

## 甘草细胞在搅拌式生物反应器中的放大培养

李雅丽\*, 孟婷婷, 王毛毛, 李晓雪, 李蓉蓉, 郭晓强

内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古包头014010

**摘要:** 在建立了稳定的甘草细胞搅拌式生物反应器放大培养体系的基础上, 本文研究了甘草细胞在搅拌式反应器中悬浮培养的生长特性, 包括细胞生长、细胞膜的透性、培养体系的pH变化及甘草黄酮合成情况等, 并与摇瓶培养作比较。结果发现, 同等条件下, 反应器中培养细胞生物量的积累低于摇瓶培养, 整个培养周期较摇瓶培养缩短。培养过程中同一时间段反应器中的pH值略低于摇瓶中的pH, 细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度是摇瓶中的1.8倍, 甘草黄酮的产量是摇瓶培养的1.5倍, 表明反应器中机械搅拌与流体剪切的培养环境对细胞生长起到一定程度的抑制作用, 但刺激了细胞次生代谢产物甘草黄酮较高水平的合成。

**关键词:** 甘草细胞; 生物反应器; 摇瓶培养; 生长特性

## Amplification Culture of *Glycyrrhiza uralensis* Cell in Stirring Bioreactor

LI Ya-Li\*, MENG Ting-Ting, WANG Mao-Mao, LI Xiao-Xue, LI Rong-Rong, GUO Xiao-Qiang

School of Mathematics, Physics and Biology Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China

**Abstract:** Based on the establishment of a stable *Glycyrrhiza uralensis* (licorice) cells amplification culture system in stirring bioreactor, the growth characteristics of cell suspension culture in stirring bioreactor were studied, including the cell growth, cell membrane permeability, the pH change of the culture system and licorice flavonoids synthesis, and compared with the shake flask culture. The results showed that cell biomass accumulation in the bioreactor was less than that in shake flask under the same conditions, and the whole cultivation period was shortened. At the same time in the culture period, pH was slightly lower than that in the shake flask, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in cells was 1.8 times of that in shake flask, and the production of licorice flavonoids was 1.5 times of that in the shake flask. These indicated that the cultivation environment with mechanical agitation and fluid shear in the bioreactor inhibited the cells growth at a certain level, but stimulated secondary metabolites licorice flavonoids synthesis cell in higher levels.

**Key words:** *Glycyrrhiza uralensis* (licorice) cell; bioreactor; shake flask culture; growth characteristic

利用植物细胞大规模培养生产有用的次生代谢产物是解决目前部分天然产物资源短缺的有效途径之一, 在实现这项技术由实验室规模向生产规模的过渡过程中, 进行生物反应器培养并逐级放大是必不可少的关键环节。实际上目前很少有植物细胞培养能够实现工业化生产, 主要原因一是悬浮细胞中次生代谢产物的含量低, 二是在大规模培养的过程中还有很多困难(Pan等2000)。植物细胞由摇瓶培养进入反应器中放大培养, 要承受由机械搅拌引起的高剪切力和搅拌与通气引起的流体胁迫带来的伤害(Gong等2006), 这种伤害会影响到植物细胞的生长和分裂, 严重的会对植物细胞产生致命的损伤。

甘草, 豆科多年生草本或半灌木植物, 是世界上最古老也是应用最广泛的中草药之一, 也是多

种中成药与配方制剂的主要成分, 同时也因为其特有的甜味作为食品添加剂广泛应用在食品行业, 国内外市场需求量很大(Zhang和Ye 2009)。近些年来, 由于无序采挖、生态环境恶化造成甘草主产区野生资源濒临枯竭(董静洲等2006)。栽培品种收获期过长, 病虫害严重, 质量低下, 导致甘草资源面临危机。本文在7.5 L搅拌式反应器中建立甘草细胞悬浮培养体系的基础上, 探讨甘草悬浮细胞的各种生理特性, 包括评价细胞生长、细胞

收稿 2014-11-06 修定 2015-02-19

资助 国家自然科学基金(31460064)、内蒙古自治区高等学校“青年科技英才计划”(NJYT-15-A08)、内蒙古自然科学基金(2013MS0512)和内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY13152)。

\* 通讯作者(E-mail: btlialyali@126.com; Tel: 0472-5954358)。

活力、细胞膜的通透性、培养体系的pH变化及产物合成的情况等, 并与摇瓶培养相对比, 为甘草细胞反应器大规模培养生产天然活性成分的工业化进程提供理论指导与实验依据。

## 材料与amp;方法

### 1 实验材料

供试的甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)品种为‘乌拉尔甘草’, 种子购自内蒙古自治区鄂尔多斯市达拉特旗。愈伤组织由幼嫩的甘草无菌苗下胚轴和子叶诱导而来, 在固体MS培养基附加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D、 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA与 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA上培养和继代。悬浮培养系统的建立: 取6 g分散性强、生长状态良好的固体细胞置于250 mL三角瓶中,  $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震荡培养, 悬浮培养基为100 mL液体MS培养基+ $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA, 光照强度 $36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照时间 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 培养温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 2 反应器细胞种子液的制备

从已建立的稳定生长的甘草细胞摇瓶悬浮系中挑选生长状态良好、分散均匀、悬浮细胞聚集体的平均直径在1 mm左右的甘草悬浮细胞作为种子细胞, 继代培养5~6 d, 准备接入反应器。

### 3 搅拌式反应器中甘草细胞放大培养

反应器培养在一个7.5 L的搅拌式反应器中进行, 包括一个7.5 L的玻璃罐体、四个不锈钢挡板、一个不锈钢加热底盘和六叶低剪切力平滑搅拌桨(图1)。内有温度探测计和灵敏度较高的pH电极与溶氧电极, 可实时输出反应器系统的温度、pH和溶氧。反应器设置配套的在线控制系统, 可实现反应体系的温度、搅拌速度和通气量等参数的在线控制。设置搅拌速度80 rpm。对培养体系的通气通过底部一个不锈钢六孔气体分布器实现, 气体流速被控制在 $0.1 \text{ m}^3\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{min}^{-1}$ 。反应器装液量为5 L, 初始接种浓度为 $50 \text{ g (FW)}\cdot\text{L}^{-1}$ , 光照时间为 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 培养温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 每3 d取样1次, 每次取100 mL, 检测样品的细胞生物量积累、甘草黄酮的合成、细胞中和培养基中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度、培养液的pH和细胞活力。

### 4 测定方法

细胞生物量的检测、次级代谢产物总黄酮的提取与含量分析参考杨英(2007)的方法, 细胞活力

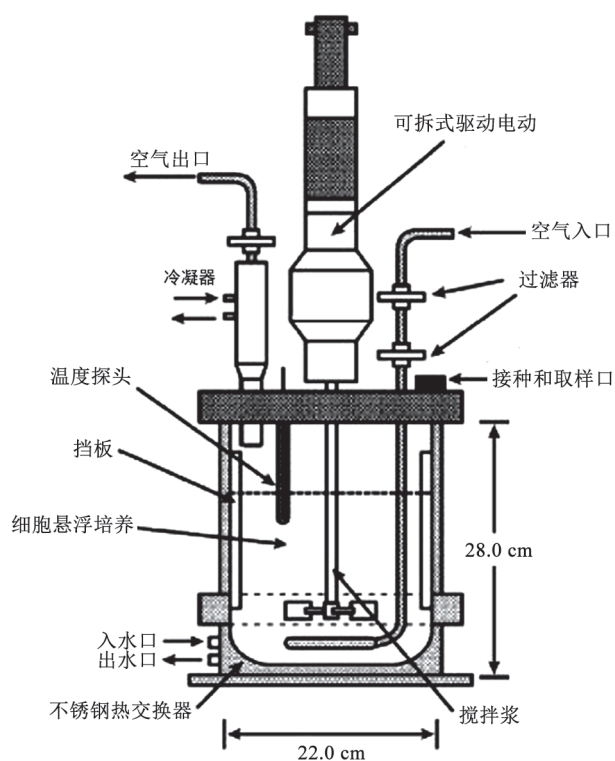


图1 搅拌式生物反应器示意图

Fig.1 The schematic diagram of stirred bioreactor

测定采用Evans Blue染色(Xu等2004)。细胞与培养基中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的测定分别参照Chong等(2005)方法。

### 5 数据分析

结果中的每个数据都是3次独立实验的平均值, 平均标准偏差表示了样品的变异。在反应器培养过程中, 每次取3个平行样, 误差线表示平均标准偏差。

## 实验结果

### 1 反应器中甘草细胞的生长与体系pH变化

经过筛选的生长状态良好、分散性强的甘草种子细胞被接入反应器后, 一个周期生长基本稳定。结果(图2)表明, 在摇瓶和反应器中, 甘草细胞都易于成聚集体或者小细胞团, 摇瓶中的细胞生物量积累最大值比反应器中的高33%。反应器中细胞生长周期明显比摇瓶培养的短。

由图3可以看出, 培养过程中pH的变化在摇瓶中与在反应器中的差别不大, 在培养初期(0~3 d)均表现为一个缓慢的下降, 中期(4~9 d)基本稳定, 培养后期(9~24 d)的pH先上升后下降, 同一时间段内

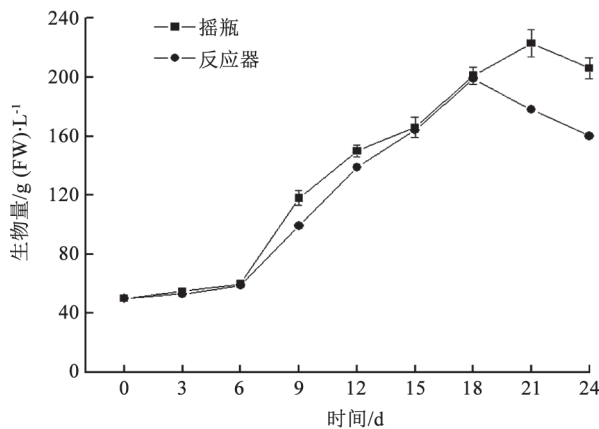


图2 甘草细胞在摇瓶和反应器中生物量的变化

Fig.2 Changes in biomass of licorice cell in the stirred bioreactor and shake flask

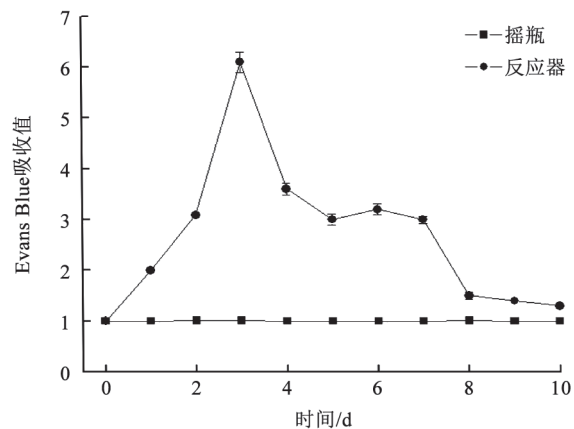


图4 甘草细胞在摇瓶与反应器中的活力变化

Fig.4 Changes in cell activity of licorice cell in the stirred bioreactor and shake flask

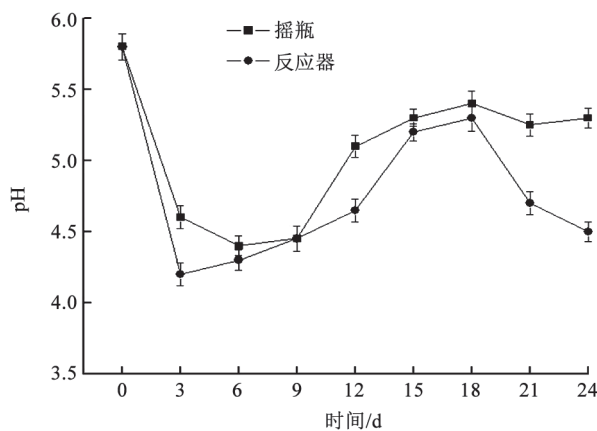


图3 甘草细胞在摇瓶和反应器中pH的变化

Fig.3 Changes in pH of licorice cell in the stirred bioreactor and shake flask

反应器中的pH略低于摇瓶中的,这可能是与细胞在反应器中受到流体剪切伤害,部分细胞内含物的外泄有关。

## 2 反应器中甘草细胞的活力变化

细胞膜的透性分析采用Evans Blue染色法,完整的植物细胞膜是不能渗入如Evans Blue的大分子物质,当细胞遇到伤害细胞膜有损伤后大分子物质就能逐渐渗入。进入细胞内的Evans Blue的量反映了细胞受伤害的程度,Evans Blue的吸收值越大,代表细胞死亡越多,细胞活力越小。由图4可以看出,在摇瓶培养的整个过程中,细胞活力没有明显的变化。而在反应器培养过程中,细胞活力在前8 d变化较大,而后趋于稳定。在培养的初

期(0~3 d),细胞活力明显下降,Evans Blue的最大吸收值(第3天)达到初始值的6倍。这说明细胞在接入反应器后立即受到流体胁迫和剪切伤害,部分细胞出现细胞膜的损伤导致活力下降。之后,Evans Blue吸收值下降,细胞活力有所回升,与初始培养时细胞的活力基本平衡,后面的培养过程中细胞活力基本无变化,同一培养时间段对比摇瓶培养细胞活力均表现为下降。

## 3 反应器中甘草细胞的黄酮产量变化

在受流体胁迫和剪切作用下,反应器中培养的甘草细胞黄酮的合成情况见图5。可以看出,次级代谢产物甘草黄酮在反应器培养过程中的合成量较摇瓶培养有明显的提高。甘草黄酮积累的最大值( $120.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )出现在反应器培养的第18天,是摇瓶培养( $78.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的1.5倍。第18天以后黄酮的含量出现降低,这种下降可能是因为部分黄酮类化合物发生了酶解。

## 4 反应器中甘草细胞的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度变化

图6表明,在摇瓶培养的第3天,细胞中的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度下降,然后开始缓慢上升。这种变化的趋势与在反应器中基本类似,反应器中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度经过前3 d的短暂下降后上升的相对变化更大,到培养的第18天达到最高值,与黄酮变化类似。由此可以看出,细胞中黄酮积累的最大值与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 最大浓度之间有一个明显的对应关系。

## 讨 论

实现了甘草细胞悬浮培养从摇瓶到反应器的



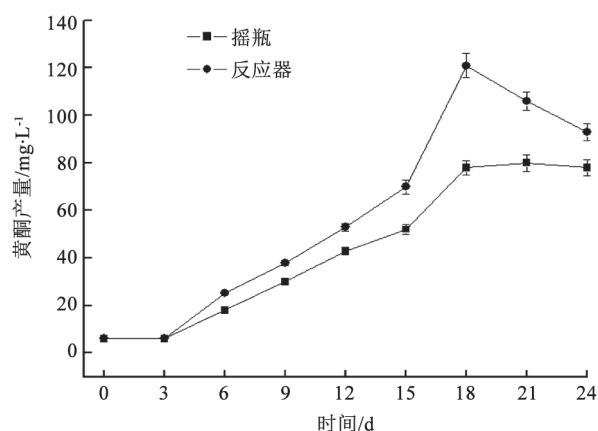


图5 甘草细胞在摇瓶和反应器中的黄酮产量变化  
Fig.5 Changes in licorice flavonoids content of licorice cell in the stirred bioreactor and shake flask

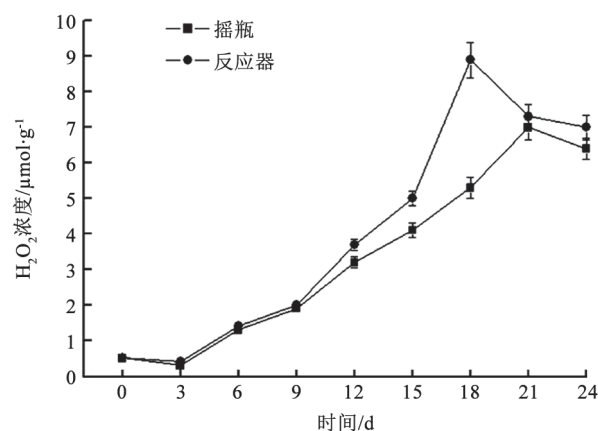


图6 甘草细胞在摇瓶和反应器中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度变化  
Fig.6 Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents of licorice cell in the stirred bioreactor and shake flask

放大,并以摇瓶培养为对照,对甘草细胞在反应器中悬浮培养的特性进行分析。结果发现,相同培养条件下,反应器中培养的细胞生物量的积累低于摇瓶培养,整个培养周期较摇瓶培养缩短。培养过程中同一时间段反应器中的pH值略低于摇瓶中的pH,细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度是摇瓶中的1.8倍。Mur等(2005)报道过烟草细胞在被病原菌诱导时会出现一个双向的氧迸发,这种氧迸发模式分别在中国红豆杉和龙眼细胞悬浮培养过程中也报道过(Han和Yuan 2004; Zhao等2005)。另一方面,相同培养条件下,反应器中细胞次级代谢产物甘草黄酮的产量是摇瓶培养的1.5倍,这种现象与其他文献报道的其他植物细胞体外培养合成次级代谢产

物的情况是相似的(Trejo-Tapia等2005; Luna-Palencia等2005)。这些结果表明,在反应器培养条件下,机械搅拌与通气引起的高剪切力与流体剪切对部分细胞产生了伤害,破坏了细胞的膜结构,使细胞的生长受到一定程度的抑制,但刺激了细胞中氧的迸发与次生代谢产物甘草黄酮较高水平的合成。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在植物次级代谢产物合成的过程中起着很重要的作用,这一点与很多早期的研究报道一致(Chen和Huang 2000; Alvarez等1998)。

植物细胞培养的反应器主要有搅拌式、气升式、鼓泡式和转鼓式几种。选择和开发新型反应器要依据能否长时间维持无菌状态,维持发酵液均匀混合,控制反应器内的温度和pH,保持稳定的供氧,以及反应器放大的难易程度等等。搅拌式反应器通过搅拌和通气控制溶氧,混合效果好,供氧能力强,适应性广,在植物细胞大规模培养中广泛应用,但搅拌产生的剪切力会对植物细胞产生伤害,直接影响细胞生长,可以通过调整搅拌桨样式、桨叶大小、搅拌速率等减小搅拌产生的剪切力,降低对细胞的伤害。植物细胞生长周期长,要求反应器有在相对长的时间里保持良好的防污染的能力,搅拌式生物反应器的搅拌轴因为长时间使用会出现封不严的问题。在这一点上,气升式反应器有明显的优势,它没有搅拌装置,整个系统封闭,容易保持反应器内无菌状态,但气升式反应器容易发泡,起泡是初始培养基中高浓度的糖以及培养后期细胞释放的蛋白质所致。将气升式反应器与低速搅拌相结合,可以加强混合有利于氧传递同时细胞所受剪切力相对降低,这样的新型植物细胞培养反应器可以有很广泛的应用前景。

### 参考文献

- 董静洲, 易自力, 蒋建雄(2006). 我国药用植物资源研究概况. 医学研究杂志, 35 (1): 67-69
- 杨英(2007). 甘草细胞培养合成甘草黄酮及其调控研究. 武汉: 华中科技大学
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92 (6): 773-784
- Chong TM, Abdullah MA, Fadzillah NM, Lai OM, Lajis NH (2005). Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme Microb Technol*, 36 (4): 469-477
- Chen SY, Huang SY (2000). Shear stress effects on cell growth and

- L-DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. *Bioprocess Eng*, 22 (1): 5~12
- Gong YW, Li SY, Han RB, Yuan YJ (2006). Age-related responses of suspension cultured *Taxus cuspidata* to hydrodynamic shear stress. *Biochem Eng J*, 32 (2): 113~118
- Han RB, Yuan YJ (2004). Oxidative burst in suspension culture of *Taxus cuspidata* induced by a laminar shear stress in short-term. *Biotechnol Progr*, 20 (2): 507~513
- Luna-Palencia GR, Cerda-Garcia-Rojas CM, Rodriguez-Monroy M, Ramos-Valdivia AC (2005). Influence of auxins and sucrose in monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* cell suspension cultures. *Biotechnol Progr*, 21 (1): 198~204
- Mur LAJ, Kenton P, Draper J (2005). *In planta* measurements of oxidative bursts elicited by avirulent and virulent bacterial pathogens suggests that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is insufficient to elicit cell death in tobacco. *Plant Cell Environ*, 28 (4): 548~561
- Pan ZW, Wang HQ, Zhong JJ (2000). Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of *taxane diterpene*. *Enzyme Microb Technol*, 27 (9): 714~723
- Trejo-Tapia G, Cerda-Garcia-Rojas CM, Rodriguez-Monroy M, Ramos-Valdivia AC (2005). Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd) DC cell suspension cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnol Progr*, 21 (3): 786~792
- Xu QM, Cheng JS, Ge ZQ, Yuan YJ (2004). Effects of organic solvents on membrane of *Taxus cuspidata* cells in two-liquid-phase cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 79 (1): 63~69
- Zhang QY, Ye M (2009). Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *J Chromatogr*, 1216 (11): 1954~1969
- Zhao J, Fujita K, Sakai K (2005). Oxidative stress in plant cell culture: A role in production of beta-thujaplicin by *Cupressus lusitanica* suspension culture. *Biotechnol Bioeng*, 90 (5): 621~631