

怀槐细胞悬浮培养的结构化动力学模型

Structure Kinetic Model of *Maackia amurensis* Cells in Suspension Culture

罗 凯^{1,2}, 查学强¹, 罗建平^{1*}

LUO Kai^{1,2}, ZHA Xue-Qiang¹ and LUO Jian-Ping^{1*}

1 合肥工业大学生物与食品工程学院,合肥 230009

2 重庆三峡学院生物系,重庆 404000

1 School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

2 Department of Biology, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China

摘 要 为探明怀槐细胞生长、异黄酮染料木素合成与底物消耗间的关系,建立了怀槐细胞悬浮培养的结构化动力学模型。模型预测分析了胞内外的蔗糖代谢、胞内结构组分变化、胞内中间组分的变化、细胞呼吸损失以及胞内外异黄酮染料木素的合成情况。模型各参数灵敏度的分析表明 k_{bl} 、 k_{l2} 和 k_p 是最为灵敏的参数,其调节 10% 时,目标函数变化的最大比例分别达 12.8%、4.61% 和 2.54%,其它参数对目标函数变化的影响均小于 0.5%。该模型预测值与实验值具有较好的吻合性。

关键词 怀槐, 悬浮培养, 结构模型, 染料木素

中图分类号 Q811.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0657-05

Abstract A structure kinetic model was established for describing the relationship among cell growth, genistein formation and substrate utilization in suspension culture of *Maackia amurensis*. In this model, sucrose uptake, structure components production, intermediate matter changes, cell respiration loss and secondary metabolite (genistein) production were all predicted. The parameter sensitivity test was indicated that intermediate matter self-catalysis rate constant (k_{bl}), structure component synthesis rate constant (k_{l2}) and secondary metabolite synthesis rate constant (k_p) were the most sensitive parameters for this model. If k_{bl} , k_{l2} or k_p are changed by 10%, the range of the aim function value would be changed by 12.8%, 4.61% and 2.54%, respectively. Adjustment of the other parameters only aroused a change of less than 0.5% in the aim function value. The predicted values were in good agreement with those obtained experimentally.

Key words *Maackia amurensis*, suspension culture, structure model, genistein

利用植物细胞直接生产次生代谢产物是现代植物细胞培养工程(plant cell culture engineering)的一个重要应用领域。但次生代谢产物产率低的问题严重限制了这一技术的发展和运用。除细胞系生产不稳定、生产能力低外,细胞培养过程的复杂性使得产物合成的动力学过程不易控制到最优状态也是原因之

一。采用数学模型对动力学进行描述有助于认识细胞培养过程中影响产物合成的各参数的贡献及相互关系,为优化培养过程提供依据并可适时监控。描述细胞培养动力学采用的模型主要有 Monod 模型、Nyhholm 模型、Leudeking-piret^[1] 模型及结构化模型^[2-4]等。前 3 种模型由于形式过于简单而不能描

Received: November 28, 2006; Accepted: January 12, 2007.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No.30170059).

* Corresponding author. Tel: +86-551-2901504 ext 8420 or 8437; E-mail: jianpingluo1966@yahoo.com.cn

国家自然科学基金资助(No. 30170059)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

述细胞内多组分的变化及其相互作用的关系,或由于形式过于复杂导致待测、不可测参数较多等原因,常常不能获得理想的结果。而结构化数学模型考虑了培养细胞组分的多样性及细胞与环境之间的生理生长关系,能够对动力学过程的各参数的综合效应进行预测,在不同植物中,基于结构化数学模型的培养策略都较好实现了对整个培养体系的优化操作,提高产物的合成^[5,6]。

怀槐(*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim)是我国珍贵的野生药用植物,具有祛风湿、消炎、镇痛、健胃、止血等作用^[7]。对怀槐化学成分和生物活性的研究表明,染料木素(4',5,7-三羟基异黄酮, genistein)等异黄酮具有显著的保肝、抗氧化和抗辐射损伤作用^[8-10]。但由于怀槐生长缓慢,尚未人工栽培,野生资源十分有限,为保护和可持续利用怀槐野生药用资源,以植物细胞培养为手段,我们已经开展了怀槐细胞培养方面的研究,并证明怀槐细胞具有染料木素等异黄酮合成的能力,且生产的异黄酮具有显著的减轻小鼠 CCl_4 肝炎的作用^[7,11]。本研究在前期基础上,以怀槐细胞悬浮培养过程中蔗糖代谢为依据,建立较为合理的结构化动力学模型来描述怀槐细胞培养的过程,为实现利用怀槐细胞工业化生产染料木素等异黄酮的过程调控提供理论指导,到目前为止国内外尚无这方面的报道。

1 材料与方法

1.1 细胞摇瓶悬浮培养

悬浮培养用怀槐愈伤组织按文献方法进行继代培养^[12]。取生长 21d 的怀槐愈伤组织接种于盛有 60mL 液体培养基的 250mL 三角瓶中,接种量为 80g Fw/L,并于转速为 110r/min 水平恒温(25±2)°C 旋转摇床上悬浮暗培养,在培养 15d 的周期内考察动力学过程。每个处理 3~5 个重复。

1.2 组分分析方法

1.2.1 碳源分析 培养基碳源为蔗糖。培养基中可溶性糖的提取:收集悬浮培养细胞滤过的培养液,记录其体积,40°C 下减压浓缩,并用 ddH_2O 洗涤并定容至 10mL,加 5mL 95% 乙醇。静置过夜,于 12 000 r/min 下离心。上清液于 40°C 下减压蒸干,用 ddH_2O 洗涤并定容至 25mL,待测。细胞内可溶性糖的提取:称取新鲜材料 2g,迅速在液氮中研碎,转入 10 mL 刻度试管内,加 5mL 80% 乙醇。80°C 水浴并不断搅拌 40min。12000r/min 离心 10min,取上清液,沉淀加入 80% 乙醇,重复提取 2 次,合并上清液,减压蒸干,用 ddH_2O 洗涤并定容至 25mL。过滤,取滤液测

定。参见文献方法^[12]对样品中蔗糖、葡萄糖和果糖进行定量。

1.2.2 细胞培养物分析:

细胞干质 将细胞置于 60°C 恒温烘箱中烘至恒重,即为细胞干质。

细胞结构物质与胞内可溶性碳源分析:取一定量鲜细胞,加水研磨,于 3000r/min 下离心,上清液用于测定胞内可溶性碳源,将离心管下部不溶物质置于 60°C 恒温烘箱中烘至恒重,即为细胞结构物质干质。

1.2.3 异黄酮染料木素的分析:胞内染料木素测定:干燥之后的细胞充分研磨粉碎后于 50mL 乙醇(95%)中冷浸 24h,经超声波处理 30min 后过滤。重复提取 2 次,合并滤液,50°C 减压蒸干后,用 100mL 乙酸乙酯-水(5:1, V:V)混合溶液萃取 3 次,乙酸乙酯部分减压蒸干,再以甲醇溶解定容至 5mL,经 0.45 μm 孔径滤膜过滤后,于 Waters 高效液相色谱仪(包括 515 型泵、Un,检测波长 260nm,灵敏度为 3.0 AUFS, V-2487 检测器)上测定异黄酮染料木素含量。色谱柱为美国 Merck 公司的 Purospher® STAR C18 柱(4.6mm i. d. × 250mm 5 μm),流动相为甲醇-水-乙酸(体积比 10:10:1)溶液,柱温 25°C,进样体积 20 μL ,流速 1.0mL/min。染料木素标准品购自 Sigma 公司。测定数据用 WSC 色谱工作站(中科院大连化物所)处理,按外标法计算培养细胞中染料木素含量,染料木素产率为每升培养基收获的细胞中染料木素的积累量,以 mg/L 表示。异黄酮染料木素的标准曲线为 $Y = 6.37 \times 10^4 X - 1.45 \times 10^4$ ($r = 0.9992$)^[11]。

胞外染料木素测定:取一定量的培养液,用 100mL 乙酸乙酯-水(5:1, V:V)混合溶液萃取 3 次,其余步骤同胞内染料木素分析方法。

2 结果与讨论

2.1 怀槐细胞悬浮培养的结构模型

2.1.1 模型理论分析:怀槐细胞悬浮培养时,采用的碳源为蔗糖,研究证明,在培养过程中,培养基中蔗糖主要是在胞外蔗糖酶的作用下分解为葡萄糖(Ge)和果糖(Fe)后被细胞吸收利用的。Ge 和 Fe 进入细胞后,参与合成细胞物质、维持细胞活动及合成产物三条代谢途径(图 1)。细胞物质可分为结构物质与中间物质,因此根据植物细胞培养结构化模型的特点,通过对细胞代谢过程的简化,可以建立怀槐细胞培养的结构化动力学模型。图 1 中①描述的是胞外蔗糖(Se)在胞外蔗糖酶的作用下降解为 Ge 和 Fe 的过程,②、③是细胞吸收 Ge 和 Fe 的过程,以米

氏方程描述。其中 $[C_i]$ 为胞内可溶性碳源(C_i)的总浓度,④、⑤分别描述的是 C_i 用于维持细胞活动的呼吸消耗和细胞结构物质(S_i)的内源呼吸消耗,两者总和为细胞因呼吸消耗造成的质量损失 $[R_i]$ 。前者以米氏方程描述,内源呼吸是由细胞结构物质产生,用一级反应描述。⑥、⑦分别描述的是合成结构物质(S_i)和中间物质(E_i)的过程。 S_i 指不溶于水的细胞组分,如细胞壁和细胞膜等结构。 E_i 主要包含大量酶类及中间物等,其合成与自身含量有关,为自催化反应,速度常数为 k_{b1} 。⑧是指合成次生代谢产物染料木素 P_i 的过程,速度常数为 k_p ,产物抑制常数为 k_{mp} 。⑨描述的是部分产物 P_i 渗漏到培养基中,形成胞外产物 P_e 的过程。透过细胞膜的渗漏系数为 k_l ,传递过程以扩散方程描述。

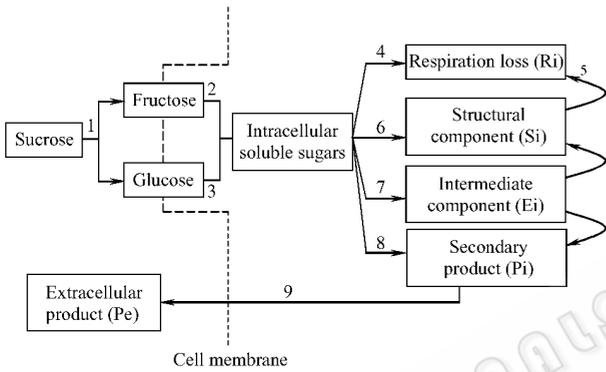


图1 基于糖代谢的怀槐细胞悬浮培养结构化动力学模型示意图

Fig. 1 Structure model of sugar metabolism in *Maackia amurensis* cell suspension culture

2.1.2 模型的建立:由物料平衡可知培养体系的任一组分 j 的生成速率为:

$$\sum_{k=1}^p r_{k,j} = \frac{1}{V} \cdot \frac{d}{dt} (V \bar{C}_j) \quad j = 1, \dots, n \quad (1)$$

以 $[\bar{C}_{ji}]$ 与 $[\bar{C}_{je}]$ 分别表示胞内与胞外 j 组分各自基于生物相体积 β (培养细胞)和非生物相体积 α (培养基)的浓度,令:

$$[C_{ji}] = \beta \frac{[\bar{C}_{ji}]}{V} \quad (2)$$

$$[C_{je}] = \alpha \frac{[\bar{C}_{je}]}{V} \quad (3)$$

$[C_{ji}]$ 与 $[C_{je}]$ 分别表示 j 组分以总体积 V 计的胞内与胞外浓度。则(2)(3)式转化为

$$\frac{d}{dt} [C_{ji}] = \frac{\beta}{V} \sum_{k=1}^p r_{k,ji} \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt} [C_{je}] = \frac{\alpha}{V} \sum_{k=1}^p r_{k,je} \quad (5)$$

将组分 $Se, Ge, Fe, Ci, Ei, Si, Ri, Pi$ 与 Pe 各自的生成速率 $\gamma_{k,j}$ 的表达式分别代入(4)(5)式,可得到以下微分方程组:

$$\frac{d}{dt} [Se] = -k_a \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Se]}{k_{ma} \frac{\alpha}{V} + [Se]} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} [Fe] = & k_a \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Se]}{k_{ma} \frac{\alpha}{V} + [Se]} \\ & - k_{mu1} \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Fe]}{k_{mu1} \frac{\alpha}{V} + [Fe]} \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} [Ge] = & k_a \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Se]}{k_{ma} \frac{\alpha}{V} + [Se]} \\ & - k_{u2} \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Ge]}{k_{mu2} \frac{\alpha}{V} + [Ge]} \end{aligned} \quad (8)$$

$$\frac{d}{dt} [Ei] = (k_{b1} - k_{b2} - k_p) \cdot \frac{v}{\beta} [Ci] \cdot [Ei] \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} [Ci] = & k_{u1} \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Fe]}{k_{mu1} \frac{\alpha}{V} + [Fe]} \\ & + k_{u2} \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Ge]}{k_{mu2} \frac{\alpha}{V} + [Ge]} \\ & - (k_{b1} + k_{b2} + k_p) \frac{v}{\beta} \cdot [Ci] \cdot [Ei] \\ & - k_r \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Ci]}{k_{mr} \frac{\alpha}{V} + [Ci]} \end{aligned} \quad (10)$$

$$\frac{d}{dt} [Si] = k_{b2} \frac{v}{\beta} [Ci] \cdot [Ei] - k_d [Si] \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} [Pi] = & \left[1 - \frac{[Pi]}{k_{mp}} \right] \cdot k_p \frac{v}{\beta} [Ci] \cdot [Ei] \\ & - k_l [Pe] \frac{\beta}{\alpha} [Pi] \end{aligned} \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt} [Ri] = k_r \frac{\beta}{V} \cdot \frac{[Ci]}{k_{mr} \frac{\alpha}{V} + [Ci]} + k_d [Si] \quad (13)$$

$$\frac{d}{dt} [Pe] = k_l \left(\frac{\beta}{\alpha} [Pi] - [Pe] \right) \quad (14)$$

$$\frac{d}{dt} [d] = \mu_{max} \frac{[Se]}{k_{max} + [Se]} \quad (15)$$

其中 $[Se], [Ge], [Fe], [Ci], [Ei], [Si], [Ri], [Pi], [Pe]$, α 和 β 可以直接通过实验测定。同时有:

(1)令 D 为细胞干质浓度(g/L),则 $[Ei]$ 可以通过 $[Ei] = D - [Ci] - [Si] - [Pi]$ 来求得。

(2)呼吸损失 $[Ri]$ 可以通过质量平衡求得 $[Ri] = ([Se] + [Fe] + [Ge] + D + [Pe])_{t=0} - ([Se] + [Fe] + [Ge] + D + [Pe])$

(3)根据实验有 $V = \alpha + \beta$ 。

2.1.3 模型参数求解和优化:采用非线性最优化Powell共轭方向法和Runge-Kutta法相结合对微分方程组进行联立参数估计(参数求解方框图如图2),并得到了结构化模型的曲线(图3)。

参数求解目标函数为:

$$\mu = \sqrt{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m ([C_{j,i}]_{calculate} - [C_{j,i}]_{measure})^2 / m}$$

式中 n 为状态变量的个数, m 为相互比较的状态点数。

模型求解和参数估计采用 Matlab 软件编程运行。模型拟合得到的最终目标函数 $\mu = 0.9027$, 此时培养基中蔗糖的初始浓度为 20g/L, 各参数见表 1。选用 15g/L 的蔗糖初始浓度时, 经过计算得到的参数最大变化比例小于 5%。

2.1.4 模型的灵敏度分析 状态对参数的灵敏度定义为状态变量对参数的变化率。通过灵敏度分析可以得知哪些参数是模型的敏感参数, 从而可以在参数估计时倍加注意。将模型方程组表示为:

$$\frac{d}{dt}X = F(X, K) \quad (16)$$

式中 $X = [x_1, x_2, \dots, x_{10}]^T$, $K = [k_1, k_2, \dots, k_{15}]$, F 为函数形式。在时刻 t , 状态 x_i 对参数 k_j 的灵敏度为:

$$\pi_{ij}(t) = \frac{\partial x_i}{\partial k_j}, \quad i = 1, \dots, 15 \quad (17)$$

灵敏度函数 $\pi_{ij}(t)$ 的值反映了在时刻 t 参数的不精确性对状态变量的影响大小。经过灵敏度分析, 发现模型对参数 k_{bl} 、 k_p 和 k_{12} 最为灵敏。将参数 k_{bl} 、 k_p 和 k_{12} 的数值分别改变 $\pm 10\%$, 目标函数变化的最大比例分别达 12.8%、4.61% 和 2.54%, 而其他参数的变化造成的目标函数变化比例小于

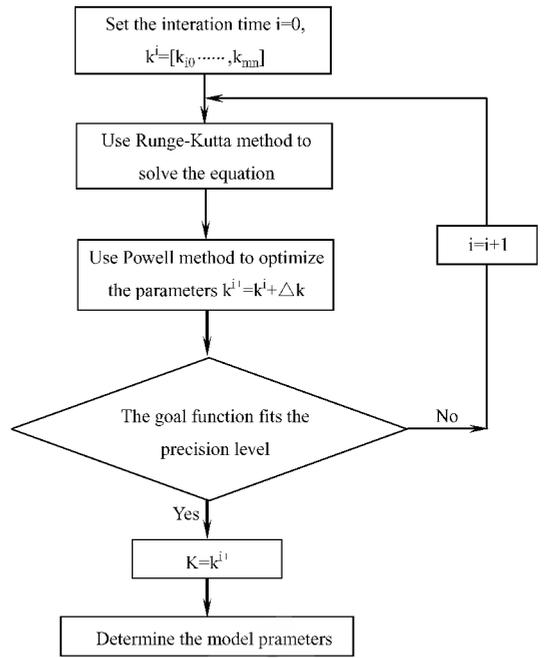


图 2 模型参数求解与优化流程图

Fig. 2 Calculation diagram of model parameters

0.5%, 由此可见这些主要参数对于模型对细胞生长和代谢行为的描述至关重要, 应尽量提高它们的估计精度; 这同时也反映了经过参数的优化求解, 模型能合理地描述怀槐细胞的动力学行为。

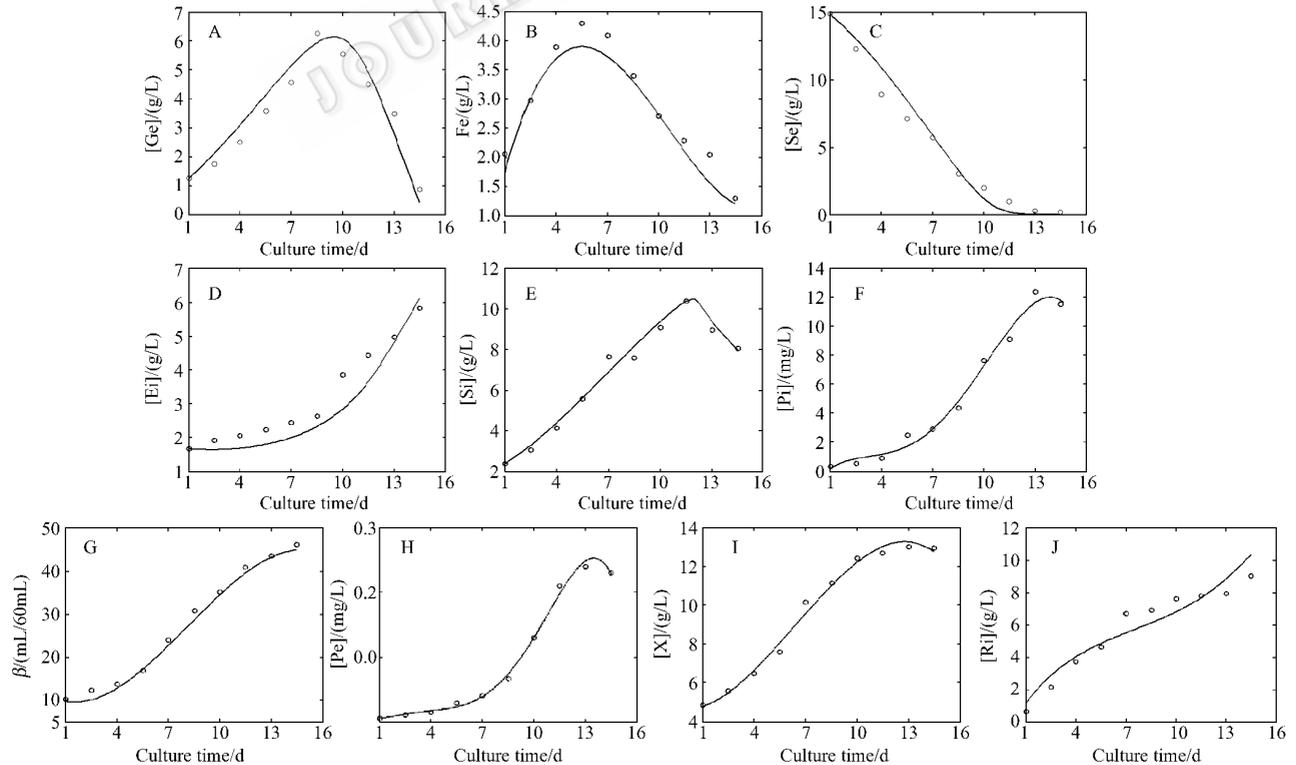


图 3 建模后各参数模型曲线与实验值对比图

Fig. 3 Comparison between experimental values and calculating values by structure model

表 1 结构化动力学模型参数

Table 1 The parameter of the structure model

Parameter	Value	Parameter	Value
k_i (d ⁻¹)	11.05	$K_{m,i}$ (gL ⁻¹)	2.17
k_{i2} (gL ⁻¹ d ⁻¹)	16.52	$K_{m,i2}$ (gL ⁻¹)	0.19
k_{bi} (gL ⁻¹ d ⁻¹)	5.64	$K_{m,i2}$ (gL ⁻¹)	0.12
k_{i2} (gL ⁻¹ d ⁻¹)	5.28	$K_{m,s}$ (gL ⁻¹)	6.72
k_d (d ⁻¹)	0.03	K_p (Lg ⁻¹ d ⁻¹)	0.13
$k_{m,a}$ (gL ⁻¹)	2.47	K_s (Lg ⁻¹ d ⁻¹)	0.09
$k_{m,p}$ (gL ⁻¹)	0.12	K_{ul} (gL ⁻¹ d ⁻¹)	11.79
k_{i2} (gL ⁻¹ d ⁻¹)	7.92		

3 结论

一个导致植物细胞大规模悬浮培养技术工业化进程缓慢的重要原因之一就是缺乏对培养过程的透彻合理的动力学研究。尽管近年植物细胞悬浮培养的建模工作已取得了很多成就,但由于植物细胞种类不同,相应的生长特性也不尽相同,因此建立的数学模型也就各具特色。本研究以细胞利用培养基中蔗糖为切入点建立的结构化动力学模型,可以直观的分析怀槐细胞培养过程中细胞生长、次生代谢产物合成与培养基底物消耗间的动态变化关系,这为实现怀槐细胞工业化生产异黄酮的过程调控奠定了可供参考的理论基础。

符号说明：

- [\bar{C}_{ji}] 胞内组分基于生物相体积 β 的浓度, g L⁻¹
- [\bar{C}_{je}] 胞外组分基于非生物相体积 α 的浓度, g L⁻¹
- [C_{ji}], [C_{je}]: 分别为以总体积 V 计的组分的胞内与胞外浓度, g L⁻¹
- [C_i]: 胞内可溶性碳源浓度, g L⁻¹
- [E_i]: 胞内中间物质浓度, g L⁻¹
- [Fe]: 胞外果糖浓度, g L⁻¹
- [Ge]: 胞外葡萄糖浓度, g L⁻¹
- $k_{m,a}, k_{m,ul}$, 分别为胞外蔗糖水解, 胞外果糖吸收、胞外葡萄糖吸收和细胞呼吸反应的米氏常数, g L⁻¹
- $k_{m,p}$: 产物抑制常数, g L⁻¹
- k_a, k_{ul}, k_{i2} : 分别为胞外蔗糖、果糖与葡萄糖的反应速度常数, g L⁻¹ d⁻¹
- k_{bi} : E_i 的自催化速度常数, g L⁻¹ d⁻¹
- k_{i2} : 结构物质的合成速度常数, g L⁻¹ d⁻¹
- k_d : 内源呼吸常数, d⁻¹
- k_1 : 次生代谢产物的渗漏系数, d⁻¹
- k_p : 次生代谢产物的合成速度常数, g L⁻¹ d⁻¹
- k_r : 维持呼吸的速度常数, L⁻¹ d⁻¹
- [Pe]: 胞外次生代谢产物浓度, g L⁻¹

- [Pi]: 胞内次生代谢产物浓度, g L⁻¹
- [Ri]: 细胞呼吸造成的质量损失, g L⁻¹
- $r_{k,j}$: 组分 j 的生成速率, g L⁻¹ d⁻¹
- [Se]: 胞外蔗糖浓度, g L⁻¹
- [Si]: 胞内结构组分浓度, g L⁻¹
- t : 培养天数, d
- μ : 参数优化的目标函数
- D : 细胞干质浓度, g L⁻¹
- α : 非生物相体积, L
- β : 生物相体积, L
- μ_{max} : 最大比生长速率, d⁻¹
- k_{mx} : 细胞生长米氏常数, g L⁻¹

REFERENCES (参考文献)

- [1] Mei XG (梅兴国), Mao YB (毛一兵), Lu MB (鲁明波). Progress on kinetic models of plant cell suspension culture. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物研究), 1997, 17(sup): 83-87.
- [2] Xu JK (许建峰), Xie X (谢键), Li N (李宁), et al. Structured model for compact callus aggregate suspension culture of *rhodiola sachalinensis*. *Journal of Dalian University of Technology* (大连理工大学学报), 1999, 39(1): 43-48.
- [3] Gulik WMV, Hoppen HJGT, Heijnen JJ. A structure model describing carbon and phosphate limited growth of *Cathranthus roseus* plant cell suspensions in batch and chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 41(7): 771-780.
- [4] Li C, Yuan YJ, Wu JC, et al. A structured kinetic model for suspension cultures of chinensis var. mairei induced by an oligosaccharide from *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(16): 1335-1343.
- [5] Zhang JN, Su WW. Estimation of intracellular phosphate content in plant cell cultures using an extended kalman filter. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002, 94(1): 8-14.
- [6] Glicklis R, Mills D, Sitton D et al. Polysaccharide production by plant cells in suspension: experiments and mathematical modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57(6): 732-740.
- [7] Luo JF (罗建平), Luo K (罗凯), Chen XY (陈晓艳), et al. Optimization of medium for isoflavone production in *Maackia amurensis* suspension cells based on neural networks and accelerating genetic algorithm. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2004, 20(5): 759-763.
- [8] Vengerovski AI, Kovalenko MY, Arbuzov AG et al. The influence of hepatoprotectors of plant origin on prednisolone effects in experimental toxic hepatitis. *Rastit Resursy*, 1998, 34: 91-95.
- [9] Palagina MV, Bezdetko GN, Moisejenko LI. Biological activity of extract of *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. wood in correction of irradiation damage of lung surfactant in rats. *Rastit Resursy*, 2000, 36: 78-82.
- [10] Guo Q, Rimbach G, Moini H, et al. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* 2002, 179: 171-180.
- [11] Luo JF (罗建平), Shen GDC (沈国栋), Jiang ST (姜绍通). Analysis and hepatoprotective function of isoflavones from callus cultures of *Maackia amurensis*. *Chinese Food Science* (食品科学), 2003, 24: 139-142.
- [12] Zha XQ, Luo JP, Jiang ST, Wang Y. Carbon and nitrogen metabolism in suspension culture of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. *Plant Biosystems*, 2007, 141(1): 62-