

长春花细胞大型生物反应器培养的初步研究*

曹 阳¹, 侯 军¹, 郑珍贵², 刘 涂², 张 兴¹

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 712100; 2 上海中医药大学 中医药研究所, 上海 200032)

[摘 要] 采用 70 L 环形通气搅拌生物反应器对长春花细胞的大规模悬浮培养进行了初步的研究, 2 次培养取得成功, 培养周期 15 d, 最大 PCV 值达 52%, 生物量鲜重 205.6 g/L。研究结果表明, “种子”细胞的接种时期和培养基中的蔗糖质量浓度对培养细胞在 70 L 反应器中的生长影响很大。从所做的 2 次成功培养分析, 将培养基的蔗糖质量浓度由 20 g/L 提高到 25 g/L, 按 15% 的接种量接种正处于生长指数初期的细胞, 在 70 L 反应器中培养的长春花细胞长势最好, 最大 PCV 值为 52%, 最终生物鲜重 205.6 g/L。

[关键词] 长春花; 大规模培养; 生物反应器

[中图分类号] Q 943.1; Q 813.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)02-0087-04

长春花(*Catharanthus roseus*)是夹竹桃科长春花属植物, 中医临床以全草入药, 有镇静安神、平肝降压及抗恶性肿瘤的作用^[1]。自 20 世纪 50 年代以来, 人们发现长春花中所含的多种次生代谢产物对白血病、恶性淋巴瘤及其他癌症具有相对较好的疗效^[2], 从而对其产生了浓厚的兴趣。至今为止, 在长春花细胞和组织培养物中共发现了 60 多种次生代谢产物^[3], 使长春花成为研究吲哚生物碱合成的模式植物^[4]。由于原植物中的有效成分含量较低, 人们在细胞培养方面对长春花进行了大量的研究, 使之成为植物细胞工程研究的模式系统^[5]。随着对长春花细胞培养实验室小试研究的不断深入, 通过植物细胞工程途径产业化的关键步骤——细胞大规模培养的研究已逐渐上升到了科研的日程。本试验与上海中医药大学中药研究所合作, 在国内首次对长春花细胞系进行了 70 L 较大规模的生物反应器中试培养, 培养获得了成功, 这使我国对长春花植物细胞工程的研究向产业化前进了一大步。利用我国自行研制的生物反应器对植物细胞超过 50 L 的大规模培养取得成功尚属首例。

1 材料与方 法

1.1 材 料

长春花 C_{20hi} 细胞系由上海中医药大学中药研究所提供, 该细胞系激素自养, 在 B₅ 基本培养基中即可快速生长^[5]。

1.2 方 法

1.2.1 细胞种源的准备 固体愈伤组织在盛有 B₅ 基本固体培养基(琼脂 8 g/L、蔗糖 20 g/L、灭菌前 pH 5.6)的 250 mL 三角瓶中继代保种, 每 21 d 继代 1 次。将固体愈伤组织接种于盛有液体 B₅ 基本培养基(蔗糖 20 g/L、灭菌前 pH 5.6)的 250 mL 三角瓶中, 于转速 120 r/min 的摇床上进行暗培养, 温度(25±1)℃, 进行液体悬浮细胞一级种源的准备。20 d 后同前继代一次, 培养 15 d。将一级种源接种于盛有液体 B₅ 基本培养基的 500, 1 000, 3 000, 5 000 mL 三角瓶中, 接种量以新鲜培养基的 1/8~1/6 为宜, 同前于转速 120 r/min 的摇床上进行暗培养, 温度(25±1)℃, 进行液体悬浮细胞二级种源的准备, 培养 15 d 达到所需的种源量(见附图 1)。

1.2.2 70 L 生物反应器的培养 70 L 生物反应器由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心与镇江东方生物工程有限公司共同设计研制, 工程体积 70 L, 工作体积 50 L, 采用环形通气与直径 50 cm 螺旋型桨叶搅拌相结合(见附图 2)。实验前经管路蒸气灭菌(121℃, 30 min), 反应器罐体蒸气空消(121℃, 30 min), 加入 B₅ 基本培养基原位蒸气灭菌(121℃, 30 min)。按培养体积 10%~15% 的接种量接入二级种源细胞, 通气量 0.15 L/(L·min), 搅拌速度 65 r/min, 温度(25±1)℃ 暗培养, 培养周期 330~370 h。

1.2.3 反应器中细胞生长测定 从接种时开始每

* [收稿日期] 2001-04-04

[基金项目] 企业协作项目

[作者简介] 曹 阳(1974-), 男, 江苏海安人, 在读硕士, 主要从事植物生物工程研究。

24~ 48 h 取样 100 mL 培养液进行细胞生长的测定; 沉降体积(PCV): 将取得样静置 30 min, 测定沉降细胞所占总样的体积分数; 鲜重: 将测定 PCV 后的样品真空抽滤(通过定性滤纸)后称取细胞重量。

1.2.4 培养过程 pH 及溶氧监测 培养过程中随时进行人工生长状况的监测, 培养系统的 pH 及溶氧参数由反应器控制系统自动监测, 每 1 h 监测记录 1 次。pH 传感探头为梅特勒(METTLER)公司制造, 溶氧传感探头由中国科学院上海冶金所信茂

新技术公司制造。

2 结果与分析

本试验 2 次培养获得了成功: 第 1 次培养培养基蔗糖质量浓度为 20 g/L、接种细胞量为培养体积的 9.0%; 第 2 次培养培养基蔗糖质量浓度为 25 g/L, 接种细胞量为培养体积的 14.5%。培养收获的细胞见附图 3, 4, 对 2 次培养的监测数据记录见表 1。

表 1 长春花细胞 70L 生物培养反应器 2 次培养监测记录

Table 1 Stability of growth of *Catharanthus roseus* cultivated twice in 70L bioreactor

第 1 次培养 First culture					第 2 次培养 Second culture				
时间/h Time	pH 值 pH value	溶氧 百分值/% Dissolved oxygen	取样 PCV / % PCV	取样鲜重/ (g · L ⁻¹) Fresh weight	时间/h Time	pH 值 pH value	溶氧 百分值/% Dissolved oxygen	取样 PCV / % PCV	取样鲜重/ (g · L ⁻¹) Fresh weight
0	5.32	100	9.0	32.0	0	4.76	100	14.9	32.9
12	5.56	100	8.5	31.3	12	5.96	100	14.5	32.7
43	5.62	99.3	7.8	32.1	36	6.12	99.1	13.5	34.6
77	5.90	99.6	9.0	34.0	60	6.02	99.4	14.0	41.8
119	5.90	96.6	10.0	35.3	84	6.06	96.6	14.0	48.1
168	6.48	88.7	17.5	55.0	111	6.22	89.7	17.5	56.4
212	6.80	76.1	25.0	89.0	135	6.38	73.1	18.0	57.1
246	7.36	74.4	27.0	107.7	160	6.51	74.0	24.0	80.4
267	7.66	76.0	32.0	124.9	184	6.59	75.3	26.0	82.4
291	7.94	87.1	32.0	131.6	207	6.22	72.1	28.2	104.9
312	8.10	88.8	40.0	133.0	231	6.63	87.1	34.0	124.0
334	8.22	94.0	37.0	130.7	255	6.71	89.0	36.8	141.1
					279	6.76	89.5	40.5	188.0
					302	6.62	88.9	44.0	164.7
					325	6.42	94.0	52.0	187.1
					347	6.16	96.7	52.0	205.6
					370	6.06	98.2	52.3	204.8

从 2 次培养的结果分析可得: 细胞的接种时期对细胞在 70L 反应器中的生长影响很大。第 1 次反应器培养的接种细胞处于生长指数的中期, 细胞在反应器中生长到 267 h 达到指数末期, 最大生物量鲜重 133.0 g/L, 而第 2 次反应器培养的接种细胞处于生长指数的初期, 细胞在反应器中生长到 347 h 达到指数末期, 最大生物量鲜重 205.6 g/L。从生长情况和最终生物产量上比较, 第 2 次培养明显好于第 1 次, 这可能是由于处于生长指数初期的细胞具有较高的活力, 而处于生长指数中期的细胞活力相对降低的原因所致。

初始细胞接种量对细胞在 70L 反应器中的最终产量可能造成较大的影响。第 1 次反应器培养的接种量为培养体积的 9.0%, 达到生长指数末期

的最终生物产量 PCV 值为 40%, 鲜重为 133.0 g/L; 第 2 次反应器培养的接种量为培养体积的 14.5%, 达到生长指数末期的 2 次培养监测数据记录结果, 由于 2 次接种量的差异, 造成培养细胞在有限分裂生长代数中细胞增长基数的不同, 从而导致最终细胞生物产量的差异。

培养基中的蔗糖质量浓度在不影响细胞正常生长的范围内, 相对高一些可以提高 70L 反应器中培养细胞的最终产量。第 1 次反应器培养的培养基蔗糖质量浓度为 20 g/L, 最终生物产量 PCV 值为 40%, 鲜重为 133.0 g/L; 第 2 次反应器培养的培养基蔗糖质量浓度为 25 g/L, 最终生物产量 PCV 值为 52.3%, 鲜重达 205.6 g/L。分析造成 2 次培养最终生物产量差异的另一原因是, 第 2 次培养的培养

基蔗糖质量浓度较第 1 次培养高 5 g/L , 为培养细胞的生长提供了更多的物质能量。这与摇瓶中的细胞培养研究结果相一致^[6]。

通过培养体系的 pH 值及溶氧监测, 可以间接了解培养反应器中的细胞生长情况。从笔者所做的 2 次培养来看, 处于指数生长期的培养体系 pH

值为 $6.1 \sim 7.0$, 高于 7.0 后细胞开始衰老且表观颜色逐渐变黄。随着培养细胞的加速生长, 培养体系的溶氧水平逐渐降低, 这可能与细胞分裂旺盛时消耗较多的氧气有关, 当细胞开始衰老生长减慢的同时, 培养体系的溶氧水平也随之逐渐升高。

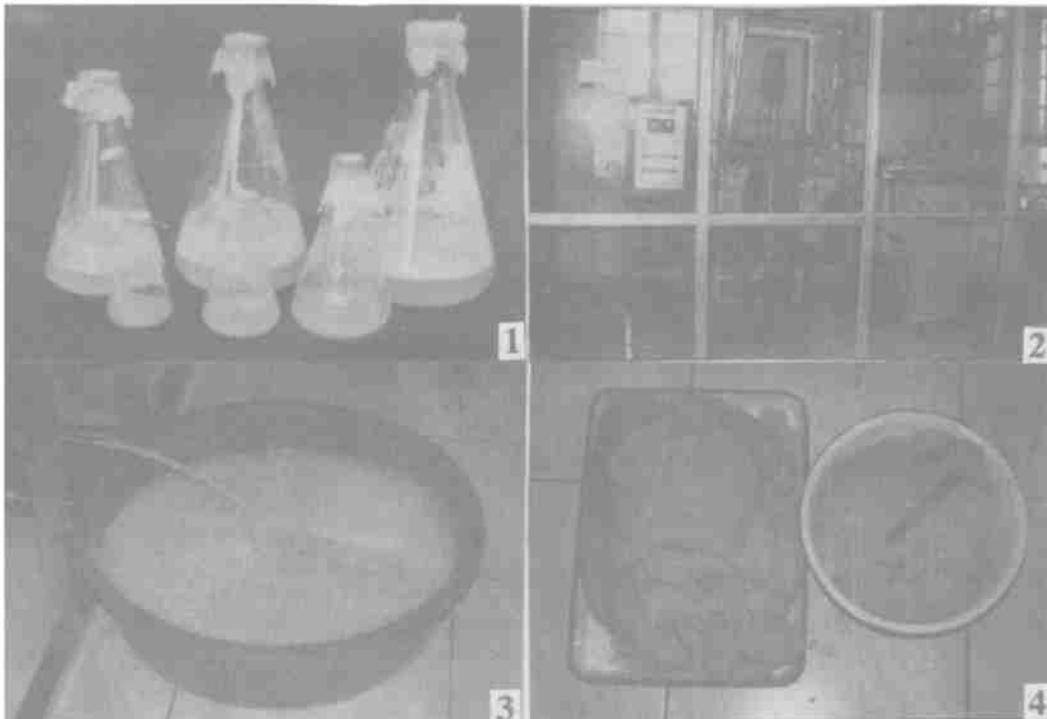


图 1~ 4 长春花细胞 70 L 生物反应器的培养

1. 一级种源和二级种源; 2 70 L 生物反应器; 3 培养 1 周后收获细胞; 4 1 次培养收获的鲜细胞;

Figs 1- 4 Cultivation of *Catharanthus roseus* cells cultivated in 70 L bioreactor

1. Seed of *Catharanthus roseus* cells for the batch culture; 2 70 L stirred tank bioreactor; 3 Harvesting after one batch culture period; 4 Fresh cell of one batch culture harvest

3 结 论

总结所做的 2 次成功培养可知, 和摇瓶培养^[5]相比, 70 L 反应器中培养细胞的诱导期较长, 在不影响细胞正常生长的范围内培养基的蔗糖质量浓度较高, 有利于长春花细胞的生长, 这一结果与摇瓶中

的细胞生长类似^[6]。在 70 L 反应器中培养长春花细胞, 将培养基的蔗糖质量浓度提高到 25 g/L , 按培养体积 15% 左右的接种量, 接种正处于生长指数初期的细胞比较合适, 反应器中培养的细胞生长快且最终生物产量高。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 456- 458
- [2] Johnson J S, Wright H F, Svoboda G H. Experimental basis of clinical evaluation of antitumor principles derived from *Vinca rosea* L. [J]. J Lab Clin Med, 1959, 45: 830
- [3] Verpoore R, Van der Heijden R, Schripsem A J, et al. Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospect[J]. Nat Prod, 1993, 56: 186- 207.
- [4] 周 焜. 溶氧浓度对长春花培养细胞的影响[D]. 上海: 上海中医药大学, 2000

- [5] 郑珍贵. 长春花细胞大规模培养和外界因质的影响[D]. 上海: 上海中医药大学, 1997.
- [6] 郑珍贵, 缪红, 杨文杰, 等. 营养和环境因子对长春花激素自养型细胞生长和阿玛碱生成的影响[J]. 植物学报, 1999, 41(2): 184-189.

Primary study on large scale culture of *Catharanthus roseus* cells in 70 litre bioreactor

CAO Yang¹, HOU Jun¹, ZHENG Zhen-gui², LIU Di², ZHANG Xing¹

(1 Biotechnological Pesticide Research and Service Center, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Chinese Medicinal Materials, Shanghai Traditional Chinese Medicine University, Shanghai 200032, China)

Abstract: *Catharanthus roseus* cells was successfully cultivated in a 70 L stirred tank bioreactor. The batch culture period is 15 days, the maximal PCV is 52%, and the maximal biomass is 205.6 g/L in fresh. From our study, we draw the conclusion that the growth phase of "seeds" cell can greatly affects cell growth of cultures. High concentration of initial sucrose increased biomass accumulation. The suitable inoculum of *Catharanthus roseus* cells is 15% at initial exponential growing process.

Key words: *Catharanthus roseus*; large scale culture; bioreactor

西北农林科技大学 2000 年科技论文数位居全国高校第 38 名

据 2001 年 12 月中国科技信息研究所 2000 年度中国科技论文统计与分析年度报告报道, 我校 2000 年科技论文数位居全国高校第 38 名, 在全国农业高校中位居榜首, 详见下表。

附表 2000 年我国高校科技论文数前 50 名

名次	高等学校	论文数	名次	高等学校	论文数
1	浙江大学	3 168	27	国防科技大学	969
2	华中科技大学	3 144	28	北京航空航天大学	935
3	清华大学	2 967	29	西北工业大学	914
4	北京大学	2 754	30	苏州大学	879
5	上海交通大学	2 586	31	石油大学	841
6	西安交通大学	2 078	32	大连理工大学	827
7	四川大学	2 062	33	武汉理工大学	798
8	哈尔滨工业大学	2 017	34	重庆大学	798
9	复旦大学	1 973	35	郑州大学	742
10	武汉大学	1 943	36	东北大学	734
11	中南大学	1 849	37	中国医科大学	710
12	第四军医大学	1 759	38	西北农林科技大学	706
13	同济大学	1 701	39	中山大学	704
14	吉林大学	1 579	40	中国地质大学	645
15	山东大学	1 499	41	中国农业大学	643
16	天津大学	1 458	42	南京医科大学	632
17	中山医科大学	1 444	43	北京理工大学	623
18	第二军医大学	1 394	44	北京科技大学	610
19	华南理工大学	1 284	45	南开大学	578
20	上海第二医科大学	1 272	46	中国矿业大学	561
21	中国科技大学	1 264	47	南京理工大学	555
22	东南大学	1 222	48	华东理工大学	551
23	第三军医大学	1 209	49	上海大学	547
24	南京大学	1 169	50	北京交通大学	507
25	第一军医大学	1 130	50	北京师范大学	507
26	首都医科大学	988			