

胀果甘草细胞悬浮培养体系的非结构动力学分析

孟婷婷,郭 慧,郑春丽,李雅丽

(内蒙古科技大学 数理与生物工程学院,内蒙古 包头 014010)

摘 要:在建立了稳定的胀果甘草细胞悬浮培养体系的基础上,分析了体系中细胞生长、基质消耗及产物合成的动态变化,利用 Excel 2013 和 Origin Pro 8.0 软件处理实验数据,拟合出模型参数,建立了相应的非结构动力学模型.模型模拟值与试验值的拟合度良好,相关系数分别为 0.968 46、0.964 17、0.975 64,表明建立的动力学模型能很好地预测甘草细胞的悬浮培养过程,对指导反应器放大培养甘草细胞具有重要意义,同时为植物细胞生物反应器的设计提供理论依据.

关键词:甘草细胞;悬浮系;动力学模型;生物反应器

中图分类号:Q813.1

文献标志码:A

甘草,豆科多年生草本或半灌木植物,世界上最古老也是应用最广泛的中草药之一,同时也因为其独特的甜味作为添加剂广泛应用在食品行业.利用植物细胞大规模培养技术生产甘草主要活性成分是目前解决野生甘草资源匮乏最有潜力的途径之一^[1].胀果甘草细胞悬浮培养时细胞分裂增殖速度较快,分散程度高,生长周期较短,非常适合进行大规模培养.近年来,针对甘草细胞培养方面的工作大部分集中在对代谢产物的调控和对发酵工艺的选择方面,细胞培养要真正实现工业化规模的应用,需要解决的一个关键问题是建立对培养过程中各种现象进行合理描述的数学模型,有助于更深入地了解植物细胞生长、营养消耗、目的产物合成的机理及其相互关系.针对植物细胞培养的动力学研究,很多学者提出了各种非结构模型和结构模型^[2-7].从工程角度看,为了有利于反应器的设计,指导试验放大和确定最佳反应器操作策略,理想的植物细胞动力学模型应尽可能简单,各种参数有明确的意义,这样便于实验数据能适当地验证模型^[8-11],本文在对胀果甘草细胞反应器悬浮培养过程进行动力学分析的实验基础上,研究细胞生长、基质消耗及产物合成的动态变化,建立非结构动力学模型,并采用实验数据验证模型,为进一步的放大试验和工业大规模生产提供理论基础.

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验材料

由幼嫩的胀果甘草无菌苗下胚轴和子叶诱导而来的愈伤组织,在固体 MS 附加 2,4-D ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), NAA ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 6-BA ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基上连续继代培养 20 代以上得到生长状态稳定良好的甘草细胞.

1.1.2 仪器设备

层流净化工作台, JJ-CJ-2FD, 苏州净化设备有限公司;恒温摇床,光照培养箱, LRH-250-GS, 广东医疗器械;紫外可见分光光度计, UV-1600PC, 上海美谱达仪器;电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司.

收稿日期:2015-02-20;修回日期:2015-07-30.

基金项目:国家自然科学基金(31460064);内蒙古自然科学基金(2013MS0512);内蒙古自治区青年科技英才计划项目(NJYT-15-A08);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY13152).

作者简介(通信作者):李雅丽(1976-),女,蒙古族,内蒙古赤峰人,内蒙古科技大学教授,博士,主要从事植物次生代谢调控研究, E-mail:btliyali@126.com.

1.2 方法

1.2.1 摇瓶培养工艺

实验采用 250 mL 三角瓶,装液量为 100 mL,改良 MS 液体培养基,即基本 MS 附加 6-BA(0.5 mg · L⁻¹)、NAA(0.5 mg · L⁻¹)、2, 4-D(0.5 mg · L⁻¹),pH 值调至 5.8,121 °C 灭菌 20 min. 每瓶接种量为 5.0 g 鲜细胞. 蔗糖浓度为 3%,摇床转速为 120 r · min⁻¹,培养温度(25 ± 2)°C,连续光照 16 h · d⁻¹,光照强度 2 000 lx. 培养周期为 21 d,每 3 d 取样测定一次. 每个实验均重复 3 次,试验结果为 3 次实验的平均值,以下所有实验的处理均如此.

1.2.2 分析方法

(1) 细胞干重的检测:将不同培养时间的细胞培养物用布式漏斗抽滤,用灭菌的蒸馏水冲洗几次除去培养基残留,抽干后电子天平测定细胞鲜重(FW),置于烘箱 50 °C 干燥至恒重,冷却后得细胞干重(DW);

(2) 总糖的测定:用苯酚盐酸法测定^[12];

(3) 黄酮含量的测定:甘草总黄酮采用 70% 的乙醇的提取,料液比 30 : 1,25 °C 下超声 1 h,5,500 g 离心 10 min,滤渣重复提取 2 次,合并提取液减压浓缩至无醇后,用等量乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液减压浓缩,甲醇定容. 芦丁作为标准品,于 410 nm 测定吸光度.

2 结果与讨论

2.1 甘草细胞悬浮培养体系流变动力学

在设定的培养条件下,悬浮体系中甘草细胞在 250 mL 摇瓶中悬浮培养生长动力学曲线见图 1,从图中可看出,细胞经过延迟期后在第 6 d 进入对数生长期,呈现典型对数生长特征,6~18 d 细胞生物量增加速度较快,18~21 d 细胞生物量继续增加,但生长增速放缓;随着细胞生物量增加,黄酮浓度增加,0~3 d 黄酮浓度较小,3 d 后,甘草黄酮浓度快速增加,第 21 d 达到最大值 81.5 mg · L⁻¹;培养基中蔗糖的浓度则随着细胞生物量增加而下降.

2.2 甘草细胞悬浮培养体系动力学模型

2.2.1 细胞生长动力学模型

胀果甘草细胞悬浮培养体系中细胞生长的

变化曲线基本上呈现“S”型,与 Logistic 方程所描述的有限空间内种群增长的基本规律相符,因此选用 Logistic 方程研究胀果甘草细胞悬浮培养体系细胞生长动力学行为^[13-14]. Logistic 方程微分形式为:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X; \quad (1)$$

其积分形式为:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max} t)}}; \quad (2)$$

其中 $\alpha = \ln \frac{X_{\max} - X_0}{X_0}$, X_0 为细胞的初始浓度, $g \cdot L^{-1}$, 由(1)式可以得到细胞比生长速度 μ :

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right); \quad (3)$$

2.2.2 产物合成动力学模型

根据产物形成与细胞生长的关系,Gaden^[15]将产物的形成分成 3 类,Luedkeing 和 Piret 提出采用式(4)来描述产物形成与细胞生长的关系^[14]:

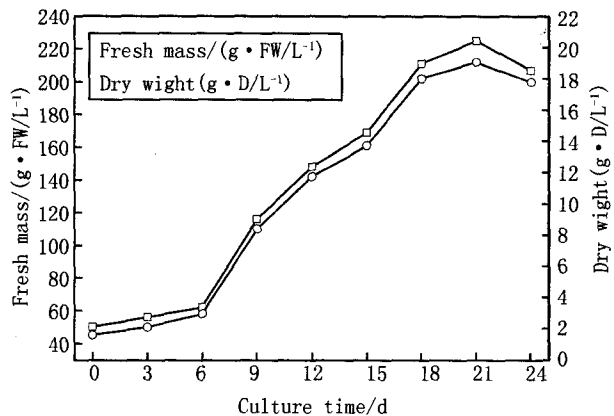


图 1 悬浮培养细胞生长动力学曲线

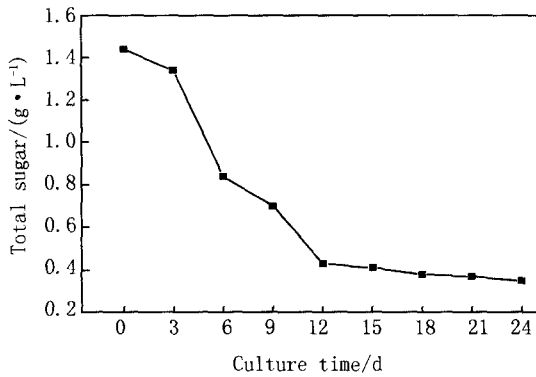


图2 碳源消耗动力学曲线

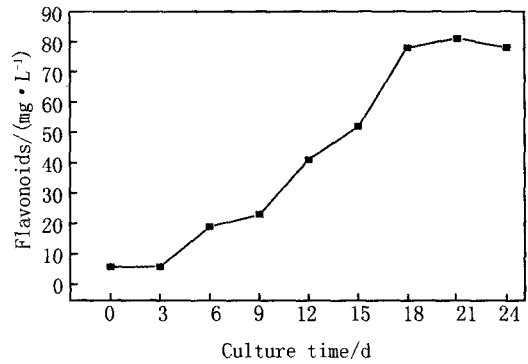


图3 甘草黄酮合成动力学曲线

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X. \quad (4)$$

将式(4)变形为:

$$dP = \alpha dX + \beta X dt. \quad (5)$$

由式(3)可以得到:

$$X dt = \frac{1}{\mu} dX = \frac{X_{\max}}{\mu_{\max} (X_{\max} - X)} dX; \quad (6)$$

式(6)代入式(5)得:

$$dP = \alpha dX + \frac{\beta X_{\max}}{\mu_{\max} (X_{\max} - X)} dX; \quad (7)$$

式(7)积分得:

$$P = \alpha X - \beta \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \ln(X_{\max} - X); \quad (8)$$

令 $A = -\frac{\beta X_{\max}}{\mu_{\max}}$, $B = \alpha$, 式(8)变为:

$$P = A \ln(X_{\max} - X) + BX; \quad (9)$$

将式(2)代入式(9)得:

$$P = A \ln\left(X_{\max} - \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max} t)}}\right) + B \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max} t)}}; \quad (10)$$

式(8)~(10)为黄酮合成动力学模型.

2.2.3 糖消耗动力学

碳消耗主要用于细胞生长,细胞维持和产物合成3方面,则有^[16]

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y_{P/S}} \cdot \frac{dP}{dt}. \quad (11)$$

将式(11)变形的:

$$-dS = \frac{1}{Y_{X/S}} dX + mX dt + \frac{1}{Y_{P/S}} dP. \quad (12)$$

令 $\frac{1}{Y_{X/S}} = C$, $\frac{1}{Y_{P/S}} = D$, 代入式(12)有:

$$-dS = CdX + mX dt + DdP. \quad (13)$$

式(6)代入式(13)得:

$$-dS = CdX + m \frac{X_{\max}}{\mu_{\max} (X_{\max} - X)} dX + DdP. \quad (14)$$

式(7)代入式(14)有:

$$-dS = CdX + m \frac{X_{\max}}{\mu_{\max} (X_{\max} - X)} dX + D\left(\alpha dX + \frac{\beta X_{\max}}{\mu_{\max} (X_{\max} - X)} dX\right). \quad (15)$$

令 $A = \alpha, B = \frac{\beta X_{\max}}{\mu_{\max}}, E = m \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}}$ 代入式(15)有:

$$-dS = CdX + \frac{E}{X_{\max} - X}dX + D\left(AdX + \frac{B}{X_{\max} - X}dX\right); \quad (16)$$

$$-dS = CdX + ADdX + \frac{E + BD}{X_{\max} - X}dX. \quad (17)$$

对式(17)积分得:

$$-S = CX + ADX + (E + BD)\ln(X_{\max} - X); \quad (18)$$

化简有:

$$S = (E + BD)\ln(X_{\max} - X) - (C + AD)X. \quad (19)$$

令 $\alpha = E + BD, \beta = C + AD$, 代入式(20)有:

$$S = \alpha \ln(X_{\max} - X) - \beta X; \quad (20)$$

将式(2)代入式(19)有:

$$S = \alpha \ln\left(X_{\max} - \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max}t)}}\right) - \beta \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max}t)}}; \quad (21)$$

式(19)~(21)为碳消耗动力学模型.

2.3 模型验证及参数求解

采用 Origin Pro 8.0 软件的数据分析功能处理实验数据,验证模型,拟合结果见表1、表2. 模型拟合值和试验值吻合较好,表明建立的动力学模型能较好地预测实际的培养过程.

表1 细胞生长动力学模型参数

X_{\max}	α	μ_{\max}	R^2	拐点值(t, x)
242.741 25	1.859 02	0.182 56	0.968 46	(10.181 27, 121.370 8)

表2 黄酮合成、基质消耗动力学模型参数

	A	B	α	β	R^2
黄酮合成	1.856 24	0.372 13	—	—	0.964 17
总糖消耗	—	—	5.973 53	0.092 89	0.975 64

2.4 最适宜接种时间

Logistic 曲线 $\frac{dX}{dt} = \mu_{\max}\left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)X$ 在 $\left(\frac{X_{\max}}{2}, \frac{\mu_{\max}X_{\max}}{4}\right)$ 存在极值点,相应的 $t = \frac{\alpha}{\mu_{\max}}$, 因此,曲线 $X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max}t)}}$ 的 $\left(\frac{\alpha}{\mu_{\max}}, \frac{X_{\max}}{2}\right)$ (称拐点)是细胞生长的关键点,此点处具有最大斜率,生物学意义为细胞生长速率变化从越来越快开始变为越来越慢. 根据拐点的意义可以理解为此点为细胞生长加速度最大的时间点,同时也是生长变化由快变慢的分界点^[15]. 由表1可知,胀果甘草细胞悬浮培养细胞生长的拐点时间值为9~11 d,此时细胞生长加速度最大,且生长速度开始由快变慢的关键时期,此时作为接种时期细胞能较快适应环境,生长繁殖快,因此将培养9~11 d的细胞接种至摇瓶或反应器进行扩大培养最适宜.

2.5 倍增时间

令 $X = 2X_0$, 代入 $X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max}t)}}$, 可得倍增时间 t 为:

$$t = \frac{\alpha + \ln \frac{2X_0}{X_{\max} - 2X_0}}{\mu_{\max}}. \quad (22)$$

当 X_0 未知时,由于在延迟期内细胞生长缓慢,所以细胞初始浓度 X_0 可以用延迟期内细胞浓度的平均值或延迟期末细胞浓度 X_a 替代,于是由式(2)可得:

$$X = 2X_0 \approx 2X_a = \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max}t)}}. \quad (23)$$

由式(23)可得倍增时间 t 为:

$$t = \frac{\alpha + \ln \frac{2X_0}{X_{\max} - 2X_0}}{\mu_{\max}} \quad (24)$$

在 250 mL 摇瓶中,细胞生长的倍增时间计算值为 9.333 936 d,与实验值比较符合.

2.6 X_{\max} 值

Logistic 方程 $X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{(\alpha - \mu_{\max} t)}}$ 中的 X_{\max} 值是表示细胞生长过程中细胞浓度的最大值, X_{\max} 值是在特定试验条件下获得的,不同的试验条件和细胞株, X_{\max} 值不同,如改变培养基组成、添加诱导物、改变反应器型式等等都会改变 X_{\max} 值. 由表 2 可知,本实验条件下,250 mL 摇瓶中胀果甘草细胞悬浮培养的 X_{\max} 为 242.741 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

3 结 论

1) 探讨了胀果甘草细胞悬浮培养过程中,细胞生长、基质消耗及产物合成的动态变化,将 Logistic 方程应用于建立胀果甘草细胞生长动力学模型、黄酮合成动力学模型和基质消耗动力学模型,采用 Origin Pro 8.0 软件的数据分析功能对实验数据进行拟合,模型拟合值和试验值吻合较好,表明建立的动力学模型能很好地符合实际的培养过程.

2) 建模的过程中发现,在细胞培养的特定阶段,方程 $\left(\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \times \frac{1}{s} + \frac{1}{\mu_{\max}}\right)$ 的预测值偏离了实验数据(细胞生长的延迟期,最大误差为 -34.55%),对甘草黄酮合成初期来说,Luedeking-Piret 方程的预测值和实测值的最大相对误差是 -90.82%,这些结果表明胀果甘草细胞生长是受营养物质抑制或产物抑制的,上述方程适用于延迟期以后的培养时段.

3) 在细胞生长动力学模型的基础上,对最适宜接种时间、倍增时间、 X_{\max} 值进行了讨论,研究了它们的变化规律.

4) 模型预测值与实际实验结果的拟合度分别达到 96.8%,96.4%,97.6%,说明此模型具有一定的准确性、合理性,但同时模型与实验结果还是存在一定的偏差,这主要是因为建模的过程中作了一定程度的简化处理,把整个细胞悬浮体系看成一个相对均匀的体系,把悬浮细胞简化为均匀的质点,这些假设与甘草悬浮培养的实际情况还有一定的偏差,还需要在根据实际情况不断的修订的基础上,得到准确度更高的动力学模型,以更好地控制工业化操作.

符号说明

m ——底物的维持系数, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	P ——产物浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
S ——底物浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	X ——细胞浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
X_{\max} ——最大细胞浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$Y_{P/S}$ ——对底物的产物得率系数, $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
$Y_{X/S}$ ——对底物的细胞生长得率系数	$g \cdot \text{g}^{-1} \alpha$ ——模型常数,
β ——模型常数	μ_{\max} ——最大比生长速率, d^{-1}

参 考 文 献

- [1] 周少奇,姚汝华,唐立民,等. 反应器生态系统两相流变流体动力学数学模型[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,1998,26(1):60-64.
- [2] Frazier G C. A simple, leaky cell growth model for plant cell aggregates[J]. Biotech Bioeng,1989,33(3):313-320.
- [3] Bailey C M, Nicholson H. A new structured model for plant cell culture[J]. Biotech Bioeng,1989,34(10):1331-1336.
- [4] Hooker B S, Lee J M. Application of a new structured model to tobacco cell cultures[J]. Biotech Bioeng,1992,39(7):765-774.
- [5] Lapidus L, Amundson N R. 化学反应器理论[M]. 北京:石油工业出版社,1984.
- [6] Luedeking R, Piret E L. A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH[J]. J Biochem Microbiol Tech Eng,1959,1(4):393-412.

- [9] 汪晓瑞,吴晓杰. 太极拳引起膝关节损伤及预防的生物力学分析[J]. 辽宁体育科技,2012(3):32-35.
- [10] 冀琳. 优秀跆拳道运动员后踢技术动作的生物力学分析[D]. 西安:西安体育学院,2012.
- [11] 宋渊. 陈式太极拳揽扎衣动作生物力学分析[D]. 北京:北京体育大学,2011.

Vital-Dynamic Analysis on Taekwondo Poomsae Yeopchag

TANG Shouyan

(College of P. E. , Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The research according to analysis on image of Poomsae Yeopchag and EMG, analysed the character of this movement and technical elements as well as muscle activity during side kick. It provided scientific resources, which gave the correct guidance to instructor and effective direction to the players to improve their competitive ability and skill.

Keywords: Taekwondo; Poomsae; Yeopchag; mechanics analysis

(上接第 126 页)

- [7] Guaradiola J, Iborra J L, Canovas M. A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures [J]. Biotec Bioeng,1995,46(3):291-297.
- [8] 戚以政,夏杰. 生化反应工程[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [9] 贾士儒. 生物反应工程原理[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [10] 张凯丽,郑晗青,邓晓敏,等. 酿酒酵母工程菌分批发酵产 UMP 动力学模型[J]. 食品工业科技,2015,36(9):158-161.
- [11] 汤斌,许钟源,李松,等. 匍枝根霉纤维素酶发酵条件优化及分批发酵动力学模型的构建[J]. 食品与发酵工业,2014,40(1):85-90.
- [12] 李雅丽,王红霞,杨英,等. 胀果甘草悬浮细胞中黄酮类化合物 HPLC 分析[J]. 食品研究与开发,2012,33(194):118-122.
- [13] Zhang C Y, Dong Y S, Li Y L, et al. Unstructured models for suspension cultures of *Taxus media* cells in a bioreactor under substrate-sufficient conditions[J]. BIOCHEM ENG J,2013,71:62-71.
- [14] 杨金水,黄建新. 动胶菌发酵生产聚羟基脂肪酸的动力学模型[J]. 化工学报,2006,57(7):1655-0657.
- [15] Gaden E L. Fermentation process kinetics[J]. J Biochem Microbiol Technol,1959,1(4):413-429.
- [16] 马挺,李京浩,李国强,等. 红球菌 DS-3 脱硫发酵动力学模型的建立[J]. 化工学报,2006,57(6):1418-1421.
- [17] 梁新红,孙俊良,赵瑞香,等. 嗜酸乳杆菌细胞生长数学模型的建立[J]. 江苏调味副食品,2006,23(5):11-13.

Non-structural Dynamical Mathematical Analysis of *Glycyrrhiza Inflata* Batal Cell Suspensions Culture System

MENG Tingting, GUO Hui, ZHENG Chunli, LI Yali

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

Abstract: Based on the establishment of a stable *Glycyrrhiza inflata* cell suspension culture system, dynamic changes about cell growth, substrate consumption and product synthesis in the system were analyzed. Using Excel 2013 and Origin Pro 8.0 software to process experimental data, model parameters, corresponding non-structural kinetic models were established. Analog value and experimental values were very consistent, the correlation coefficients were 0.968 46, 0.964 17, 0.975 64 respectively. This indicates the dynamic models can well predict suspension culture process of *Glycyrrhiza inflata* cell. This has important significance to guide the cell suspension culture in the reactor, and to provide a theoretical basis for the bioreactors design.

Keywords: licorice cells; suspensions; kinetics modeling; bioreactors