

西洋参细胞大量培养的工艺学研究

周立刚 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

较适合于植物细胞悬浮培养的培养液体积为三角瓶总容量的1/5至2/5。氧溶浓度的输出随着温度的增加而增加。西洋参细胞培养液的粘性明显大于无细胞培养液。细胞发酵培养较合适的搅拌速度为60rpm。渗透压的增大会明显地提高细胞培养物的皂甙含量,但对细胞的生长不利。本研究为今后设计出适合于西洋参细胞大量培养的发酵罐提供了重要的依据。

关键词 西洋参; 皂甙; 发酵培养; 悬浮培养

自从1959年Tulecke和Nickell在20L的玻璃瓶中建立了第一个植物细胞大量培养系统,并放大到30L和134L的不锈钢发酵罐来培养植物细胞以来,植物细胞大量培养工艺已经取得了很大的进展,但仍远远落后于微生物发酵技术。大量培养技术的发展不仅是植物细胞培养生产有用物质的技术基础,而且对其生产过程中的成本和经济效益也起着决定性的作用。近年来由于植物细胞大量培养日益趋于实用化,更迫切需要解决植物细胞培养的工艺问题,以使生产过程达到最优化。

西洋参 (*Panax quinquefolium*) 为我国引种栽培的贵重药材,早在1974年Jhang等^[1]曾对西洋参进行了愈伤组织培养的研究,以后郑光植等^[2,3]对其进行了悬浮培养和大量培养的研究,但对西洋参细胞发酵培养的工艺学研究还未见报道。

材料和方法

(一) 实验材料

供试材料为经20次继代培养的西洋参根愈伤组织无性系。继代培养30—40天传代一次。培养基为每升加2,4D 2.5mg/L、KT 0.8mg/L、LH 700mg/L的MS培养

基^[4], 26±0.5℃下暗培养。

(二) 培养方法

第一级为愈伤组织培养,第二级为细胞悬浮培养,第三级为细胞发酵培养。悬浮培养和发酵培养的激素浓度比愈伤组织培养的激素浓度降低一半。悬浮培养采用旋转式摇床,转速120rpm,振幅2.5cm,500ml容积的三角瓶内装培养液100ml。选择生长较好的培养25天的悬浮培养细胞接种到容积为10L的普通搅拌式发酵罐(日本丸菱MD-500-10L型)中进行发酵培养,工作体积为6L,培养时间18天,通气量为0.6—0.8vvm,搅拌速度为60rpm。文中所列结果均为三次重复平均值。

(三) 生长速率、总皂甙含量、糖利用率、氧溶速率、体积氧传递系数和氧溶浓度的测定

1. 生长速率的测定: 细胞培养一段时间后,收获(3000rpm离心10min,弃去上清液,然后过滤),冰冻干燥至恒重。采用绝对生长速率计算公式^[5]。

2. 细胞培养物总皂甙含量的测定: 细胞培养物经冰冻干燥后,粉碎,用正丁醇冷浸2天,经超声波(Soniprep150型

本文于1990年5月4日收到。

超声波仪, 日本)处理 10min, 用大孔吸附树脂 D101(南开大学实验工厂)脱糖, 采用比色法^[6]测定。皂甙含量乘以细胞培养物干重, 即得皂甙产率。

3. 糖利用率的测定: 当细胞培养物收获时, 取其培养液, 按常规的蒽酮法^[7]测定。将所消耗的糖量除以初糖量即得糖利用率(URS)。

4. 氧溶速率(K_d)的测定: 参照文献^[8]用亚硫酸氧化法测定。

5. 体积氧传递系数($k_L a$)的测定: 参照文献^[9]测定。

6. 氧溶浓度(DO)的测定: 采用日本丸菱公司生产的 DO 测定仪(MDIU-DOIC-OO 型)直接测定, 测定的氧溶浓度为相对浓度。

结果与讨论

(一) 不同体积悬浮培养液的氧溶速率(K_d)的测定

在 500ml 容积的三角瓶中装上 50、100、150、200 和 250ml 的培养液, 按正常的细胞悬浮培养条件摇动一定时间后, 测定氧溶速率。结果(图 1)表明, 除装液量 50ml 的氧溶较快、装液量 250ml 的氧溶较慢外, 其余三种装液量的 K_d 值均差别不大。 K_d 值平均为 $8 \times 10^{-7} \text{mole O}_2/\text{atm} \cdot \text{ml} \cdot \text{min}$, 植物细胞的呼吸速率一般为 $0.5 \times 10^{-7} \text{mole O}_2/\text{atm} \cdot \text{ml} \cdot \text{min}$ ^[10], 故如果单从溶氧和需氧方面考虑, 三角瓶中分装 50—250ml 培养液, 在正常悬浮培养条件下, 氧气的供应均能满足植物细胞的生长。但装液量超过 200ml, 培养液会溅出到瓶外。装液量过少(如 50ml), 不但要占用大量的培养空间, 能量利用率大为降低, 蒸发严重。故 500ml 的三角瓶分装 100—200ml 的培养液较适合于植物细胞

悬浮培养, 即培养液体积为三角瓶总容量的 1/5 至 2/5。

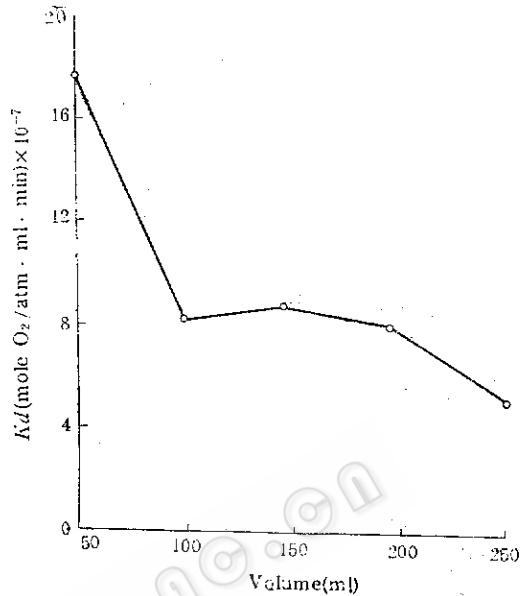


图 1 不同体积悬浮培养液的氧溶速率(K_d)

Fig.1 K_d of the culture broth with different volume

(二) 温度与氧溶(DO)输出的关系

在发酵培养过程中, 测定温度与氧溶(DO)输出的关系(图 2)表明, 当通气量(0.5vvm)和搅拌速度(60rpm)一定, 温度从 18°C 升至 38°C 时, 根据气体在液体中

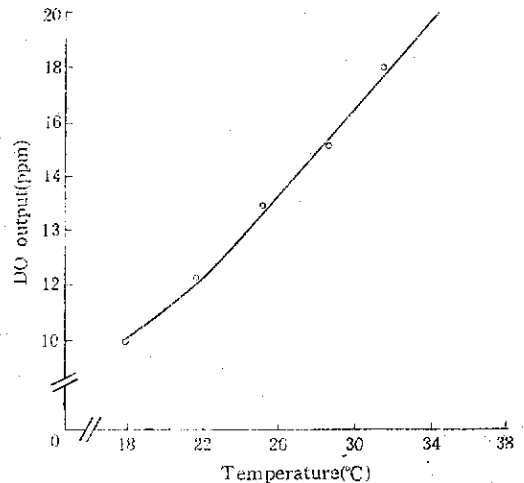


图 2 温度与氧溶(DO)输出的关系

Fig.2 Interrelation between temperature and DO output of the detector

的溶解规律,氧溶浓度应该降低,而氧溶测定仪的DO输出率却增加了90%,故在测定DO值时,一定要使温度恒定在某一数值,这样读数才会有效,以便于比较。

(三)培养液的体积氧传递系数(k_La)与通气速率(vvm)的关系

发酵培养10天时,测定无细胞培养液和西洋参细胞培养液的 k_La 与vvm的关系(图3)表明,随着通气速率的增加,无细胞培养液 k_La 值的上升幅度明显地大于细胞培养液的 k_La 值。这是由于细胞培养液的粘性较大^[11]。细胞培养液的粘性大,加之在培养过程中细胞成团,势必为将来的进一步工业化生产带来困难,也为今后研制适合于西洋参细胞大量培养的发酵罐提供了依据。

(四)不同搅拌速度对西洋参细胞发酵培养的影响

植物细胞种类不同,其抗切变能力是不相同的,加之发酵罐的种类和培养条件不同,因此对每一种植物细胞的最佳生长和次级代谢物的积累都有其适宜的搅拌速度。Kato等^[12]采用搅拌式发酵罐培养烟草(*Nicotiana tobacum*)细胞。其最佳生长的搅拌速度为50—100rpm。我们研究了不同的搅拌速度分别对西洋参细胞

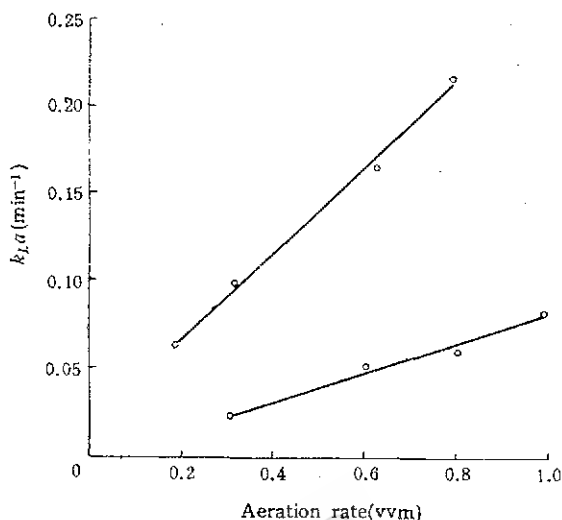


图3 培养液的体积氧传递系数(k_La)与通气速率(vvm)关系

Fig.3 Interrelation of oxygen transfer coefficient (k_La) of culture broth with different aeration rate(vvm)

1. 无细胞培养液 Fresh medium
2. 西洋参细胞培养液 Cell culture broth of *P. quinquefolium*

生长、皂甙含量以及糖利用率情况的影响(表1)。结果表明,60rpm最适合于西洋参细胞的发酵培养,生长速率和糖利用率分别为0.290g dw./L·d和62.58%,均高于其他两个处理,皂甙含量为0.531%略低于其他两个处理,但其皂甙产率27.69mg/L,却远高于其他两个处理。

表1 不同搅拌速度对西洋参细胞发酵培养的影响

Table 1 Effects of different agitating speeds on cell fermentation culture of *P. quinquefolium*

搅拌速度 Agitating speed (rpm)	接种量 Inoculum quantity (gdw./L)	培养物产量 Yield of cultures (gdw./L)	生长速率 Growth rate (gdw./L·d)	皂甙含量 Content of saponin (%)	皂甙产率 Yield of saponin (mg/L)	糖利用率 URS (%)
0	1.388	3.165	0.176	0.651	20.59	45.49
60	1.480	5.220	0.290	0.531	27.69	62.58
120	1.246	2.950	0.164	0.660	19.48	34.28

(五)渗透压的变化对西洋参细胞发酵培养的影响

Frischknecht等^[13]在培养基中加入甘露糖醇以提高渗透压来培养长春花(*Catharanthus roseus*)细胞,以刺激吲

哚生物碱(Indole alkaloid)的生产。我们亦采用甘露糖醇作为提高渗透压的胁迫因子加入到培养液中,大量培养西洋参细胞。结果(表2)表明,当甘露糖醇浓度为37.58g/L,能明显地提高人参皂甙的含

量, 皂甙含量 1.580% 是对照的 3 倍, 但渗透压的提高对细胞的生长不利, 致使生长速率为负, 皂甙产率并不能提高, 这也说明, 细胞的生长要求有一个稳定而又适

宜的渗透压环境。如果西洋参细胞采用两步法培养, 增加第二步生产培养基的渗透压, 在提高人参皂甙的百分含量和产率方面, 也许是一种有效的方法。

表 2 渗透压变化对西洋参细胞发酵培养的影响

Table 2 Effects of osmotic pressure changing on cell fermentation culture of *P. quinquefolium*

甘露糖醇 Mannitol (g/L)	接种量 Inoculum quantity (gdw./L)	培养物产量 Yield of cultures (gdw./L)	生长速率 Growth rate (gdw./L·d)	皂甙含量 Content of saponin (%)	皂甙产量 Yield of saponin (mg/L)
0.00	1.480	5.22	0.290	0.531	27.69
37.58	1.649	1.34	negative	1.580	21.17

总之, 我们采用的机械搅拌式发酵罐适合于西洋参细胞的大量培养, 其皂甙的工业化生产是可能的。今后, 对发酵罐的

放大、培养技术和步骤、设备的配套、培养条件的优化以及提高劳动生产率等问题都有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Jhang, J. J. et al.: *In Vitro*, 9(4):253—259, 1974.
- [2] 郑光植等: 云南植物研究, 11(1):97—102, 1989.
- [3] 周立刚等: 生物工程学报, 6(4):316—321, 1990.
- [4] Murashige, T. and Skoog, P.: *Physiologia Plantarum*, 15(3):473—497, 1962.
- [5] Singer, S. R.: *Canadian Journal of Botany*, 64(1):233—237, 1986.
- [6] 章观德: 药学学报, 15(8):175—180, 1980.
- [7] Tsignos, C. P. and Muir, H.: *Analytical Biochemistry*, 17(3):495—501, 1966.
- [8] Zabriskie, D. W.: In "Comprehensive Biotechnology, Vol. 2, The Principles of Biotechnology, Engineering Considerations" (Cooney, C. L. et al. eds.), pp. 175—190, Pergamon Press Ltd., 1985.
- [9] 田口久治, Humphrey, A. E.: 化学工学, 30(10):869—875, 1966.
- [10] Scragg, A. H. and Fowler, M. W.: In "Cell Culture and Somatic Cell" *Genetics of Plants*, Vol. 2, Cell growth, Nutrition, Cytodifferentiation and Cryopreservation" (Vasil, I. K. ed.), Academic Press, Inc. (London) Ltd., pp. 103—128, 1988.
- [11] Kodama, T.: In "Proceedings of China-Japan Symposium on Plant Biotechnology", Shanghai, China, pp. 22—25, 1989.
- [12] Kato, A. et al.: *Journal of Fermentation Technology*, 54(1):82—87, 1976.
- [13] Frischknecht, P. M. et al.: In "6th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture" (Domer, D. A. et al. eds.), University of Minnisota, U. S. A., p. 201, 1986.

Study on Technology of Mass Cell Culture of *Panax quinquefolium*

Zhou Ligang Zheng Guangzhi

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

The Culture broth volume fitted to cell suspension culture of plants was 1/5 to 2/5 of shake flask capacity. The dissolved oxygen (DO) output of the detector increased with the increasing of the temperature. The viscosity of *Panax quinquefolium* cell cultures was higher than that of the fresh medium obviously. An appropriate agitating speed was 60 rpm in fermentation culture of *P. quinquefolium* cells. When we applied an osmotic stress by the addition of mannitol to the nutrient medium in fermentation culture, the content of saponin of the cell culture was increased greatly but the cell growth was inhibited. The studies should provide a series of data to design an appropriate fermentor to culture *P. quinquefolium* cells in large scale.

Key words

Panax quinquefolium; saponin; fermentation culture; suspension culture