

10 升气升环流式生物反应器培养紫草细胞

戚树源 林立东

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

梁世中 高建华 高孔荣

(华南理工大学, 广州 510641)

摘要 本文采用自行设计研制的 10 升气升环流式生物反应器培养紫草细胞, 培养周期 34 d。前 14 d 为细胞生长培养, 细胞生长呈正常的 S 型曲线, 细胞增长到原细胞接入量的 4 倍。后 20 d 为紫草色素生产培养, 细胞增长到 3.2 倍。整个周期每升培养液可生产紫草色素 0.6 g。在反应器中, 培养液 pH 值的变化与细胞生长呈正相关, 与紫草色素的形成呈负相关, pH 值变化规律可用于监测紫草细胞在生物反应器的生长和色素形成。

关键词 气升式环流生物反应器; 细胞悬浮培养; 紫草; 紫草素

CELL SUSPENSION CULTURE OF *LITHOSPERMUM ERYTHRORHIZON* IN A 10-LITRE AIRLIFT LOOP BIOREACTOR

Qi Shuyuan Lin Lidong

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Liang Shizhong Gao Jianhua Gao Kongrong

(South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract A 10-litre airlift loop bioreactor was tested for cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon*, the procedure of which was divided in two steps. In the first 14 days, the cells were cultured with modified B₅ medium, the cell increment being 4 times as compared with the 2.5 g L⁻¹ of inoculating cells (dwt). In latter 20 days, the cells were cultured with modified M₉ medium, in which the amount of cells increased again 3.2 times as compared with that at the end of culture in this medium, and 0.6 g of shikonin derivatives per litre of medium can be obtained in a culture cycle. The pH in modified B₅ growth medium rose with cell increasing in bioreactor. The change in pH of B₅ medium had positive relation to the amount of cell growth. On the contrary, pH in M₉ medium declined with the time-course of the formation of shikonin derivatives, which had a negative relation between pH and shikonin formation. It is suggested that the property of cell growth and the formation of shikonin derivatives could be detected by the pH level in the medium of cell suspension cultures in bioreactor.

广东省科委“八·五”攻关项目

1996-05-27 收稿; 1996-10-21 修回

Key words Airlift loop bioreactor; Cell suspension culture; *Lithospermum erythrorhizon*; Shikonin

植物是医药、香料、色素、调味剂、化妆品、农药等天然产物的重要自然资源, 植物细胞培养是近 20 年来为进一步开发和利用植物界丰富的天然资源而发展起来的新技术。目前, 应用植物细胞培养实现商业化大规模生产天然产物最重要的技术之一是研制适用于植物细胞大规模培养的生物反应器。本文报道应用自制的 10 升气升环流式生物反应器研究紫草细胞生长规律及有关生理因子对紫草细胞生长及紫草素形成的影响, 为应用生物反应器培养植物细胞调控和检测机制提供依据。有关生物反应器的研制及冷模试验研究将另文报道。

1 材料和方法

实验材料 紫草细胞是从广西全县采集的紫草 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.) 叶诱导的愈伤组织, 经多次二步法和平板培养筛选产生。在固体培养中, 该细胞系松散, 用从固体培养的紫草细胞直接投入液体培养, 分散状态好, 细胞最大聚集半径小于 5 mm, 适用于细胞悬浮培养及生物反应器细胞悬浮培养。

10 升气升环流式生物反应器 反应器内外径比为 0.7, 高径比为 11.4, 主要材料为不锈钢, 用电热锅炉发生的蒸汽灭菌。空气采用三级过滤除菌, 空调器控制培养室温度。

培养液 细胞生长培养液为修改的 B₅, 添加 B₁ 1 mg L⁻¹, IAA 2×10⁻⁵ mol/L, KT 5×10⁻⁷ mol/L。细胞色素生产培养液为修改的 M₉, 添加 IAA 1×10⁻⁶ mol/L, KT 5×10⁻⁶ mol/L。

摇瓶悬浮培养 紫草细胞摇瓶悬浮培养在旋转式摇床进行, 150 ml 三角瓶加入 30 ml 培养液, 或 500 ml 三角瓶加入 60 ml 培养液, 转速 100 r/min, 振幅 2.5 cm, 24±2℃ 暗培养。紫草细胞在生长培养液培养 14 d, 在紫草色素生产培养液培养 20 d。

生物反应器培养 采用两步法培养, 第一步加入 7 L 紫草细胞生长培养液和经摇瓶培养一代的紫草细胞, 加入细胞量为 21 g L⁻¹ (鲜重, 相当于细胞干重 2.5 g L⁻¹), 培养 14 d。第二步利用装设于反应器的滤网过滤, 放出第一步加入的培养液, 并用适量无菌水冲洗, 除去残留反应器中的紫草细胞生长培养液, 再加入紫草色素生产培养液 7 L, 并通过样品管调节反应器中细胞量为 50 g L⁻¹ (鲜重, 相当于细胞干重 6 g L⁻¹), 培养 20 d。反应器内压为 0.03–0.045 mPa, 通风流速为 0.1–0.2 vvm, 培养温度为 23–25℃。图表中数据为三次实验的平均值。

pH 及电导率测定 用 Corning pH meter 120 和上海雷磁仪器厂 DDS-11A 型电导率仪测定。

紫草细胞色素及培养液色素测定 收获的紫草细胞置低温干燥, 称取一定量进行色素测定。培养液通过 30 目筛, 滤液用乙醚萃取至无色, 蒸馏回收乙醚, 用乙醇溶解定容, 参照 Tabata 方法^[1]测定紫草色素, 在上海分析仪器厂 751 型分光光度计上进行。

2 结果和讨论

2.1 pH 对紫草细胞生长和色素形成的影响

在紫草细胞培养中, 虽然 pH 值随细胞生长周期及细胞色素的形成有规律地变化, 摇瓶培养

过程 pH 变化见图 1, 2, 但培养液的起始 pH 值对紫草细胞生长及紫草色素的形成均有影响, 其最适的起始值(灭菌前)分别是 6.8 和 6.06 (表 1, 2)。在紫草细胞生长和紫草色素形成中, 培养液的最适 pH 值不同, 而且 pH 值变化规律也不同。在紫草细胞生长培养液中, pH 值在细胞生长前 4 d 急剧下降, 此时细胞处于延迟生长期, 第 4 天以后, pH 值快速上升, 细胞开始进入对数生长期, 细胞生长培养液 pH 值的变化与紫草细胞生长呈正相关(图 1)。在紫草色素生产培养液中, 随着细胞中紫草色素的增加, 培养液中 pH 值有规律地下降, pH 值在前 6 d 下降较慢, 第 6 天至 14 天下降较快, 这时紫草色素形成处于对数期, 紫草色素形成增长迅速, 14 d 后, 培养液 pH 值开始平稳, 紫草色素增长也处于平稳。紫草色素生产培养液 pH 值与紫草细胞色素增长呈负相关(图 2)。

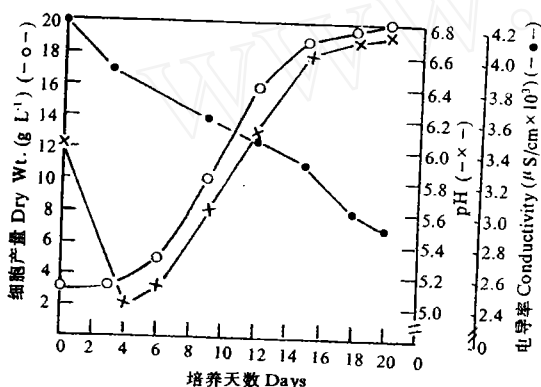


图 1 紫草悬浮培养细胞生长与培养液 pH 和电导率变化曲线
Fig. 1 Cell growth, pH and conductivity in medium of *L. erythrorhizon* cell suspension culture

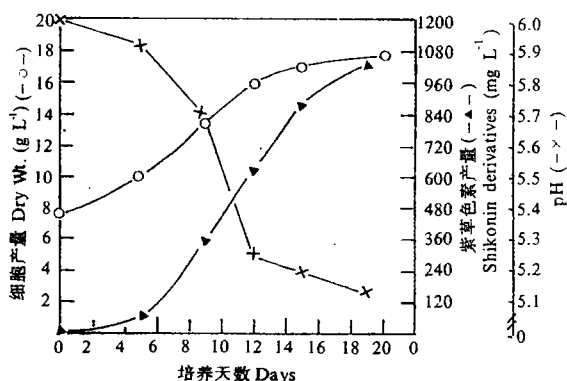


图 2 紫草悬浮培养细胞生长, 紫草色素形成和 pH 变化曲线
Fig. 2 Cell growth, shikonin production, and pH in medium of *L. erythrorhizon* cell suspension culture

表 1 pH 对细胞生长的影响

Table 1 Effect of pH level on cell growth in cell suspension cultures of *L. erythrorhizon*

	pH				
消毒前 Before autoclaving	5.5	5.8	6.3	6.8	7.5
消毒后 After autoclaving	5.21	5.42	5.66	6.0	6.5
培养结束时 At the end of culture	5.81	6.31	6.51	6.6	6.8
细胞(15 d)生长率 Growth rate within 15 days	2.7	3.7	3.9	4.2	4.0

表 2 pH 对紫草色素形成的影响

Table 2 Effect of pH level on production of shikonin derivatives in cell suspension cultures of *L. erythrorhizon*

pH (消毒前) pH before autoclaving	5.03	5.52	6.06	6.53	7.01	7.54
紫草色素产量(20 d) Shikonin derivatives within 20 days (mg L ⁻¹)	590	640	667	642	580	543

10 升气升环流式生物反应器中培养液 pH 值变化规律大体与上述相同(图 3, 4)。在生物反应器中, 紫草细胞色素生产培养液 pH 值在前 10 d 呈现升高, 然后逐渐下降, 这可能是反应器的通气供氧和混合剪切作用及摇瓶的差异引起的。

在植物细胞培养过程中, 培养液中 pH 值的变化通常是由于培养液中氮源的消耗产生的。当植物细胞在以 NO₃⁻ 为主要氮源的培养液中培养, 培养液的 pH 值随植物细胞生长上升^[2]。紫草细

胞生长培养液是以 NO_3^- 为主要氮源的 B_5 修改培养液, 上述结果与该报道一致。在紫草色素生产培养液中, 虽然修改的 M_9 培养液也是以 NO_3^- 为主要氮源的培养液, 但是, 培养液 pH 值随紫草细胞色素增加及紫草细胞增长而下降, 这可能是色素生成过程伴随有酸性副产物生成以及紫草色素的萘醌环显酸性所致, 这有待进一步研究。

在生物反应器中, 紫草细胞培养液 pH 值与紫草细胞生长及紫草色素在细胞中形成相关的规律, 可用于监测紫草细胞生物反应器大规模培养中紫草细胞生长及紫草色素生产动态, 为生物反应器扩大设计提供一个方便有效的检测依据。在紫草细胞培养中, 虽然培养液电导率变化与紫草细胞增长相关(图 1, 3), 但在紫草色素生产培养液中, 紫草细胞产生的紫草色素却直接干扰培养液中电导率的测定。

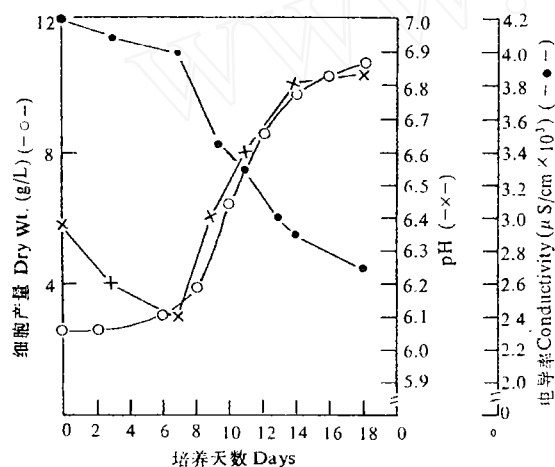


图 3 10 升气升环流式反应器紫草细胞生长, 培养液 pH 和电导率变化曲线

Fig. 3 Cell growth, pH and conductivity in medium of *L. erythrorhizon* cell culture in 10-litre airlift bioreactor

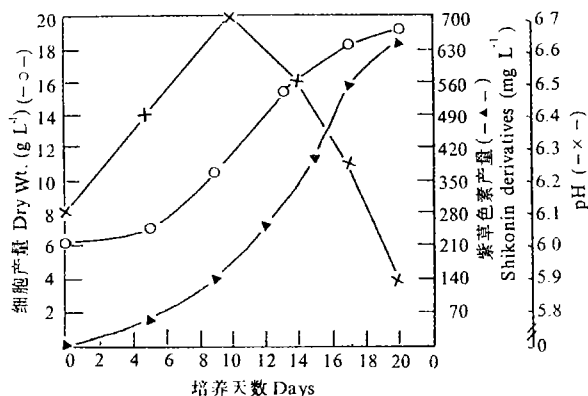


图 4 10 升气升环流式反应器紫草细胞生长, 紫草色素形成和 pH 变化曲线

Fig. 4 Cell growth, shikonin production, and pH in medium of *L. erythrorhizon* cell culture in 10-litre airlift bioreactor

2.2 紫草细胞生长及紫草色素的形成

在 10 升气升环流式生物反应器中, 紫草细胞生长呈正常的 S 生长曲线, 每升培养液 14 d 生长期可获得 10 g (干重) 细胞, 对于每升接入 2.5 g (干重) 细胞而言, 细胞增长到 4 倍(图 3)。在生物反应器中, 紫草细胞生长率比摇床培养的紫草细胞略低, 在摇床培养中, 每升培养液 14 d 生长期可获 18 g (干重) 细胞, 对比每升接入 2.5 g (干重) 细胞, 细胞增长到 7.2 倍(图 1)。在反应器培养中, 紫草细胞延迟期为 7 d, 在摇瓶培养中只有 4 d, 延迟期过长可能是影响生物反应器中细胞产量的原因之一。增加紫草细胞在反应器中继代培养次数有可能缩短紫草细胞在生物反应器中生长的延迟期, 增加紫草细胞产量。

维持生物反应器一定的内压水平是保持反应器内无菌状态的重要手段之一。在紫草细胞生物反应器培养中, 在不大于 0.05 mPa 内压下, 紫草细胞生长良好。

在紫草色素生产培养液中,紫草细胞生长与紫草色素的形成同步(图4),20 d的生长期中,生物反应器培养的紫草细胞增长到3.2倍,而在摇瓶培养的紫草细胞只增长到2.5倍(图2)。紫草细胞在生物反应器的整个培养周期中增长了12.8倍。最近,陈士云等人应用英国设计制造的5升外循环气升式反应器培养新疆紫草细胞,整个培养周期干重增加7.3倍^[3]。但在反应器中紫草色素产量只相当于摇瓶培养的2/3,紫草细胞在生物反应器中形成色素较慢,其色素形成S曲线不明显,其原因有待进一步研究。

参考文献

- 1 Tabata M, Mizudami H, Hiraoka N et al. Pigment formation of callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, 1974, 13:927-932
- 2 Treat W J, Engler C R. Culture of photomixotrophic soybean and pineina modified fermentor using a novel impeller. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 34:1191-1202
- 3 陈士云, 侯嵩生, 叶和春等. 外循环气升式反应器培养新疆紫草细胞. *生物工程学报*, 1994, 10(1):81-86