

三七细胞大量(发酵)培养的研究

周立刚 郑光植 王世林 甘烦远 徐 纯

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要

三七 (*Panax notoginseng*) 细胞发酵培养的皂甙含量为干重的 11.21%, 皂甙产率为 $1513.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞培养物产率为每月 $13.58\text{g 干重} \cdot \text{L}^{-1}$, 均比悬浮培养高。接种量的增加能明显地提高生长速率、皂甙产率以及细胞培养物产率。通气速率 0.8vvm 较适合于三七细胞的发酵培养。在发酵培养过程中 pH 值由 5.8 逐渐降至 3.92, 没有出现回升。

关键词 三七; 发酵培养; 皂甙; 生长速率

STUDIES ON FERMENTATION CULTURE OF CELLS OF *PANAX NOTOGINSENG*

Zhou Li-gang, Zheng Guang-zhi, Wang Shi-lin, Gan Fan-yuan and Xu Chun

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract

The saponin content of *Panax notoginseng* cell cultures was 11.14% of dry weight, the saponin yield was $1513.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and yield of cell cultures was $13.58\text{g dry wt} \cdot \text{L}^{-1}$ per month in fermentation culture, which were all better than those obtained from in suspension culture. Increasing inoculum quantity could obviously increase growth rate, saponin content and yield of cell cultures. An aeration rate of 0.8vvm was optimal for fermentation culture of the cells. The pH value of the culture broth went down from 5.80 to 3.92 gradually and never returned in fermentation culture of *P. notoginseng* cells.

Key words *Panax notoginseng*; Fermentation culture; Saponin; Growth rate

三七 (*Panax notoginseng*) 属五加科 (Araliaceae) 人参属植物, 是我国特有的名贵中药, 主产云南。三七主要有效成分为皂甙。近年来由于三七医疗作用不断扩大, 加之人工栽培困难, 因此有必要进行三七细胞大量(发酵)培养及工业化生产皂甙的研究。郑光植等 (1978, 1989)^[1-3]曾对三七的愈伤组织培养和细胞悬浮培养进行过一系列的研究,

本文于 1990 年 5 月收到, 同年 8 月收到修改稿。

充分证实了三七培养细胞生产其主要次级代谢产物皂甙的全能性,但对三七细胞的大量培养生产皂甙的研究还未见报道,本文将为实现三七次级代谢产物皂甙的工业化生产提供依据。

材 料 和 方 法

(一) 实验材料

供试材料为经筛选后的优良无性系^[3],继代培养 30 至 40 天转代一次。培养基为每升附加 2,4-D2ppm、KT 0.1ppm、椰乳 10% 的 MS 培养基^[9],于 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 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均比愈伤组织培养的激素浓度降低一半。采用旋转式摇床进行悬浮培养,转速为 120rpm,振幅 2.5cm,500ml 容积的三角瓶内装培养液 100ml,选择生长较好已培养 25 天的悬浮培养细胞接种到容积为 10 升的搅拌式发酵罐(日本丸菱-MD-500-10L 型)中进行发酵培养,工作体积为 3—8L,通气量 0.6—0.8vvm,表示为单位时间(分)和单位体积培养液中通入空气的体积数。搅拌速度为 60rpm,pH 值稳定在 5.8 ± 0.2 (时间进程研究除外)。发酵培养和悬浮培养的培养时间均为 30 天。

(三) 生长速率、总皂甙含量、糖利用率、液膜容量传质系数以及 pH 值和搅拌速度的测定

1. 生长速率的测定 细胞培养物培养一段时间后,收获(3000rpm 离心 10 分钟然后过滤),置于 50°C 以下冻干至恒重,文中所列结果均来自 3 次或 4 次重复平均值。生长速率分绝对生长速率和相对生长速率两种^[11]。绝对生长速率计算公式为 $R = (W_2 - W_1) / T \cdot V$,表示单位体积和时间内的干重增加,单位为 $\text{g 干重} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$;相对生长速率计算公式为 $R = T^{-1} \ln(W_2 / W_1)$,单位为 天^{-1} 。该公式能部分地消除接种量对生长速率计算的影响。以上两公式的 R 代表生产速率, W_2 为终产物干重(g), W_1 为起始物干重(g), T 为培养时间(天), V 为培养体积(L)。

2. 细胞培养物总皂甙含量的测定 细胞培养物冻干后,磨碎,正丁醇冷浸 2 天,经超声波破碎处理 10 分钟,采用薄层层析比色法^[6]测定,皂甙含量乘以细胞培养物产率即得皂甙产率。

3. 糖利用率(URS)的测定 细胞培养物收获时,取其滤液,按蒽酮法测定^[9],将所消耗的糖量除以起始加入的糖量,并换算成百分数,即得糖利用率。

4. 液膜容量传质系数(K_{La})测定 参照田口久治(1966)^[7]方法。培养液 pH 值是通过 pH 探头连接的 pH 控制仪(日本丸菱 LM-4HC 型)直接测定;搅拌速度由搅拌速度控制仪直接测定。

结 果 与 讨 论

(一) 三七细胞发酵培养过程 pH 值变化和糖利用情况

为了解三七细胞发酵培养的生长动态,进行了三七细胞发酵培养时间进程的研究,由于该发酵罐在运转过程中取样困难,仅对细胞培养过程中 pH 值变化和糖利用情况进行

了测定(图 1)。从图 1 可以看出,在培养过程中培养液的 pH 值是逐渐降低的,培养开始时 pH 值为 5.8,当培养 5 至 10 天时 pH 值降低最为明显,当培养 20 天时,pH 值降至 3.99,当培养 20 至 30 天时,pH 值降低很少,培养 30 天的 pH 值为 3.92。未见 pH 值回升的现象。糖利用率在培养过程中是逐渐增加的,培养开始为 0,培养 10 至 20 天时增加最为明显,当培养 25 天时,糖利用率为 87.08%,培养 30 天的糖利用率为 87.30%。从三七细胞发酵培养过程中的 pH 值变化和糖利用情况可以粗略地估计细胞发酵培养较适宜的收获期为培养 25 至 30 天。故我们采用 30 天为三七细胞发酵培养的收获期。

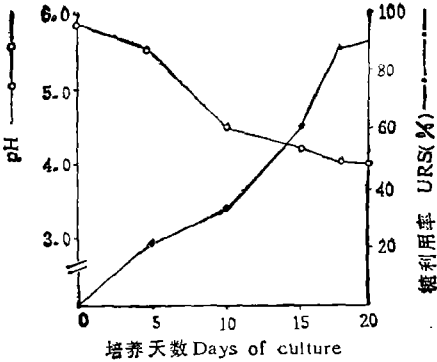


图 1 三七细胞发酵培养过程中 pH 值变化和糖利用率

Fig. 1 pH change and usage ratio of sucrose (URS) in cell fermentation culture of *P. notoginseng*

(二) 接种量对三七细胞发酵培养的影响

对于每一细胞系,它的生长有其最低密度效应^[10],因而三七细胞发酵培养应有其合适的接种量。接种量对三七细胞发酵培养影响的研究(表 1)表明:随着接种量的增加,细胞培养物的产率和皂甙产率逐渐增加,但对皂甙含量影响不大,相对生长速率略为增加,这说明三七细胞发酵培养中细胞生长要求的最低接种密度不大,在接种量为 0.734g 干重·L⁻¹ 以上时,细胞均能较好地生长,只是随接种量增加时,生物量有所增加。因此在今后的工业化和商业化生产中,增大接种量是行之有效的办法。

表 1 接种量对三七细胞发酵培养的影响

Table 1 Effects of inoculum quantity on fermentation culture of *P. notoginseng* cells

接种量 Inoculum quantity (g dry wt·L ⁻¹)	培养物产率 Cell cultures Yield (g dry wt·L ⁻¹)	生长速率 绝对 Absolute (g dry wt·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Growth rate 相对 Relative (d ⁻¹)	皂甙含量 Saponin content (%)	皂甙产率 Saponin yield (mg·L ⁻¹)
0.734	3.38	0.088	0.051	10.98	371.1
1.758	8.13	0.212	0.051	11.21	911.3
2.340	13.58	0.375	0.059	11.14	1513.3

(三) K_{La} 与通气速率的关系

K_{La} 能够反映气体(主要是氧气)在液体中的溶解和传递速率。在发酵培养 10 天时,测定无细胞培养液和三七细胞培养液的液膜容量传质系数与通气速率的关系,结果如图 2 所示。在某一通气速率时,无细胞培养液的 K_{La} 值均要大于细胞培养液的 K_{La} 值。造成以上结果的主要原因是由于细胞培养液的粘性较大^[8]。细胞培养液的粘性大,加之在培养过程中细胞易聚集成团,这为今后的进一步工业化生产带来一些困难,也为今后研制出适合于三七细胞大量培养的发酵罐提供了依据。

(四) 通气量变化对三七细胞发酵培养的影响

通气是影响植物细胞发酵培养以生产次级代谢产物的一个重要因素，不同的细胞系要求的通气量不同，Yamaka 在研究三角叶薯蓣 (*Dioscorea deltoidea*) 细胞在恒化发酵罐中处于指数生长所需通气量为 0.3 vvm^[2]。在通气量分别为 0.8vvm 和 0.4vvm 的情况下，我们进行了三七细胞发酵培养的比较研究，结果如表 2 所示。当培养开始时，接种量尽量保持一致，分别为 2.340g 干重 · L⁻¹(0.8vvm) 和 2.383g 干重 · L⁻¹(0.4vvm)。研究结果表明：当通气速率为 0.4vvm 时，细胞培养物产率(8.14g 干重 · L⁻¹)、绝对生长速率(0.192g 干重 · L⁻¹) 和相对生长速率(0.041 天⁻¹)、以及皂甙产率(976.4 mg · L⁻¹)，均要比通气速率为 0.8vvm 时差。通气速率不同，对细胞培养物中的皂甙含量影响不大。总之，通气速率为 0.8vvm 时，较适合于三七细胞的发酵培养。

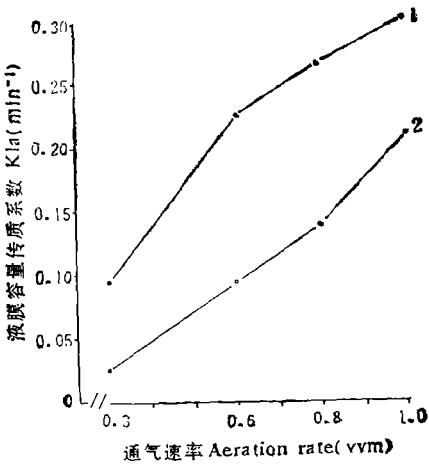


图 2 培养液的 KLa 与通气速率的关系
1.无细胞培养液 2.三七细胞培养液

Fig. 2 Interrelation KLa of culture broth with different aeration
1. Fresh medium 2. Cell culture broth of *P. notoginseng*

(五) 三七细胞悬浮培养与发酵培养的比较

表 2 通气量变化对三七细胞发酵培养的影响

Table 2 Effects of aeration change on fermentation culture of *P. notoginseng* cells

通 气 量 Aeration rate (vvm)	培养物产率 Cell cultures yield (g dry wt · L ⁻¹)	生长速率 绝对 Absolute (g dry wt · L ⁻¹ · d ⁻¹)	Growth rate 相对 Relative (d ⁻¹)	皂甙含量 Saponin content (%)	皂甙产率 Saponin yield (mg · L ⁻¹)
0.8	13.58	0.375	0.059	11.14	1513.3
0.4	8.14	0.192	0.041	11.99	976.4

表 3 三七细胞悬浮培养与发酵培养的比较

Table 3 Comparision between suspension culture and fermentation culture of *P. notoginseng* cells

培养方式 Patterns of culture	工作体积(总体积) Working volume (total volume) (ml)	培养物产率 Yield of cell culture (g dry wt · L ⁻¹)	相对生长速率 Relative growth rate (d ⁻¹)	皂甙含量 Saponin content (%)	皂甙产率 Saponin yield (mg · L ⁻¹)
静止液体 Static liquid	100(500)	5.96	0.0127	6.334	377.7
正常悬浮 Regular suspension	100(500)	9.33	0.0276	9.042	843.4
发酵培养 Fermentation	4000(10000)	13.58	0.0586	11.141	1513.3

植物细胞大量培养一般分为悬浮培养和发酵培养。发酵培养由于具有内搅拌和内通气装置,培养规模大大增加,因而能适应工业规模生产的需要。我们将三七细胞悬浮培养、静止液体培养(即培养液在摇瓶中处于静止状态)和发酵培养在相同条件下进行比较(表3)。发酵培养的细胞培养物产率($13.58\text{g 干重} \cdot \text{L}^{-1}$)、皂甙产率($1513.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、相对生长速率(0.0586天^{-1})均要比悬浮培养好,相对生长速率是悬浮培养的2.13倍,皂甙含量比悬浮培养高23.2%,静止液体培养结果最差,这主要是由于培养细胞缺氧的缘故。

以上研究表明,发酵培养无论对三七细胞生长还是对皂甙积累均是一种较为理想的培养方式,而且能扩大规模培养,三七细胞发酵培养工业化生产人参皂甙是可行的。

参 考 文 献

- [1] 郑光植、梁 峰,1978: 三七的组织培养。植物学报,20: 373—375。
- [2] 郑光植、王世林、甘炳远,1989: 三七组织培养的建立。生物工程学报,5: 64—69。
- [3] 郑光植、王世林,1989: 三七愈伤组织培养。云南植物研究,11: 255—262。
- [4] 郑光植、王世林、何静波,1989: 三七、人参和西洋参细胞悬浮培养的比较研究,云南植物研究,11: 97—102。
- [5] 袁静明编著,1975: 凝胶层析法及其应用。科学出版社,北京,121—122页。
- [6] 章观德、周志华、王慕邹、高凤英,1980: 人参的分析 II. 人参皂甙的测定。药学报,15: 175—180。
- [7] 田口久治, A.E. Humphrey, 1966: 发酵过程における酸素移动について。化学工学, 30: 869—875。
- [8] Kodama, T., 1989: Production of flavonoid pigments by bench-scale plant cell culture. In: "Proceedings of China-Japan Symposium on Plant Biotechnology". Shanghai, pp. 22—25.
- [9] Murashige, T. and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture *Physiol. Plant*, 15:473—497.
- [10] Puhani, Z. and S.M. Martin, 1971: The industrial potential of plant cell culture. In: "Progress in Industrial Microbiology", Vol.9 (D.J.D. Hockenhall, and W. Clowes eds). William Clowes and Sons Limited, London, pp. 13—39.
- [11] Singer, S.R., 1986: Analyzing growth in cell cultures. 1. calculating growth rate. *Canad. J. Bot.*, 64:233—237.
- [12] Yamaka, T., S. Kato, K. Ishida, T. Kodama, and Y. Minoda, 1983: Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.*, 47:2185—2192