

# 南方红豆杉细胞悬浮培养体系优化及动力学研究

徐志荣, 王 婷, 娄佳兰, 魏赛金\*

(江西农业大学/江西省农业微生物资源开发与利用工程实验室, 江西 南昌 330045)

**摘要:** [目的] 南方红豆杉细胞悬浮培养体系优化及动力学模型构建。 [方法] 以南方红豆杉1年生枝条诱导产生的愈伤组织为材料, 在优化愈伤组织接种量、培养基初始 pH、植物激素类型及配比的基础上, 分析南方红豆杉悬浮细胞生长和紫杉醇积累的动力学关系及主要营养成分的变化。 [结果] 适合南方红豆杉悬浮培养的培养基为: B5 + 0.4 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.3 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 1.2 mg · L<sup>-1</sup> 6-KT + 30 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖, 培养基最佳初始 pH 为 5.8, 最佳接种量为 0.09 g · mL<sup>-1</sup>。在 1 个培养周期内, 培养液中的糖、磷元素, 铵态氮、硝态氮在细胞培养的第 18 天基本被消耗完全或保持不变; 动力学拟合表明, 南方红豆杉细胞悬浮培养生长符合 Logistic 生长模型, 最大比生长速率为 0.143 65 d<sup>-1</sup>, 底物消耗和紫杉醇合成可用 Luedeking-Piret 模型描述, 悬浮细胞生长与紫杉醇积累属于部分生长偶联型。 [结论] 南方红豆杉细胞悬浮培养体系优化后, 通过模型的回归拟合, 获得了反映南方红豆杉细胞培养的动力学参数, 试验所构建的发酵动力学模型在一定程度上揭示了南方红豆杉细胞产紫杉醇代谢过程的特征。

**关键词:** 南方红豆杉; 悬浮细胞; 紫杉醇; 优化; 动力学模型

**中图分类号:** S718.46

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2019)01-0008-07

南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairer*) 又称紫杉, 为红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 (*Taxus* Linn.) 植物, 主要分布于中国南方地区, 是红豆杉属中分布最广、生长最快的一群植物, 为国家一级保护树种<sup>[1]</sup>。其本身含有的紫杉醇是红豆杉属植物的次生代谢产物, 属四环二萜酰胺类化合物, 不仅是一种对治疗肺癌、卵巢癌等有特效的抗癌药物, 更是当前公认的广谱、活性强的一线抗肿瘤药物<sup>[2-4]</sup>。由于红豆杉生长较缓慢, 资源贫乏, 天然植物体内紫杉醇的量又非常低, 要提供临床应用需要砍伐大量红豆杉林, 危及生态平衡, 使红豆杉植物面临灭绝<sup>[5]</sup>。目前, 一种能提供抗肿瘤化合物的途径就是利用植物细胞组织培养法大规模培养生产紫杉醇<sup>[6]</sup>。

细胞培养具有原料丰富、大规模反应较易实现等优点, 因此, 成为工业化生产紫杉醇的最佳途径<sup>[7]</sup>。本研究以南方红豆杉愈伤组织为材料, 通过单因素试验和正交试验, 对南方红豆杉细胞悬浮培养体系进行优化, 并对悬浮培养过程进行动力学分

析, 研究细胞生长、基质消耗及产物合成的动态变化, 建立动力学模型, 旨在为大规模培养红豆杉细胞、扩大紫杉醇生产奠定理论和实践基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

南方红豆杉愈伤组织: 南方红豆杉材料采自江西省奉新县澡溪乡杨坪村 (28.7° N, 115.38° E), 该地区属中亚热带湿润气候, 年平均气温为 17.3℃; 全年平均降水量为 1 612 mm, 年相对湿度平均为 79%, 无霜期年平均为 260 d 左右, 年日照时数达 1 803 h。以 1 年生枝条为外植体经诱导后获得愈伤组织, 继代培养至 5 代以上<sup>[8]</sup>; 紫杉醇标准品 (色谱纯): 源叶生物科技有限公司; B5 培养基: 青岛海博生物; 甲醇、乙腈 (色谱纯): 西陇科学。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Waters 2695 高效液相色谱仪; KW-1000DC 恒温水浴锅; 江苏金坛市中大仪器厂; JW-3022HR 高速

收稿日期: 2017-09-20 修回日期: 2018-11-28

基金项目: 江西省科技计划项目 (20133BBG70090); 江西农业大学大学生创新创业训练项目 (201710410067)

\* 通讯作者: 魏赛金, 博士, 教授. weisaijin@126.com。

冷冻离心机:安徽嘉文仪器装备有限公司;SW-CJ-1CU 洁净工作台:苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;LDZX-50KBS 立式压力蒸气灭菌锅:上海申安医疗器械厂;UV765 紫外-可见分光光度计:上海精科仪器有限公司;1702 分析天平:SARTORIUS GMBH GOTTINGEN;LRH-250-Gb 光照培养箱:韶关市泰宏医疗器械有限公司;GZX-9023 电热鼓风干燥箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂;KQ-500E 型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;PHS-2 型精密酸度计:上海雷磁仪表厂。

### 1.3 方法

1.3.1 愈伤组织最佳接种量的筛选 以 B5 为基本培养基,且含  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-KT、 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖,培养基初始 pH5.8。愈伤组织接种量分别设置为 0.03、0.06、0.09、0.12、 $0.15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3.2 培养基最佳初始 pH 值的筛选 以 B5 为基本培养基,且含  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-KT、 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖,愈伤组织接种量为  $0.09 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养基初始 pH 值分别设置为 2、4、5、6、7、8、10。

1.3.3 植物激素正交试验设计 选择 NAA、2,4-D、6-KT 3 种植物激素进行单因素试验,试验水平设计为:NAA(0、0.5、1.0、1.5、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );2,4-D(0、0.1、0.3、0.5、 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );6-KT(0、0.5、1.0、1.5、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。根据单因素实验结果,选择 NAA、2,4-D、6-KT 为因素,进行  $L_9(3^4)$  正交试验,根据细胞生长指数确定最佳植物激素配比。

以上培养条件均为装液量 30 mL/250 mL 三角瓶,  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 每个处理 3 个重复,培养至第 15 天时收获,测定细胞鲜质量和细胞活力。

1.3.4 悬浮细胞动态生长曲线的绘制 以 1.3.1~1.3.3 试验所得最佳悬浮培养体系培养细胞,装液量 30 mL/250 mL 三角瓶,  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下培养,每 3 d 取样 1 次,每次 3 个重复,测定细胞活力、生物量和基质中营养物质。

### 1.4 测定指标及方法

#### 1.4.1 悬浮培养细胞生长指数的测定

生长指数 = (收获量 - 接种量) / 接种量  $\times 100\%$

1.4.2 悬浮培养细胞活力的测定 细胞活力的测定采用 TTC 法<sup>[9]</sup>,以 485 nm 下吸光值表示细胞

活力。

1.4.3 基质中营养物质的测定 残糖采用蒽酮法测定<sup>[10]</sup>,还原糖含量用 DNS 法测定<sup>[11]</sup>,硝态氮含量测定采用硫酸-水杨酸法测定<sup>[12]</sup>,铵态氮含量采用苯酚-次氯酸盐法测定<sup>[13]</sup>,磷酸根含量采用钼蓝比色法测定<sup>[14]</sup>。

1.4.4 紫杉醇的提取与含量测定 愈伤组织于  $45^\circ\text{C}$  烘干,粉碎过 60 目筛,精确称取愈伤组织干粉  $0.2000 \text{ g}$ ,加入 8 mL 甲醇后  $55^\circ\text{C}$  下超声提取 30 min,  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,重复提取 3 次,合并上清液于  $45^\circ\text{C}$  烘干;浸膏加入 4 mL 双蒸水后用 4 mL 二氯甲烷萃取 2 次,合并二氯甲烷,  $45^\circ\text{C}$  烘干,加入 1 mL 甲醇复溶,过  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜后使用 Waters 2695 高效液相色谱仪检测紫杉醇含量。色谱柱:依利特 Hypersil ODS2 柱( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ),柱温  $30^\circ\text{C}$ ;流动相:甲醇-乙腈-水(36.5:27:36.5);流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样量:  $15 \mu\text{L}$ ;检测波长:  $227 \text{ nm}$ 。

1.4.5 南方红豆杉悬浮细胞动力学模型拟合 采用 Logistic 方程来描述反应南方红豆杉细胞生长速率,紫杉醇合成动力学模型采用 Leudeking-Piret 表示,底物消耗可用 Luedeking-Piret 修正模型表示,分别参照薛文娇等<sup>[15]</sup>、朱晓媛等<sup>[16]</sup>、张阳阳等<sup>[17]</sup>的方法进行拟合。

1.4.6 数据处理与统计分析 数据采用 DPS 数据处理系统进行数据统计,误差分析采用 Duncan 新复极差法;作图及曲线拟合采用 Origin 8.5.1 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织接种量、培养基初始 pH 对南方红豆杉悬浮培养细胞的影响

由图 1 可知:愈伤组织接种量低于  $0.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,悬浮细胞增长缓慢,随着接种量的增加,细胞生长指数逐渐增大,当接种量为  $0.09 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,细胞生长指数达到峰值,为 132.80%;继续增加接种量时,细胞生长指数逐渐下降,随着接种量的增加,细胞活力也逐渐下降。

偏酸性条件下更有利于悬浮培养细胞的生长,细胞活力也处于一个较高水平;而过酸环境下,细胞活力较低。当培养基初始 pH 值为 5.0 和 6.0 时,细胞生长指数分别达 156.48% 和 109.83% (图 1),根据相关研究,pH 值为 5.8 时,有利于红豆杉细胞的生长,所以后续试验中的培养基初始 pH 值调整为 5.8。

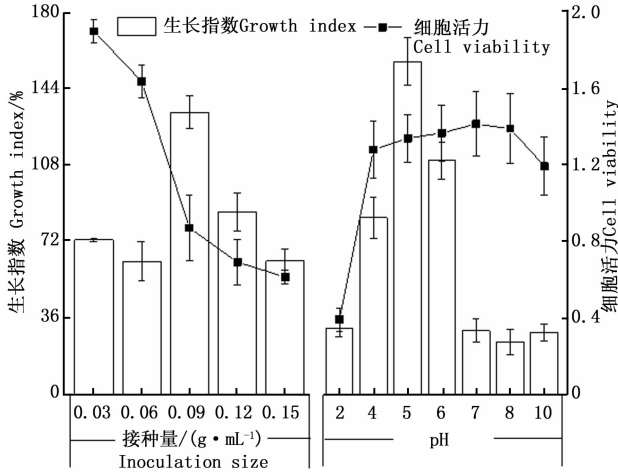


图1 接种量、培养基初始 pH 对悬浮培养细胞生长的影响

Fig.1 Effect of inoculation size, initial pH of culture medium on growth of suspension cell

2.2 植物激素类型及配比对南方红豆杉悬浮培养细胞生长的影响

由图2可知:单因素实验中,NAA、2,4-D、6-KT的最适宜质量浓度分别为0.5、0.3、1.0 mg·L<sup>-1</sup>,且均表现为随着浓度的增加,细胞生长指数呈先增加后降低的趋势。以3种植物激素的单因素试验结果为基础进行正交试验,从表1可知:3种植物激素的最佳配比为A1B3C3,即0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA,0.4 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D,1.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-KT,3种植物激素对细胞生长指数影响的大小为6-KT>NAA>2,4-D。

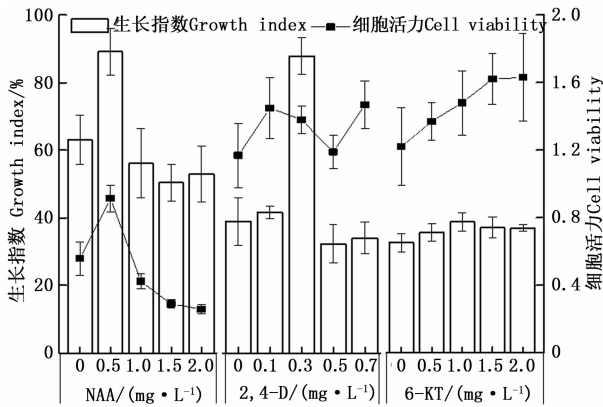


图2 NAA、2,4-D、6-KT对悬浮培养细胞生长的影响

Fig.2 Effect of NAA,2,4-D,6-KT on growth of suspension cell

2.3 南方红豆杉细胞干质量、细胞活力、细胞紫杉醇含量和产量动态变化

以 B5 + NAA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.4 mg·

表1 正交实验结果与分析

Table 1 Results and analysis of orthogonal experiment

|    | 植物激素/(mg·L <sup>-1</sup> )<br>Phytohormones |       |        | 生长指数/%<br>Growth index | 细胞活力<br>Cell viability |
|----|---|-------|--------|------------------------|------------------------|
|    | NAA   | 2,4-D | 6-KT   |                        |                        |
| 1  | 0.3   | 0.2   | 0.8    | 32.86 ± 3.89           | 0.512 ± 0.110          |
| 2  | 0.3   | 0.3   | 1.0    | 34.53 ± 3.45           | 0.684 ± 0.093          |
| 3  | 0.3   | 0.4   | 1.2    | 154.37 ± 11.47         | 0.713 ± 0.036          |
| 4  | 0.5   | 0.2   | 1.0    | 52.90 ± 2.21           | 0.735 ± 0.105          |
| 5  | 0.5   | 0.3   | 1.2    | 119.66 ± 11.62         | 0.751 ± 0.103          |
| 6  | 0.5   | 0.4   | 0.8    | 46.11 ± 1.86           | 0.691 ± 0.077          |
| 7  | 0.7   | 0.2   | 1.2    | 55.37 ± 5.63           | 0.660 ± 0.088          |
| 8  | 0.7   | 0.3   | 0.8    | 30.72 ± 0.35           | 0.803 ± 0.071          |
| 9  | 0.7   | 0.4   | 1.0    | 29.49 ± 5.46           | 0.579 ± 0.062          |
| K1 | 73.92                                       | 69.56 | 36.64  |                        |                        |
| K2 | 45.94                                       | 61.64 | 72.55  |                        |                        |
| K3 | 33.23                                       | 38.19 | 108.69 |                        |                        |
| R  | 37.28                                       | 26.61 | 75.46  |                        |                        |

L<sup>-1</sup> + 6-KT 1.2 mg·L<sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup> 为培养基,愈伤组织接种量为 0.09 g·mL<sup>-1</sup>,初始 pH5.8 的悬浮培养体系培养南方红豆杉细胞,细胞生长曲线基本符合“S”型曲线,在培养前 9 天为延滞期,细胞干质量变化不明显;第 9 天至第 18 天为指数生长期,细胞迅速生长;18 至 21 天为稳定期,第 21 天时细胞干质量达到峰值,为 0.620 8 g·(30 mL)<sup>-1</sup>;其后细胞干质量逐渐下降,细胞进入衰亡期。细胞在培养的前几天活力逐渐增加,到第 9 天时达到最大值,细胞活力为 1.383,而后一直呈现下降趋势(图3)。

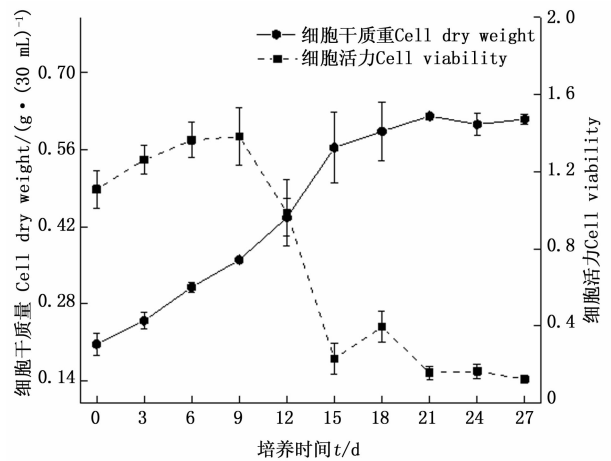


图3 悬浮培养细胞生长曲线和细胞活力变化曲线

Fig.3 The growth curve of suspension cell and the changes of cell viability

由图4可知:在培养的第0~6天,细胞紫杉醇含量逐渐增加;第9~18天,紫杉醇含量略有下降;

第18~24天,紫杉醇含量迅速增加,第24天时到达峰值,紫杉醇含量为 $84.46 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ;24~27天含量出现下降。紫杉醇的产量整体呈先上升后下降的趋势。第0~18天,紫杉醇产量增加缓慢;第18~24天,产量迅速增加,第24天时到达峰值,紫杉醇产量为 $51.18 \mu\text{g} \cdot (30 \text{ mL})^{-1}$ ;第24~27天,紫杉醇产量开始下降。

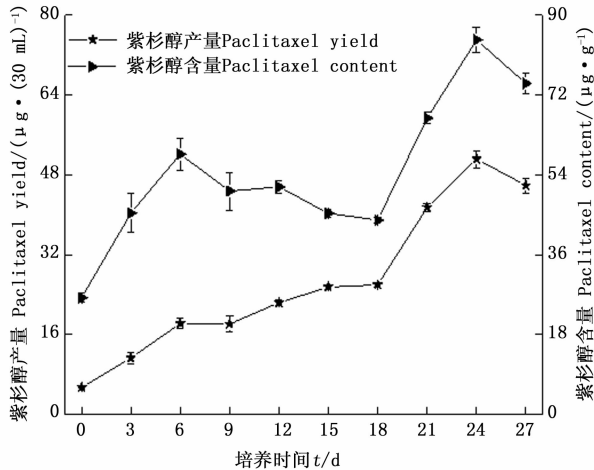


图4 悬浮培养细胞紫杉醇含量和产量变化曲线  
Fig.4 The Paclitaxel content and yield curve of suspension cell

## 2.4 南方红豆杉细胞培养过程中基质消耗动态变化

由图5可知:糖作为培养基中的碳源,在整个培养周期中随时间进程下降。总糖浓度在第0~9天变化缓慢,在第9~21天消耗迅速,第18天时,糖浓度仅为 $3.63 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,消耗率达90.04%;第21~24天,总糖基本消耗完全。还原糖作为直接碳源,其变化趋势与总糖变化趋势大致一致,其含量在培养的第0~3天迅速上升,在第3天时含量达到峰值,为 $29.94 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,第3~9天时缓慢下降,随后迅速消耗,在第21 d后基本消耗完全。磷酸盐的浓度在整个培养周期中随时间进程下降,其浓度在0~9天变化迅速,在9~12天浓度下降缓慢,第12~21天时含量基本为0,到第21天,培养基中磷元素含量又缓慢升高。

在细胞生长过程中,氮源的消耗速度较快,但铵态氮与硝态氮的吸收没有保持完全同步(图6)。培养的第3天,铵态氮基本消耗完全,在培养的第18天以后,铵态氮含量缓慢上升;而硝态氮在第0~12天的消耗速率较小,消耗率仅为1.83%,第12天以

后硝态氮才被迅速消耗,18天以后硝态氮含量基本保持不变。

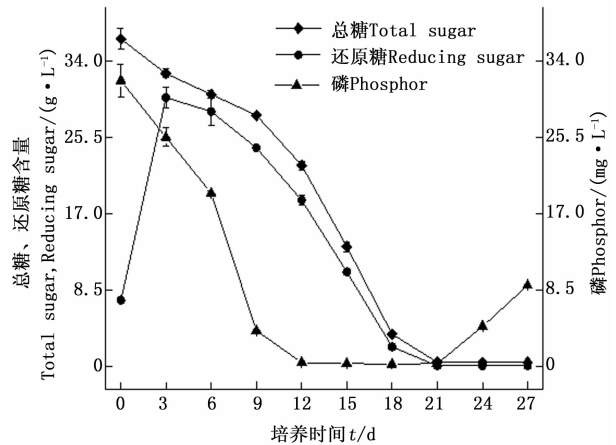


图5 培养液中总糖、还原糖和磷变化曲线  
Fig.5 The change curve of mediumt total sugar, reducing sugar and phosphor

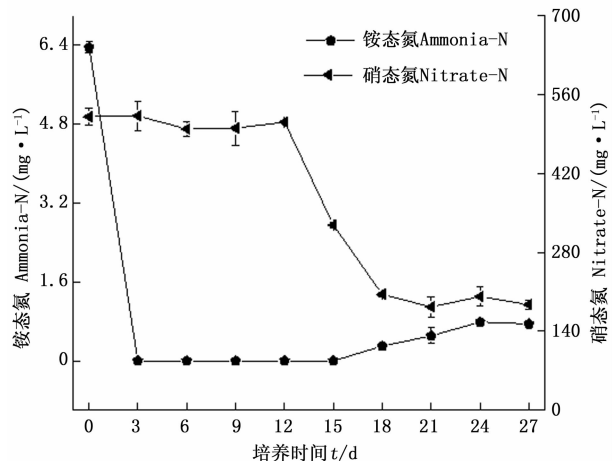


图6 培养液中铵态氮和硝态氮变化曲线  
Fig.6 The change curve of mediumt ammonia-N and nitrate-N

## 2.5 南方红豆杉细胞悬浮培养动力学模型及其参数估计

本研究采用 Logistic 方程和 Luedeking-piret 方程描述了南方红豆杉细胞悬浮培养过程,建立了细胞生长、紫杉醇合成和基质消耗的动力学模型,运用 Origin 8.5.1 软件对数据进行非线性曲线拟合。

2.5.1 细胞生长动力学模型 经拟合,得  $X_0$ 、 $X_{\max}$  和  $\mu_{\max}$  3 个参数分别为 $0.16495 \text{ g} \cdot (30 \text{ mL})^{-1}$ 、 $0.69098 \text{ g} \cdot (30 \text{ mL})^{-1}$ 、 $0.14365 \text{ d}^{-1}$ ;  $X_0$  为细胞初始质量浓度,  $X_{\max}$  为可能的最大细胞质量浓度,  $\mu_{\max}$  为最大比生长速率。模型  $R^2 = 0.97452$ , 得公式

(1),拟合曲线见图7。

$$X(t) = \frac{0.113\ 98e^{0.143\ 65t}}{0.526\ 03 + 0.164\ 95e^{0.143\ 65t}} \quad (1)$$

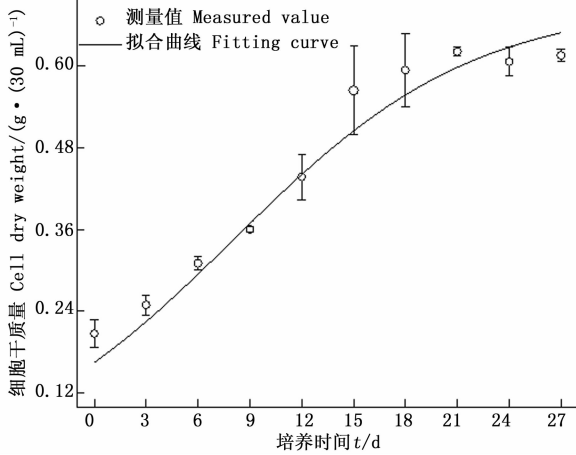


图7 细胞干质量测量值与拟合值的比较  
Fig.7 Comparison of measured value with fitting value on cell dry weight

2.5.2 紫杉醇生成动力学模型 经拟合,得  $m$ 、 $n$  和  $P_0$  3个参数分别为 14.755 34、2.827 75 和 5.818 58  $\mu\text{g} \cdot (30\ \text{mL})^{-1}$ ;  $m$  为生长偶联系数,  $n$  非生长偶联系数,  $P_0$  为初始紫杉醇产量。模型  $R^2 = 0.935\ 51$  得公式

$$P(t) = 5.818\ 58 + 2.433\ 89 \left( \frac{e^{0.143\ 65t}}{0.761\ 28 + 0.237\ 25e^{0.143\ 65t}} - 1 \right) + 13.599\ 00 \ln(0.761\ 28 + 0.237\ 25e^{0.143\ 65t}) \quad (2)$$

$$S(t) = 48.541\ 42 - 24.077\ 83 \left( \frac{e^{0.143\ 65t}}{0.761\ 28 + 0.237\ 25e^{0.143\ 65t}} - 1 \right) + 9.069\ 08 \ln(0.761\ 28 + 0.237\ 25e^{0.143\ 65t}) \quad (3)$$

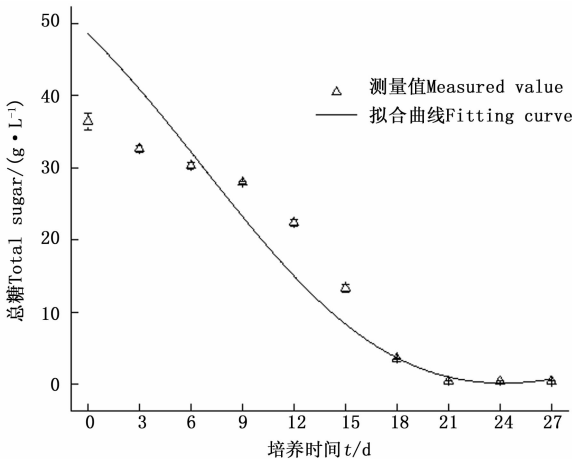


图9 总糖消耗测量值与拟合值的比较  
Fig.9 Comparison of measured value with fitting value on total sugar consumption

(2),拟合曲线见图8; $m \neq 0, n \neq 0$ ,说明悬浮细胞生长与紫杉醇积累属于部分生长偶联型。

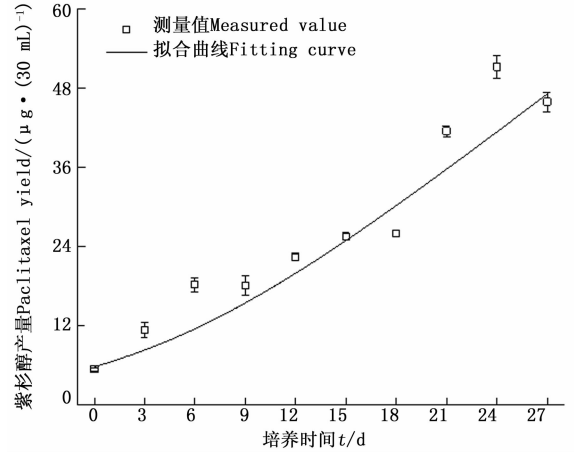


图8 紫杉醇产量测量值与拟合值的比较  
Fig.8 Comparison of measured value with fitting value on paclitaxel yield

2.5.3 基质消耗动力学模型 经拟合,得  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $S_0$  3个参数分别为 145.970 49、-1.885 4 和 48.541 42  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\alpha$  为碳源用于菌体生长得率常数,  $\beta$  为碳源用于产物积累得率常数,  $S_0$  为初始碳源浓度。模型  $R^2 = 0.880\ 16$ ,得公式(3),拟合曲线见图9。

### 3 讨论

建立红豆杉细胞悬浮体系是为了通过培养细胞生产紫杉醇,解决紫杉醇药源问题<sup>[18]</sup>。本试验通过对南方红豆杉悬浮培养条件的研究,建立了南方红豆杉细胞悬浮培养体系。

研究发现,接种量对悬浮细胞的生长有较大影响,植物细胞需在一定密度下才能启动生长,其内源代谢物质必须达到一定的阈值才能维持细胞的分裂和生长,在有高密度细胞群和营养丰富的情况下,易于达到这种阈值<sup>[19]</sup>。如果接种量太低,则细胞间距过大,使细胞间的物质交换不充分,不利于细胞的生长;细胞浓度过高,密度太大,培养基营养易快速消耗而使细胞死亡<sup>[20]</sup>。接种量越大,细胞活力越低,可能是细胞大量增殖分裂,营养消耗快,部分细胞出

现了衰败,细胞活力因而降低。适宜的接种量不仅能较好启动细胞的生长,且对营养物质的消耗适宜<sup>[21]</sup>。本研究中,当细胞接种量为 $0.09\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有利于悬浮细胞的生长,过低或过高均不利于细胞生长和细胞活性。

pH 值对植物细胞会产生诸多影响,包括引起质膜通透性变化,影响植物细胞对物质的吸收和代谢等,进而影响外植体的脱分化增殖器官形成以及细胞次生代谢产物的含量<sup>[22]</sup>。盛长忠等<sup>[23]</sup>研究发现,培养基 pH 值在 $5.5\sim 6.0$ 是最有利于红豆杉愈伤组织生长。陈继光等<sup>[24]</sup>研究结果显示,青钱柳细胞适合在酸性条件下生长,当 pH 大于 6 时,细胞增长量降低,同时细胞活力也降低。本试验中,培养基初始 pH 值为 5.8,适合南方红豆杉细胞生长。

植物细胞在离体悬浮培养过程中,必须通过添加外源激素来促进细胞的生长<sup>[25]</sup>。植物激素能够促进植物细胞的生长和繁殖,但是较高浓度激素反而会对细胞生长起抑制作用,植物激素类型和配比是悬浮体系建立成功与否的关键,合适的植物激素种类和浓度,可以使细胞快速增殖,同时保持较高的细胞活力<sup>[26]</sup>。本试验表明, $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}2,4\text{-D}+1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}6\text{-KT}$ 的激素配比适合南方红豆杉细胞的生长,对细胞生长指数影响的大小为 $6\text{-KT}>\text{NAA}>2,4\text{-D}$ 。

蔗糖作为碳源,为细胞的生命活动及其增殖提供必要的物质,植物细胞中没有吸收和转运蔗糖的系统,培养液中的蔗糖必须先经转化酶分解成葡萄糖和果糖等还原糖,才被细胞吸收利用,所以培养液中的还原糖含量在培养初期迅速增加。氮和磷主要用于合成细胞生长所需的结构蛋白和次生代谢途径中的一些酶<sup>[27]</sup>。 $\text{NH}_4^+$ 和 $\text{NO}_3^-$ 是培养基的主要氮源,主要用于合成细胞生长所需的结构蛋白<sup>[28]</sup>。指数生长期,细胞开始合成次生代谢物,代谢途径中酶的合成需要消耗氮源。在培养的前期,铵态氮比硝态氮的吸收速度快,其原因可能是细胞生长所需的蛋白质的合成与铵态氮密切相关,而紫杉醇等次生代谢产物合成可能与硝态氮有关。细胞生长初期磷元素开始就迅速下降,直至完全消耗,培养后期磷元素含量又逐渐上升,可能是细胞在培养初期就快速吸收磷用于合成核酸和生物膜,当细胞培养进入稳定期后部分细胞开始凋亡,细胞中的磷进入培养液中而使磷含量上升。

动力学研究可深入了解细胞培养系统的动态变

化以及生物体与周围环境的相互作用,基于动态了解,测定重要的动力学参数,有助于优化与放大过程<sup>[29]</sup>。经过拟合后得到南方红豆杉悬浮细胞生长动力学模型、紫杉醇合成动力学模型、底物消耗动力学模型,各模型拟合的相关系数分别为 $0.974\ 52$ 、 $0.935\ 51$ 、 $0.880\ 16$ ,拟合结果良好,证明所建模型可以较好地反映出南方红豆杉悬浮细胞生长、紫杉醇合成、底物消耗的变化规律。

## 4 结论

本研究优化了培养条件,系统地建立了南方红豆杉细胞悬浮培养体系。取继代培养 5 代以上的疏松愈伤组织进行悬浮培养生产紫杉醇,通过模型的回归拟合,获得了反映南方红豆杉细胞培养的动力学参数,试验所构建的发酵动力学模型在一定程度上揭示了南方红豆杉细胞产紫杉醇代谢过程的特征,这对于培养过程优化、代谢产物的调控和扩大培养起着重要作用,对工业化生产紫杉醇也将产生促进作用,具有重要的理论和实践意义。

## 参考文献:

- [1] 肖 遥,楚秀丽,徐肇友,等. 南方红豆杉 2 年生容器苗多点试验的生长节律家系变异[J]. 林业科学研究,2016,29(2):238-244.
- [2] 姚 晓,步 达,陈建伟,等. 南方红豆杉愈伤组织培养及其紫杉烷二萜类成分的分析[J]. 中草药,2014,45(18):2696-2702.
- [3] Zhang F, Wang P, Ji D, et al. Asymmetric somatic hybridization between *Bupleurum scorzonrifolium* Willd. and *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Plant cell reports, 2011, 30(10): 1857-1864.
- [4] Oh H C, Seo D W, Song T J, et al. Endoscopic ultrasonography - guided ethanol lavage with paclitaxel injection treats patients with pancreatic cysts [J]. Gastroenterology, 2011,140(1):172-179.
- [5] 匡雪君,王彩霞,邹丽秋,等. 紫杉醇生物合成途径及合成生物学研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(22):4144-4149.
- [6] Jennewein S, Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001,57(1-2):13-19.
- [7] 白向阳,吕建明,周艳英,等. 南方红豆杉细胞培养物的化学成分研究[J]. 药学学报,2015,50(1):70-74.
- [8] 徐志荣,简方敏,刘伯卿,等. 南方红豆杉外植体的消毒和愈伤组织的培养[J]. 生物灾害科学,2016,39(3):215-219.
- [9] 刘 华,梅兴国. TTC 法测定红豆杉细胞活力[J]. 植物生理学通讯,2001,37(6):537-539.
- [10] 林 丽,王 琰,王福星,等. 基于硫酸-萘酚法对不同产地藏药线叶龙胆多糖的含量测定[J]. 中国中药杂志,2014,39(14):2774-2776.
- [11] 陈 帅,朱军莉,潘伟春. 乳糖对鲑鱼中氧化三甲胺热分解反应动力学的影响[J]. 现代食品科技,2017,33(3):116-121.

- [12] 贾洪秀, 朱云勤, 朱必学, 等. 分光光度法测定轻质碳酸钙中硝酸根含量[J]. 无机盐工业, 2010, 42(5): 53–55.
- [13] 夏庆兵, 王 军, 朱鲁生, 等. 土壤微生物对邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯胁迫的生态响应[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(7): 1344–1350.
- [14] 王晓东, 李晓灿, 翟俏丽, 等. 真菌诱导子对白桦悬浮体系中 N 和 P 的吸收利用和三萜合成的影响[J]. 中草药, 2011, 42(10): 2119–2124.
- [15] 薛文娇, 马赛箭, 常 帆, 等. 利用动力学模型探讨碳源浓度对普鲁兰分批发酵过程的影响[J]. 化学工程, 2015, 43(11): 5–10, 40.
- [16] 朱晓媛, 胡 铁, 黎继烈, 等. 基于遗传算法的纤维素酶分批发酵动力学研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 47–51.
- [17] 张阳阳, 曾柏全. 曲酸产生菌米曲霉 Co-26 型分批发酵动力学研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(11): 43–47.
- [18] Rahpeyma S A, Moieni A, Jalali Javaran M. Paclitaxel production is enhanced in suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells by using a combination of sugar, precursor, and elicitor [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2015, 15(2): 234–242.
- [19] 陈红贤, 于笑笑, 王晨阳, 等. 国槐槐角种胚细胞悬浮培养的动力学研究[J]. 浙江农林大学学报, 2016, 33(2): 272–279.
- [20] 张 珏, 尹 欢, 阮利霞, 等. 高生物产量川芎细胞悬浮培养条件优化[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2014, 33(1): 10–13.
- [21] 黄卫文, 黎继烈, 戴梓茹, 等. 花生根细胞悬浮培养制备白藜芦醇条件的优化[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 233–236.
- [22] 王 娟, 高文远, 尹双双, 等. 药用植物细胞悬浮培养的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3680–3683.
- [23] 盛长忠, 王淑芳, 王 勇, 等. pH 对红豆杉愈伤组织生长、PAL 活性和紫杉醇含量的影响[J]. 中草药, 2001, 32(10): 929–931.
- [24] 陈继光, 上官新晨, 尹忠平, 等. 青钱柳悬浮细胞的培养及其基质消耗的规律[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 44–49.
- [25] 王沐兰, 杨生超, 郁步竹, 等. 红豆杉高产悬浮细胞系建立及其紫杉醇诱导的研究进展[J]. 广西植物, 2016, 36(9): 1137–1146.
- [26] Hirasuna T J, Pestchanker L J, Srinivasan V, *et al.* Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata* [J]. *Plant Cell*, 1996(44): 95–102.
- [27] Liu C, Guo C, Wang Y, *et al.* Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38(4): 581–585.
- [28] 董 杰, 詹亚光, 任 健. 茶条槭悬浮培养的动力学[J]. 林业科学, 2012, 48(10): 18–23.
- [29] Omar R, Abdullah M A, Hasan M A, *et al.* Kinetics and modelling of cell growth and substrate uptake in *Centella asiatica* cell culture [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2006, 11(3): 223–229.

## Study on Optimization of Cell Suspension Culture System and Kinetics of *Taxus chinensis* var. *mairer*

XU Zhi-rong, WANG Ting, LOU Jia-lan, WEI Sai-jin

(Jiangxi Agricultural University / Jiangxi Agricultural Microbial Resource Development and Utilization Engineering Lab, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

**Abstract:** [Objective] To optimizing the cell suspension culture system and building the kinetics model of *Taxus chinensis* var. *mairer*. [Method] The effects of basic callus inoculum size, initial pH value, phytohormone types and concentration on *T. chinensis* var. *mairer* cell growth was investigated using the callus induced from annual branches of *T. chinensis* var. *mairer*. Based on this, the kinetic relationship between *T. chinensis* var. *mairer* cell growth and paclitaxel production and the nutrient consumption were also analyzed. [Result] The optimal media for *T. chinensis* var. *mairer* cell suspension culture is B5 medium supplemented with  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D,  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-KT and sucrose  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The optimum callus inoculum size is  $0.09 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and the optimum initial pH of medium is 5.8. During the process, the sugar, phosphor-N and nitrate-N in the culture medium are nearly used up or remain unchanged on the 18th day. The growth law of *T. chinensis* var. *mairer* is consistent with Logistic growth model and the maximum specific growth rate is  $0.143 \text{ 65 d}^{-1}$ . Substrate consumption and paclitaxel production by Luedeking-Piret model are described. The growth of suspension cell and the accumulation of paclitaxel belong to partial growth coupling type. [Conclusion] The cell suspension culture system is optimized. Through regression model, the kinetic parameters are obtained to reflect the cell culture of *T. chinensis* var. *mairer*. The fermentation kinetics model constructed in this experiment reveals the characteristics of paclitaxel production in *Taxus chinensis* cells to a certain extent.

**Keywords:** *Taxus chinensis* var. *mairer*; suspension cell; paclitaxel; optimization; kinetic model