8]。

1.3.3 蔗糖含量测定: 采用常规蒽酮法。

1.3.4 培养液粘度、密度的测定: 粘度采用乌氏粘度计于 24°C 恒温浴中测定, 密度采用 PZ-A-5 型液体比重天平测定。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织悬浮系的特点

按上述方法建立起来的愈伤组织悬浮系主要是由直径为 $1 \sim 2\text{mm}$ 的红色小颗粒组成单细胞及由几个细胞组成的小细胞团含量极少。它们与常规植物细胞培养中的细胞团不同, 细胞间结合非常致密, 细胞呈小圆形, 直径大约为游离细胞的 $1/3$ 。这些愈伤组织小颗粒生长很旺盛, 但在生长过程中释放的代谢物易使它们褐化, 从而停止生长。因此必须注意及时继代, 继代周期为 10d, 继代时需将原培养基全部置换, 且注意及时将大块愈伤组织挑出, 这样可使愈伤组织颗粒一直保持较高的活性。

2.2 愈伤组织悬浮培养过程中的生长及红景天甙的生成规律

高山红景天愈伤组织悬浮培养的生长动态及红景天甙的积累规律如图 1。由图 1 可见, 愈伤组织悬浮培养 24d 左右达最大生物量 $14.02\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 其有效成份红景天甙在胞内的积累与生长同步。24d 红景天甙含量达 0.566%, 与野生植株的含量相当 (野生植株的含量在 0.3%~1.0% 之间)。培养过程中, 同时也出现少量游离细胞和小细胞团, 收集这

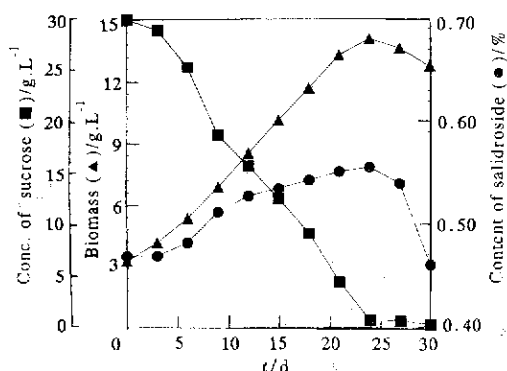


图1 高山红景天愈伤组织悬浮培养的时间进程
Fig. 1 Time-course of callus suspension culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor

如图2。图2中显示,愈伤组织的生长大致可分为两个阶段。大约在前6d,近似为指数生长期,其比生长速率 $\mu=0.0945\text{d}^{-1}$,接近于常规悬浮培养的细胞。而6~21d,愈伤组织颗粒近似以恒速生长,其生长速率 $dx/dt \approx 0.526\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$,可见愈伤组织生长显示出典型的植物细胞悬浮培养生长的规律,但恒速生长期较长,生长较一般植物细胞慢。至于红景天甙的比生成速率 q ,在0~6d内, q 值呈上升趋势,而在愈伤组织恒速生长期, q 值与 μ 值同步下降。两者之间的关系可为 $q=5.38 \times 10^{-3}\mu$ 。可见,在愈伤组织恒速生长期红景天甙的生成与细胞的生长是偶联型的。这与大多数植物细胞培养生产次生代谢物的情况不同。可能与愈伤组织颗粒提供合适的次生代谢物生产的内环境有关。因此,从获取次生代谢物来说,只要尽量提高生物量,相应的红景天甙产量也能提高。

由于愈伤组织悬浮培养恒速生长期较长,使得我们对其产率系数 $Y_{X/S}$ (s指蔗糖)及细胞维持系数 m 可以方便地估算出来。

由底物消耗速率方程:

$$-ds/dt = \frac{dx/dt}{Y_{X/S}} + mx$$

当 dx/dt 为常数时, $-ds/dt$ 与 x 成线性关系,以 $-\Delta s/\Delta t \approx -ds/dt$ 对 x 作图,直线斜率即为维持系数 m ,由截矩可求得产率系数 $Y_{X/S}$ 。表1比较了高山红景天愈伤组织与其它植物细胞或组织悬浮培养的 $Y_{X/S}$ 与 m 佳。

2.3 愈伤组织在气升式反应器中悬浮培养的生长及工艺特性

培养于工作体积为3.5L的气升式反应器中进行。由于培养过程中,细胞都以致密颗粒的形态存在,反应器中呈现三相系统的特征,保证愈伤组织颗粒不出现沉积堵塞现象将成为反应器操作的一个重要因素。

部分细胞所测得的红景天甙含量为0.185%,其值只有愈伤组织含量的1/3。30d时愈伤组织细胞出现显著自溶,胞内红景天甙含量也快速减少。

为了进一步考察愈伤组织悬浮培养生长及红景天甙的生成规律,计算了培养过程中的比生长速率 $\mu \approx \Delta X/(X\Delta t)$,生长速率 $dx/dt \approx \Delta x/\Delta t$ 及红景天甙的比生成速率 q ,结果

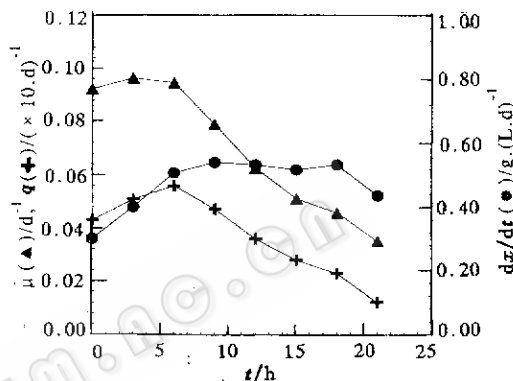


图2 细胞比生长速率,生长速率及红景天甙比生成速率的变化

Fig. 2 Specific growth rate, growth rate and specific synthesis rate of salidroside during suspension culture

表 1 高山红景天愈伤组织与其它植物细胞或组织悬浮培养的 $Y_{S/X}$ 与 m 值比较

Table 1 Comparison of cell yield coefficients and maintenance coefficients of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor with other plant cell and tissue cultures

Plant	$Y_{S/X}/g \cdot g^{-1}$	$m/g \cdot (g \cdot d)^{-1}$	Source or reference
<i>Rhodiola sachalinensis</i> A. Bor	0.66	0.033	This study
Carrot hairy root	0.60	0.085	[9]
<i>Ajuga hairy root</i>	0.77	0.105	[10]
<i>Eschscholtzia californica</i>	0.71	0.074	[11]
<i>Nicotiana tabacum</i>	0.60	0.086	[12]

2.3.1 反应器悬浮培养的时间进程：如图 3 所示，反应器培养最终生物量为 $10.33g \cdot L^{-1}$ ，而蔗糖利用率 (URS) 只有 78%，说明这里生长的停止是由其它限制性因素引起的。与摇瓶培养相比较，目前进行的反应器培养的生物量与红景天甙含量 (0.387%) 均较低。溶氧 (DO) 的变化，如图中所示，在通气量为 $0.833L/min$ 的情况下，培养开始的前 10d DO 下降很慢，由 84% 缓慢降至 75%。10d 后，DO 较快速地下降至 53%，后期又慢慢上升至 65%。DO 的变化对于高山红景天愈伤组织悬浮培养的生长与红景天甙生成的影响需要进一步系统考察，但这里仅用较小的通气量就能使 DO 维持在 50% 以上。保证了细胞生长的需要。3 种不同接种量的培养结果如表 2。

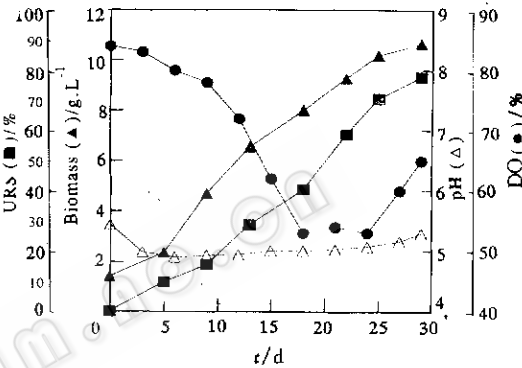


图 3 高山红景天愈伤组织悬浮培养的时间进程

Fig. 3 Time course of callus suspension culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor in an air-lift reactor

表中可见，随接种量的增大，最终生物量明显增加。红景天甙含量也有一定程度的提高。因此在大规模培养中，适当提高初始接种量是非常有利的。

表 2 接种量对愈伤组织悬浮培养的影响

Table 2 Effects of inoculum quantity on callus suspension culture of *Rhodiola schalinensis* A. Bor

Inoculum/ $g \cdot L^{-1}$	Culture time/d	Biomass/ $g \cdot L^{-1}$	Growth rate/ $g \cdot (L \cdot d)^{-1}$	Content of salidroside/%
0.32	35	3.30	0.085	0.320
0.64	29	5.24	0.158	0.342
1.39	29	11.01	0.332	0.387

2.3.2 悬浮颗粒及悬浮液特性：愈伤组织颗粒密度在培养过程中变化不大，其值在 $1.012 \times 10^3 \sim 1.022 \times 10^3 g \cdot L^{-1}$ 之间，与培养液的密度很接近，但含水量（用湿干比表示）随培养的进行明显增大，湿干比最高达 34.3，这与摇瓶培养不同，其湿干比一直维持在 16 左右，其原因有待于进一步研究。

悬浮培养中愈伤组织颗粒的尺寸与环境的流体动力学条件密切相关，在气升式反应器中测得的颗粒尺寸分布如图 4。图中 E_i 为各尺寸段颗粒干重与培养细胞总干重的比

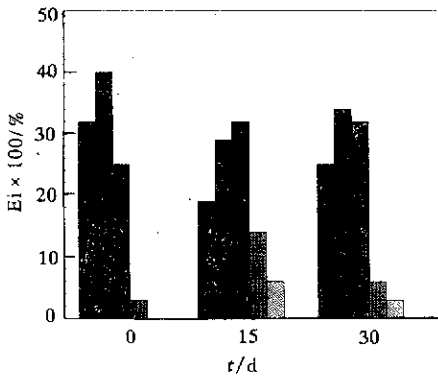


图4 愈伤组织悬浮培养过程中颗粒尺寸分布
Fig. 4 Size distribution of callus grains during suspension culture

Size/mm ■ 0-1 ■ 1-2 ■ 2-3 ■ 3-4 ▨ 4-5

其悬浮起来。这在工程操作上是很有利的。

培养液的密度与粘度变化如图5。图中可见,在整个培养过程中,培养液的密度与粘度变化值均较小。尤其是培养液粘度,与常规植物细胞悬浮培养液相比,其数值是相当小的。这是一个令人注意的地方,因为许多植物细胞发酵培养的后期,植物细胞分泌大量的多糖和蛋白质使培养液粘度增加很大,从而使培养液产生大量气泡,夹带着植物细胞在气液界面形成一层细胞聚集物。既不利于传质传热,严重时还可能发生“逃液”现象。因此,能否消除泡沫过多是进入应用领域的—个关键^[3]。而在高山红景天愈伤组织悬浮培养的整个过程中,细胞似乎并没有分泌大量的多糖及蛋白质,因此几乎不存在“发泡”现象。这为工业化培养带来很大的便利。

2.3.3 反应器培养过程中氧传递系数的变化:愈伤组织反应器悬浮培养液过程中,随生物量的增加会引起系统固含率的大幅度提高,同时细胞代谢分泌物也使培养液的特性发

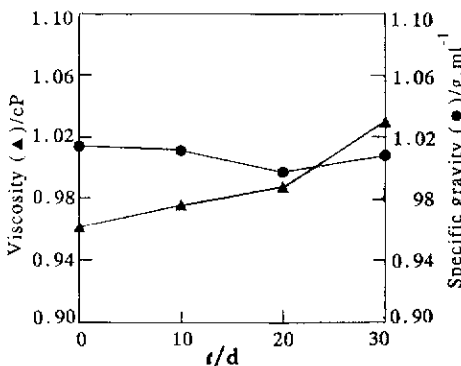


图5 愈伤组织反应器悬浮培养过程中培养液特性的变化

Fig. 5 Characteristics of broth during suspension culture of callus in an air-lift reactor

值。图4表明,愈伤组织颗粒在培养过程中,经历一个由小变大,再变小的过程。刚接种时,颗粒直径基本上都在3mm以内,其几何平均值 $d=1.68\text{mm}$ 。15d时,颗粒明显增大,出现少量直径大于5mm的颗粒,这时的 $d=2.37\text{mm}$ 反应器出现局部堵塞现象。随着培养的进一步进行,愈伤组织颗粒又快速变小,堵塞现象也自行消除,30d时颗粒平均直径 $d=2.09\text{mm}$ 。因此研究愈伤组织颗粒尺寸调控及合适的反应器结构十分必要。

愈伤组织颗粒在培养过程中的沉降速度较小,30d时颗粒在培养液中的平均沉降速度为 $4.2 \times 10^{-3} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$,少量的通气便能使

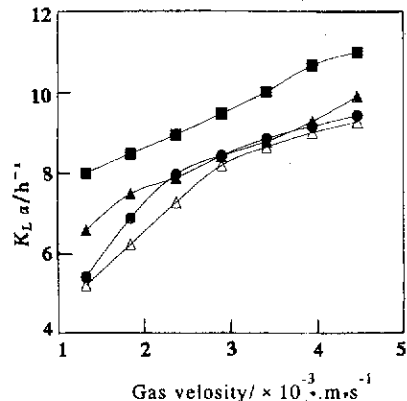


图6 愈伤组织悬浮培养过程中的氧传递系数(K_{La})变化规律

Fig. 6 Variation of oxygen transfer coefficients (K_{La}) during suspension culture

Culture time/d: ▲1 ■ 10 ● 20 △ 30

生改变。为判断由此而引起的培养系统供氧能力的变化,用动态法在线测定了培养过程中 K_{La} 的变化,由于反应器属粗短型,可作为全混釜处理。结果如图 6。 K_{La} 的变化很特殊,在整个培养过程中,先呈增大趋势,后又降低。最大 K_{La} 值对应于固含率为 16.5% (V/V) 时(生物量为 $5.2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。由于培养过程中底液粘度很低,对 K_{La} 值影响不大,而固含率的变化却很大(由 4.5 增加到 40.5%),看来固含率对 K_{La} 值有较大的影响。

3 结 论

高山红景天愈伤组织悬浮培养是能够达到较高的生物量。实验证明,次生代谢物红景天甙生成与细胞生长是呈偶联型;高山红景天愈伤组织生长过程大致可分为指数生长期和恒速生长期,测得恒速生长期的产率系数 $Y_{X/S}=0.66\text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,维持系数 $m=0.033\text{ g} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$;愈伤组织颗粒在反应器培养过程中培养液的粘度变化很小,供氧易于调控,也没有出现“发泡”现象;在气升式反应器培养愈伤组织过程中,颗粒经历一个由小变大,后又变小的过程。平均颗粒直径保持在 $1.68\sim 2.37\text{ mm}$ 之间,容易实验平稳操作。

参 考 文 献

- [1] 明海泉,夏光成,张瑞钧. 中草药, 1988, 19 (5): 35~40.
- [2] Tabata M, Dougall D K. In: Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, Berlin: Springer-Verlag, 1977, 77~85.
- [3] Tanaka H. Process Biochemistry, 1987, 8: 106~113.
- [4] Dornenburg H, Knorr D. Enzyme Microb Technol. 1995, 17: 674~684.
- [5] Emke A, Eilet U. Plant Cell Rep. 1986, 5: 31~37.
- [6] Ishida B K. Plant Cell Rep. 1988, 7: 270~278.
- [7] Hulst A C. Enzyme Microb Technol. 1989, 11: 546~552.
- [8] Khnykina L A. Farmatsiya, 1973, 22 (3): 24~27.
- [9] Uozumi N, Kohketsu K, Kondo O. J Ferment Bioeng, 1991, 72: 457~460.
- [10] Uozumi N, Kohketsu K, Kobayashi T. J Chem Tech Biotechnol, 1993, 57: 155~161.
- [11] Taticek R A, Moo-Young M, Legge R L. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33: 280~286.
- [12] Strouthamer A H, Bettenhausen. Biochem Biophys Acta, 1973, 301: 53~70.
- [13] 陈 斌,范代娣,李宝璋. 第六届全国生物化工学术会议论文集,西安:化学工业出版社,1995, 377~381.

Studies on Kinetics and Technology of *Rhodiola sachalinensis*

A. Bor Callus Suspension Culture

Xu Jianfeng Han Aiming Feng Pusun

(Institute of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract The kinetics of growth and salidroside synthesis for *Rhodiola sachalinensis* A. Bor callus suspension culture were investigated, which resulted in a maximum biomass of $14.02\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with a salidroside content of 0.566%. The synthesis of salidroside was found to be coupled with cell growth. Moreover, cell yield coefficient and maintenance coefficient were estimated as $0.66\text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ and $0.033\text{ g} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ respectively. Callus suspension culture was also conducted in a 3.5L air-lift bioreactor and the technological characteristics were investigated as well. It was found that the viscosity of the medium did not increase greatly during the culture like the conventional plant cell culture. The sizes of callus grains experienced a change from small to greater then back to smaller over the culture process. In addition, the oxygen transfer coefficient (K_{La}) of the reactor during the culture was also discussed.

Key words *Rhodiola sachalinensis* A. Bor, salidroside, callus, suspension culture