

人参细胞大量培养的研究

周立刚 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘要 人参细胞培养液的pH值在培养过程中先迅速降低然后缓缓回升,后又趋于平稳,合成皂甙高峰在细胞生长对数期稍后出现。生产皂甙的最佳收获期,细胞悬浮培养为20—25天,细胞发酵培养为15—18天。细胞生长和皂甙累积要求有一个稳定而又适宜的pH值环境。发酵培养无论对细胞生长、培养规模、还是皂甙含量均是一种较为理想的培养方式。

关键词 人参,皂甙,悬浮培养,发酵培养

人参(*Panax ginseng*)系五加科(Araliaceae)多年生草本植物,为名贵药材。不仅在临床医学上用于治疗多种疾病,而且在保健食品、保健化妆品中的应用也越来越广泛。随着人们生活水平的提高,对人参的需求量也越来越大。栽培人参需在特殊的气候和土壤条件下,5—6年才能成为商品,加之病虫害严重、产量低而不稳,市场价格波动。人参的主要有效成分为皂甙,尚未人工合成。采用细胞大量培养的方法,不仅克服了化学合成的缺点,而且也克服了栽培中的不足^[1],并在短期内生产出数量多、质量优的人参制品。本文的细胞大量培养包括达一定规模的细胞悬浮培养和发酵培养。

早在60年代罗士韦从人参叶柄成功地诱导出愈伤组织^[2],以后日本、中国大陆及台湾地区等开展了人参组织培养的研究^[3,4,5],探索人参细胞大量培养专业化生产皂甙的途径,取得一定的进展。对人参细胞大量培养过程中的动力学研究尚未

见报道。本文报道人参细胞大量培养的结果,以促进工业化研究的进程。

材料和方法

实验材料 人参愈伤组织由栽培的人参根诱导,暗培养于附加2,4-D 0.2ppm、KT 0.1ppm的MS^[6]培养基上,培养温度为 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$,25天转代一次,经20—30次继代培养后用于细胞大量培养的研究。

培养方法 细胞悬浮培养和发酵培养温度均为 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。悬浮培养和发酵培养的激素浓度比愈伤组织培养降低一半。培养基在灭菌前均将pH值调至5.8,发酵培养在实验过程中,可按要求自动调节pH值。悬浮培养采用旋转式摇床(上海跃进医疗器械一厂, TNZ-82型),转速120rpm,振幅2.5cm,采用500ml容积的三角瓶,内装100ml培养液;发酵培养采用日本丸菱公司生产的MD-500-10L型机械搅拌式发酵罐,总容量为10L,工作容积4—6L,

通气量为0.6—0.8vvm, 搅拌速度为50—60rpm。

生长速率的测定 细胞培养物培养一段时间后, 收获(300rpm离心10min或过滤), 然后置于50℃以下冰冻干燥至恒重, 文中所列结果均来自4次重复平均值。为了消除接种量对生长速率计算的影响, 采用相对生长速率的计算公式^[7]即 $R = T^{-1} \ln(W_2/W_1)$, R代表生长速率(d^{-1}), W_2 为收获物干重(g), W_1 为接种物干重(g), T为培养时间(d)。为了观察细胞发酵培养的生长动态, 于接种当天和以后每隔3天停止通气一次, 每次5分钟, 待细胞全部沉于罐底后用尺子测量沉下来的细胞厚度毫米数, 根据发酵罐的总容量和高度换算成毫升数(1mm厚相当于26.3ml), 以沉下来的细胞毫升数为指标来估价细胞的生长动态。

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(Soniprep 150型超声波仪, 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^[8]测定。总皂甙含量以占收获细胞培养物干重为基础的百分数表示。皂甙产率以每升培养液中所含皂甙的毫克数表示, 为消除接种量对皂甙产率计算的影响, 皂甙产率还以每克细胞接种物培养一段时间后所产生的皂甙毫克数来表示。

糖利用率的测定 (Usage ratio of glucose URS) 当细胞培养一定时间后, 取培养液, 按蒽酮法^[9]测定, 消耗糖量除以加入的量即得糖利用率(URS)。

培养液pH值的测定 悬浮培养细胞培养液的pH值, 采用pH测定仪(TOA Electronics Ltd, HM-20E型, 日本)测定。发酵培养液的pH值是通过pH电极连

接的pH控制仪(LM-4HC型, 日本丸菱)直接测定。

液膜容量传质系数的测定(Oxygen transfer coefficient K_{La})参照田口久治等(1966)方法测定^[10]。

结果与讨论

1. 培养液的液膜容量传质系数(K_{La})与通气速率(vvm)的关系

液膜容量传质系数能够反映空气在液体中的溶解和传递速率。在大量培养10天时, 测定无细胞培养液和人参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1所示。在某一通气量时, 无细胞培养液的 K_{La} 值均要大于细胞培养液的 K_{La} 值, 随着通气量的增加, 无细胞培养液的 K_{La} 值上升快于人参细胞培养液的 K_{La} 值, 说明空气在细胞培养液中溶解和传递较慢; 细胞培养液的粘性较大, 细胞在培养过程中易聚集成团, 这为今后的进一步工业化大规模生产带来一些困难, 也为今后研制出适合于植物细胞大量培养的生物反应器提供了依据。

2. 人参细胞悬浮培养和发酵培养的时间进程

为了了解细胞悬浮培养和发酵培养的细胞生长动态和皂甙积累情况, 以及确定较适宜的收获期, 进行了人参细胞悬浮培养和发酵培养时间进程的研究。细胞悬浮培养的时间进程如图2所示。当悬浮培养20天时, 细胞干重达最大值为12.27gdw./l, pH值变化是先由5.8降至5.5, 然后又回升至7.1, 最后趋于平稳。皂甙产率在细胞培养20天时明显增加, 当培养25天时达最高值。到生长后期, 细胞干重和鲜重均有所降低, 皂甙产率降低更为明显。培养后期测定出的皂甙产率低, 主要原因可能

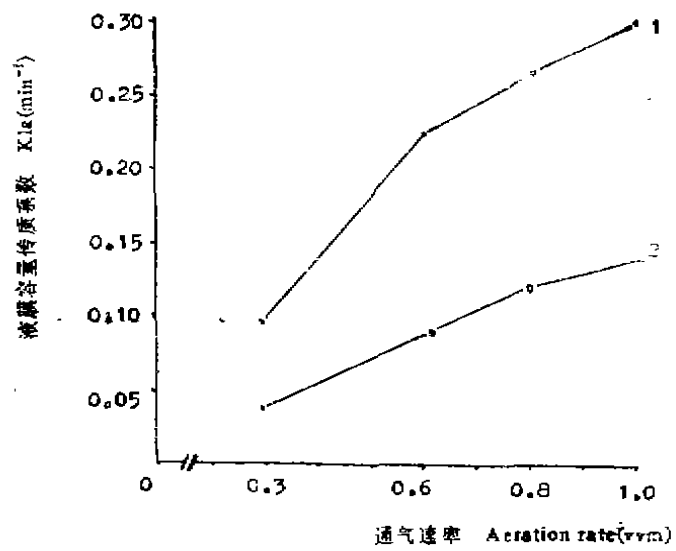


图1 培养液的液膜容量传质系数与通气速率的关系

1. 无细胞培养液 2. 人参细胞培养液

Fig.1 Interrelation of oxygen transfer coefficient (KLa) of culture broth with different aeration (vvm)

1. Fresh medium 2. Cell culture broth of *P. ginseng*

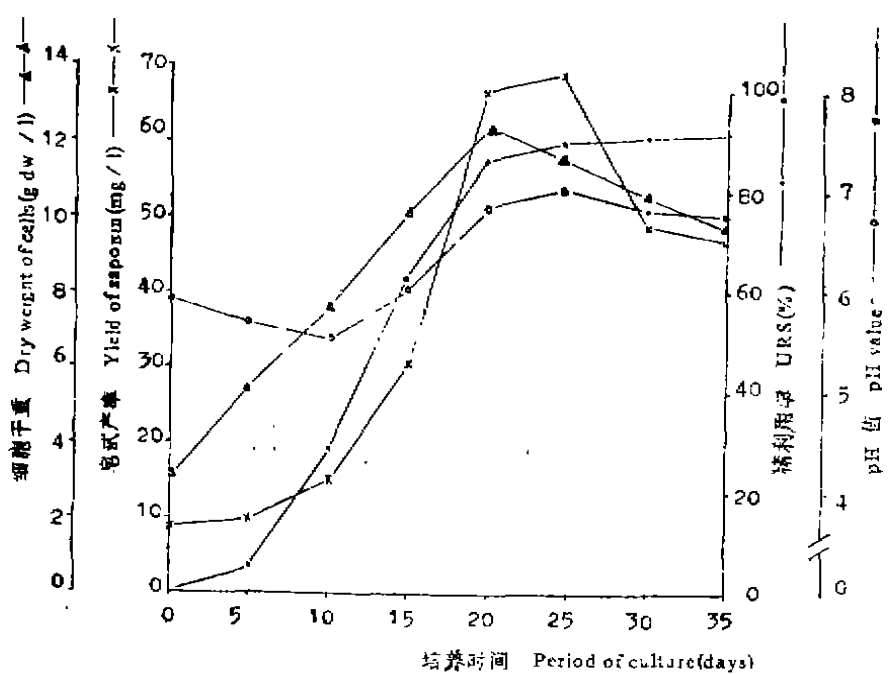


图2 人参细胞悬浮培养的时间进程

Fig.2 Time course of *P. ginseng* cell suspension culture

是由于皂甙在生长后期转化为其它物质,另一方面可能是由于细胞破裂,部分皂甙释放到培养液中(因为培养液中能够检测出少量的皂甙)。从以上结果可以看出,当培养液中糖利用率和pH值趋于稳定时,细胞培养物产率和皂甙产率趋于最大值,因此在大量培养过程中,当细胞培养物干重和皂甙产率不易测定时,糖利用率和pH值可作为细胞培养进程的间接指标。人参细胞悬浮培养最佳收获期为20—25天。作为发酵培养或下一级悬浮培养的“接种子”,要求细胞处于对数生长后期,最佳转接期为15—20天。Tabata^[11]曾把细胞培养的产物-生长模型分为三个类型,人参细胞的产物生长模型类似于第2种类型

即产物形成进程落后于细胞生长进程。

细胞发酵培养的时间进程如图3所示。由于人参细胞发酵培养难于取样,取样后又影响细胞的正常生长动态,故以沉降下来的细胞毫升数为指标来估价细胞的生长动态。培养液体积为6升,培养过程中pH值稳定为 5.8 ± 0.2 。培养细胞的对数生长期出现在第9至12天,培养15至18天时,细胞沉降体积趋于最大值,由于细胞沉降体积与细胞干重几乎呈正相关^[10],故培养15—18天时细胞培养物干重趋于最大值。从悬浮培养的时间进程来看,皂甙形成进程稍落后于细胞生长。从而粗略估计人参细胞发酵培养较适宜的收获期为18天。

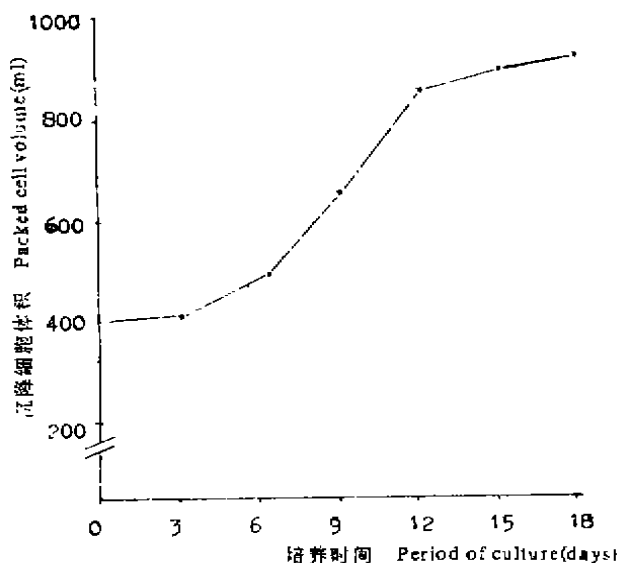


图3 人参细胞发酵培养过程中生长(沉降体积)的动态

Fig 3 Growth (packed cell volume) Kinetics of *p. ginseng* cells in fermentation culture

3. pH值的变化对细胞发酵培养的影响

将一处理为培养过程中pH值任其变化,另一处理为培养液的pH值稳定在5.8

± 0.2 ,接种量基本保持一致。结果如表1所示。pH值稳定在 5.8 ± 0.2 时,更有利于人参细胞生长和皂甙产率的提高,而在培养过程中不调节pH值任其变化时,生长

表1 pH值的变化对人参细胞发酵培养的影响

Table 1 Effects of pH changing on fermentation culture of *P.ginseng* cells

pH值 pH value	生长速率 Growth rate (d ⁻¹)	皂甙含量 Saponin content (%)	皂甙产率 Saponin yield (mg/l)
固定在5.8±0.2 Fixed on 5.8±0.2	0.138	5.544	411.3
任其变化 Changed itself	0.040	4.572	130.5

明显变慢,皂甙含量降低。以上结果说明,人参细胞生长和皂甙积累要求有一个适宜而又稳定的pH值环境。

4. 细胞培养方式的比较

植物细胞大量培养一般分为悬浮和发酵培养。发酵培养由于具有内搅拌和内通

气装置,培养体积大大增加,加之对各种理化参数能进行自动调节,因而能适应工业化和商业规模生产的需要。对发酵培养、悬浮培养和静止液体培养(即培养液处于静止状态)这三种培养方式进行比较,结果如表2所示。

表2 人参细胞悬浮培养与发酵培养的比较

Table 2 Comparision between suspension culture and fermentation culture of *P.ginseng* cells

培养方式 Patterns of culture	培养时间 Period of culture (days)	工作体积(总体积) Working volume (Total volume) ml(ml)	相对生长速率 Relative growth rate (d ⁻¹)	皂甙含量 Content of saponin (%)	皂甙产率 Yield of saponin Absolute Relative mg/l)(mg/ginoc)
静止液体 Static liquid	20	100 (500)	negative	3.221	90.18 24.2
正常悬浮 Regular suspension	20	100 (500)	0.095	3.291	818.64 219.8
发酵培养 Fermentation	15	4000 (10000)	0.138	5.544	411.3 439.6

人参细胞发酵培养的生长速率(0.138d⁻¹)和皂甙含量(5.544%)均比悬浮培养好,由于悬浮培养的接种密度较大,从而使培养物的皂甙产率(818.64mg/l)

的绝对值高于发酵培养。但若采用能消除接种量影响的相对皂甙产率计算方法,即皂甙产率以每克细胞接种物培养一段时间后所产生的人参皂甙毫克数来表示,发酵

培养的皂甙产率为每克接种量439.6mg, 而悬浮培养的皂甙产率为每克接种量219.8mg, 故发酵培养的皂甙产率明显优于悬浮培养。静止液体培养的结果最差, 这主要是由于培养细胞缺氧的缘故, 对以上三种培养方式的培养细胞镜检结果表明, 液体静止培养的细胞不成团, 细胞碎片很多, 这亦说明细胞的死亡大于生长。

小 结

通过对人参细胞大量培养的研究表明, 人参细胞的发酵培养无论就细胞生长、培养规模, 还是皂甙含量和产率均是一种较为理想的培养方式, 并有可能应用于工业化生产皂甙产品。大量培养中获得的一些工艺学指标, 也可为研制适合于植物细胞大规模培养的生物反应器提供一些重要参数。

参考文献

- [1] 郑光植: 云南植物研究, 增刊 I: 125—134(1988)。
- [2] 罗士韦: 植物生理学通讯, (2): 26—27 (1964)。
- [3] Furuya, T, et al., J. Nat. Prod., 47(1): 70—75(1984)。
- [4] 丁家宜等: 南京药学院学报, (2): 61—67 (1981)。
- [5] Chang, W. C., Natural Science Council Monthly R. O. C., 7: 147—154(1979)。
- [6] Murashige, T. and Skoog, P., Physiol. Plant, 15(3): 473—497(1962)。
- [7] Singer, S. R., Canadian Journal of Botany, 64(1): 233—237 (1986)。
- [8] 章观德等: 药学学报, 15(8): 175—180 (1980)。
- [9] 袁静明编著: 凝胶层析法及其应用, 科学出版社, 北京, pp.121—122 (1975)。
- [10] 田口久治, and Humphrey, A. E., 化学工学, 30(10): 869—875 (1966)。
- [11] Tabata, M., In: "Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application" (W. Barz, E. Reinhard, M. H. Zenk eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp.3—16 (1977)。

A STUDY ON MASS CULTURE OF PANAX GINSENG CELLS

Zhou Ligang, Zheng Guangzhi

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

Abstract

The pH value of *P. ginseng* cell culture broth went down at first, then went up slowly and was in stable at last in mass cell culture. The curve of saponin formation lagged slightly behind the growth curve. An appropriate period of culture was 20—25 days for the cell suspension culture and 15—18 days for the cell fermentation culture to produce saponins. An appropriate and fixed pH value environment was necessary for the cell growth and saponin formation. Fermentation culture was a better way to cell growth, culture scale and saponin content of *P. ginseng*.

Key words *Panax ginseng*, Saponin, Suspension culture, Fermentation, culture