

银杏液体悬浮细胞培养产生黄酮的研究

胡燕梅, 韩晓红, 周全

(武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415)

摘要: 为探索银杏液体悬浮细胞培养条件下产生黄酮的工艺条件, 以银杏液体悬浮系为试验材料, 在 250 mL 的三角瓶中装入 80 mL 液体培养基, 置于 25 °C, 100 r/min 转速下摇床培养, 试验设计分别为光照与黑暗、培养时间、细胞聚集体的大小、前体物对银杏液体悬浮细胞系产生黄酮的影响。结果表明: 光照条件下培养 14 d 黄酮含量最高, 3~4 mm 粒径的细胞聚集体是黄酮合成的适宜细胞聚集体, 前体物 L-苯丙氨酸和乙酸钠对黄酮合成无明显的促进作用, 且对细胞生长有抑制作用。结论: 初步探索到银杏液体悬浮细胞培养条件下产生黄酮的工艺条件, 为银杏细胞悬浮培养工业化生产黄酮类物质提供一定的理论基础和技术参数。

关键词: 银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 液体悬浮细胞培养; 细胞聚集体; 黄酮; 前体物

中图分类号: Q946.833; Q813.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0360-04

A Study on the Flavonoids Production by *Ginkgo biloba* Suspension Cell Culture

HU Yan-mei, HAN Xiao-hong, ZHOU Quan

(Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institut, Wuhan 430415, China)

Abstract: Objective: Conditions for producing flavonoids were studied by the cell suspension culture of ginkgo. Methods: In cell suspension cultures, the suspension was placed in 80 mL of liquid medium in a 250 mL-flask and kept on reciprocal shaker(100 r/min) at 25 °C. The conditions of suspension cultures detected were as follows: light/darkness, culture time, size of cell aggregates and content of precursors. Results: The production of flavonoid reached a maximum by culture for 14 days under light. The cell aggregates with 3~4 mm of diameter were suitable for flavonoids synthesis. L-phenylalanine and sodium acetate as precursors had no significant promotion on flavonoids synthesis, however the cell growth was inhibited. Conclusion: Conditions for producing flavonoids were obtained by the cell suspension culture of ginkgo, which will further optimize the culture conditions required for the industrial production of flavonoids by the cell suspension culture of ginkgo.

Key words: *Ginkgo biloba* liquid suspension cell culture; cell aggregate sizes; flavonoids; precursor

银杏(*Ginkgo biloba* L.) 是国际上近代植物药研究开发的热点之一^[1-3]。利用植物细胞培养生产银杏黄酮是自 20 世纪 80 年代以来发展起来的新领域, 它已成为开发银杏这种药用植物资源的重要途径, 但多限于愈伤组织培养阶段进行黄酮的生产^[4-6]。近年来围绕提高产物含量、降低生产成本这一中心环节, 研究者们尝试了利用液体培养体系生产黄酮^[7-8]。本试验正是利用成功的液体悬浮细胞聚集体为材料, 探讨光照与黑暗、培养时间、细胞聚集体大小、前体物对悬浮系细胞生长与黄酮产生的影响, 为银杏细胞悬浮培养工业化生产黄酮类物质提供一定的理论基础和技术参数。

收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2011-01-20

基金项目: 武汉市高校科学研究资助项目(2008K079) 和湖北省教育厅科学技术研究项目(B20094008)

作者简介: 胡燕梅(1979—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事植物生物技术研究, E-mail: yanmeihu@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料与培养条件

银杏成功的液体悬浮体系由武汉生物工程学院细胞工程实验室提供,液体培养基配方^[9]: $N_6 + NAA 3.0 \text{ mg/L} + 6-BA 2.0 \text{ mg/L} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g/L}$ (pH 5.8)。培养材料于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 100 r/min 转速下摇床培养。

1.2 试验设计

(1) 光照与黑暗对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响。取 2.5 g 细胞聚集体接种于装有 80 mL 液体培养基的 250 mL 容量的三角瓶中,共接种 6 瓶,其中 3 瓶于光照培养(光照时间 10 h/d),另 3 瓶于黑暗培养,28 d 后取出细胞聚集体,检测细胞聚集体干质量和黄酮含量。

(2) 培养时间对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响。取 2.5 g 细胞聚集体接种于 80 mL 液体培养基中,于光照条件下培养(光照时间 10 h/d),共接种 15 瓶,每培养 7,14,21,28,35 d 取出 3 瓶,检测细胞聚集体干质量及黄酮含量。

(3) 细胞聚集体颗粒直径对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响。取直径大小分别在 $1 \sim 2 \text{ mm}$ 、 $3 \sim 4 \text{ mm}$ 、 $5 \sim 6 \text{ mm}$ 、 $7 \sim 8 \text{ mm}$ 、 $9 \sim 10 \text{ mm}$ 的细胞聚集体各 2.5 g 分别接种于 80 mL 液体培养基中,于光照条件下培养(光照时间 10 h/d),14 d 后取出细胞聚集体,检测细胞聚集体干质量和黄酮的含量。

(4) 前体物 L-苯丙氨酸和乙酸钠对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响。取 2.5 g 细胞聚集体接种于 80 mL 液体培养基中,于光照条件下培养(光照时间 10 h/d),共接种 9 瓶,培养 11 d 后取出 6 瓶悬浮系细胞聚集体材料,分别加入 0.1 mmol/L 的 L-苯丙氨酸和 0.5 mmol/L 的乙酸钠,培养 3 d 后取出细胞聚集体,以另外 3 瓶作为对照(CK)。检测细胞聚集体干质量和黄酮含量。

细胞聚集体干质量 = 烘干的愈伤组织细胞聚集体和滤纸的质量 - 滤纸的质量。

1.3 黄酮的提取及检测

(1) 提取及检测。称取愈伤组织 $13 \sim 15 \text{ g}$,经过在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 的烘箱 24 h 烘干后,研细,过 200 目的筛子,收集过筛的粉末。取 1 g 过筛的干粉溶解于 20 mL 的甲醇中,置于超声波水浴锅破碎细胞 30 min,过滤并收集滤液,加入 1.5 mol/L 的 HCl 10 mL 于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴回流 1 h。冷却后用甲醇定容至 50 mL ,通过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,取滤液备用。用紫外分光光度计,在 366 nm 下检测黄酮的吸光度 A 值。

(2) 黄酮含量的计算。槲皮素标准曲线及黄酮含量测定参考江静等^[8]的方法并作修改:准确称取烘至恒重的标样槲皮素,加甲醇完全溶解,配成 $2,4,6,8,10 \text{ }\mu\text{g/mL}$,以甲醇溶剂为空白对照,于 366 nm 测各浓度吸光值,重复 3 次,取平均值绘制标准曲线($y = 0.0717x - 0.0549, R^2 = 0.9991$)。于 366 nm 测定各试验号愈伤组织提取物,由标准曲线得槲皮素质量浓度($\mu\text{g/mL}$),并计算黄酮含量。

总黄酮含量 = 槲皮素浓度 $\times 2.51 \times 5 \times 50$ / 愈伤组织干粉质量(g)。

1.4 数据统计及分析

采用 Excel 2003 对数据进行处理,采用 SPSS 软件中完全随机单因素试验方差分析邓肯氏新复极差法(Duncan's Multiple Range Test)评估各试验处理间差异显著性。同类数据标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 光照与黑暗对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

液体悬浮细胞系置于光照和黑暗条件下培养 28 d 后观察。黑暗条件下培养的悬浮细胞系呈黄色,但生长很旺盛。而光照条件下愈伤组织呈黄绿色,细胞聚集体干重较黑暗条件下显著偏低,但其合成黄酮类化合物能力却显著高于黑暗培养的细胞聚集体(图 1)。

2.2 培养时间对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

在光照条件下经过 35 d 液体悬浮培养后,愈伤组织由翠绿慢慢转变为黄绿、黄白、黄褐,其细胞的生长和黄酮产生见图 2。

结果表明:黄酮含量在液体悬浮培养 14 d 后随着培养时间的增加而降低,细胞干质量随着液体悬

浮培养时间的增加而增加,在细胞聚集体为黄绿色时黄酮的含量达到最高值。故后期液体培养细胞系均以 14 d 为收集黄酮的最佳时间。

2.3 细胞聚集体颗粒直径对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

悬浮细胞系进入稳定期后,愈伤组织细胞聚集成团,但细胞聚集体直径往往不均一,其内部细胞的分化程度也有明显区别。对不同直径的细胞聚集体切开后观察其内部结构有变化,聚集体直径 ≤ 2 mm 的颗粒较松软,颗粒内外均呈翠绿色,细胞结构质地一致,聚集体直径 ≥ 5 mm 的颗粒外部呈淡绿色,但内部呈黄褐色,木质化程度高,质地较硬。

由图 3 可知:直径在 1 ~ 2 mm 的细胞聚集体增殖最快,生长最好,获得最高细胞干质量 14.86 g/L。直径 3 ~ 4 mm 的细胞聚集体质地松散,黄酮含量最高,达到 5.12 mg/g,同时细胞干质量也达到 14.48 g/L,而直径在 5 mm 以上的细胞聚集体黄酮含量明显降低。因此,在液体悬浮培养过程中,以 3 ~ 4 mm 粒径的细胞聚集体接种最好,既可获得较高黄酮含量,同时也可获得相应的细胞生物量。

2.4 前体物 L-苯丙氨酸和乙酸钠对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

将细胞聚集体培养 11 d 后,分别加入 2 种前体物 L-苯丙氨酸和乙酸钠到悬浮体系中,继续培养 3 d 后,收集细胞聚集体,并检测其细胞聚集体干质量和黄酮含量,结果见图 4。

图 4 结果表明:L-苯丙氨酸是生物合成黄酮的前体,但 L-苯丙氨酸对银杏悬浮细胞系产生次生物质黄酮促进作用并不显著。而乙酸钠对黄酮的产生并没有促进作用。同时,分别添加了 2 种前体物后细胞生物量要比照组有所降低,说明前体物 L-苯丙氨酸和乙酸钠对细胞的生长有抑制作用。实验表明,L-苯丙氨酸和乙酸钠虽是黄酮合成的前体物,但并不是影响次生物质黄酮合成的主要因素。

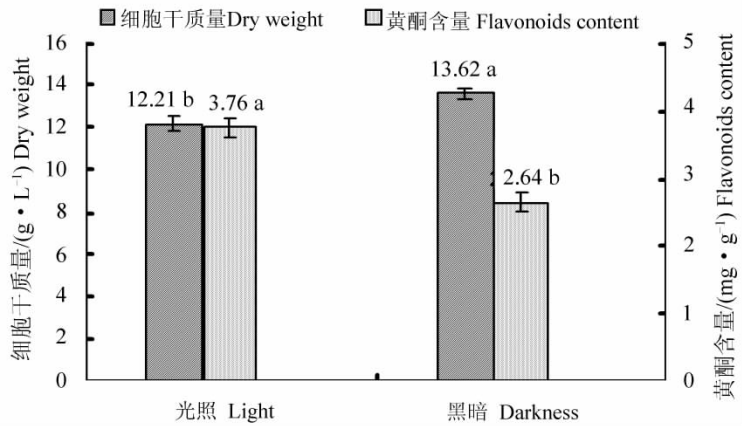


图 1 光照与黑暗对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

Fig. 1 The effect of light and dark on cell growth and flavonoid content

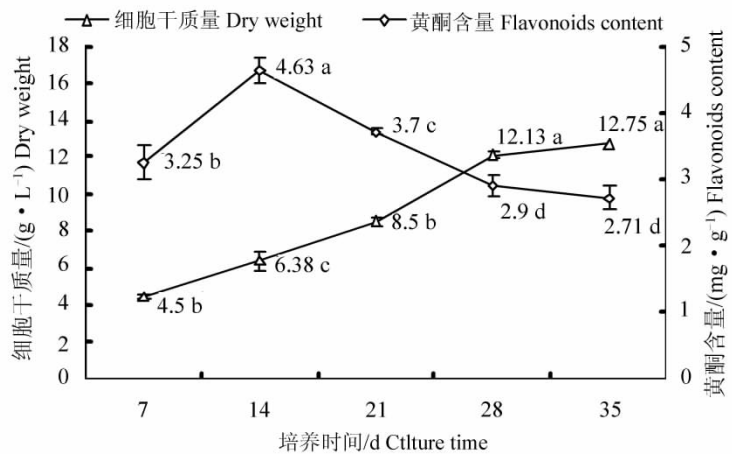


图 2 培养时间对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

Fig. 2 The effect of culture time on cell growth and flavonoid content

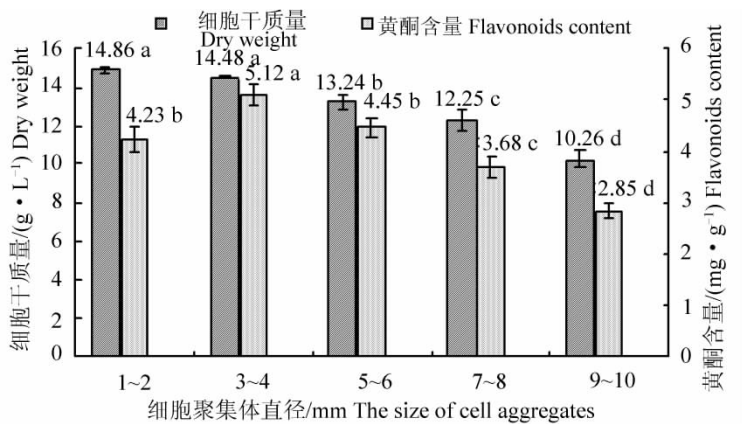


图 3 细胞聚集体直径对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

Fig. 3 The effect of cells aggregates sizes on cell growth and flavonoid content

3 结论与讨论

实验结果表明:以稳定的银杏液体悬浮细胞系为材料,在光照条件下,培养 14 d 黄酮含量最高,3~4 mm 粒径的细胞聚集体是黄酮合成的适宜细胞聚集体,而前体物 L-苯丙氨酸和乙酸钠对黄酮合成无明显的促进作用,但对细胞生长有抑制作用。

刘佳佳等^[10]曾探讨银杏致密细胞聚集体颗粒直径在悬浮培养过程中对银杏内酯产生的影响,结果显示 3~4 mm 粒径的细胞聚集体最有利于银杏内酯的合成。本实验也得到相似结论,即 3~4 mm 粒径的细胞聚集体是黄酮合成的适宜细胞聚集体。

在液体悬浮培养体系进入稳定期后,加入一些前体物,将对提高细胞悬浮培养中次生代谢产物的积累有促进作用。黄酮类化合物根据苯丙烷类代谢途径示意图^[11],一般认为是经醋酸-丙二酸途径生成的间苯三酚与经莽草酸途径生成的肉桂酸结合而生成,所以选择乙酸钠、苯丙氨酸为其生物合成的前体物。本实验结果表明在植物细胞的次生代谢过程中,苯丙氨酸是一个代谢中间体,是生物合成黄酮的前体^[12],同时在植物体内可以通过参与蛋白质的合成和作为碳源和氮源来影响细胞的生长^[13]。王梦亮等^[14]实验结果表明以 0.5 mmol/L 的乙酸钠为前体物效果最好,可使黄酮苷的产量比对照提高 76%。翟雪霞等^[15]报道 L-苯丙氨酸对红豆杉愈伤组织紫杉醇含量的增加有显著促进作用,紫杉醇含量高达 0.224%,是对照的 7 倍,达显著水平。本研究考察了 L-苯丙氨酸和乙酸钠 2 种前体物对黄酮积累的影响。但结果表明:苯丙氨酸对黄酮积累有促进作用,但并不明显。同时,可能由于前体物添加的时间不同、浓度不同,对不同种的植物产生黄酮的产量均有差异。因此,在进行液体悬浮培养时,应对不同前体物选择不同的浓度,在不同的时间里添加,或许可以达到降低生产成本和缩减生长周期的目的。

本试验液体悬浮培养过程中黄酮合成最高可达 5.12 mg/g,比固体培养阶段的黄酮含量 4.42 mg/g 提高了 15.84%。这与前人在银杏悬浮培养与固体培养阶段黄酮含量消长的规律相似。如姜玲等^[16-17]在液体阶段的黄酮量达到 6.80 mg/g,比固体培养阶段提高 54.7%;杨林等^[18-19]报道其液体培养比固体培养提高 68%,液体培养的黄酮含量比固体培养阶段提高的效果均比本试验要好。表明本试验中液体培养体系的影响因子仍可从更多方面深入探究。

参考文献:

- [1] Haslera, Stidero. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography, 1992, 605(1): 41-48.
- [2] Laurain D, Tremoiuillaux G J, Chenieux J. Production of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba* [J]. Phytochemistry, 1997, 16(1): 127-130.
- [3] 翁晓静,陈莉莉,张洪泉.银杏叶总黄酮对哮喘小鼠模型支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞凋亡的影响[J].药理学学报,2010,43(05):480-483.
- [4] 胡燕梅,郭云贵,蒋细旺,等.蔗糖及天然有机物对银杏愈伤组织合成黄酮的影响[J].西南农业学报,2010,23(3):690-693.
- [5] 陈颖,曹福亮,甘习华.不同状态银杏愈伤组织蛋白质电泳分析及电镜观察[J].西北植物学报,2006,26(11):2239-2243.
- [6] Stockigt J, Obitz P, Falkenhagen H, et al. Natural products and enzyme from plant cell cultures [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43(2): 97-109.

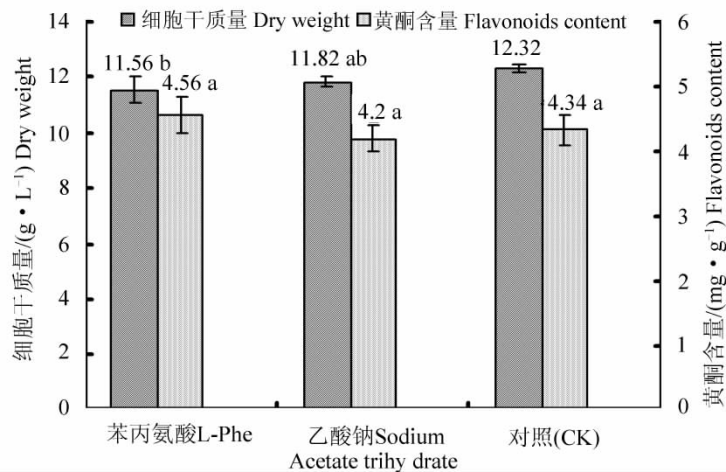


图4 L-苯丙氨酸和乙酸钠对悬浮系细胞生长及黄酮产生的影响

Fig. 4 The effect of L-Phe and sodium acetate trihydrate on cell growth and flavonoid content

参考文献:

- [1] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 102 - 113.
- [2] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 660 - 667.
- [3] 余元善. 广凉果成品中的微生物种群调查 [J]. 广东农业科学, 2008(2): 68 - 70.
- [4] 陶贤清, 陶能国. 一株异常汉逊酵母的分离与鉴定 [J]. 生产与科研经验, 2010, 265(36): 101 - 104.
- [5] Martin C, Galbe M, Wahlbom C F, et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose - utilising *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 274 - 282.
- [6] Niu Chao, Wang Yuelan, Yue Junjie. Identification of exotoxin - specific motifs / domains in bacterial exotoxin sequences and corresponding gene ontology analysis [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(9): 1150 - 1151.
- [7] 关艳丽, 李莉, 陈飞, 等. 1 株产漆酶白腐真菌的筛选和鉴定 [J]. 微生物学杂志, 2010(3): 74 - 77.
- [8] Solov'eva V, Okunev O N, Vel'kov V V. The selection and properties of *Penicillium verrucosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases [J]. Microbiology, 2005, 74(2): 276 - 279.
- [9] Pratt P L, Bryce J H, Stewart G G. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2003, 109(3): 218 - 228.
- [10] Wihmann C, Hans M, Bluemke W. Metabolic physiology of aroma - producing *Kluyveromyces marxianus* yeast [J]. 2002, 19(15): 1351 - 1363.
- [11] 曾爽, 黄振家, 景志忠, 等. 一株马克斯克鲁维酵母菌株的分离鉴定与形态观察 [J]. 甘肃科技, 2009, 25(10): 50 - 54.
- [12] Sanchez J, Cardona C. AI trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stocks [J]. Biore Source Technology, 2008, 99(13): 5270 - 5295.
- [13] 艾方, 胡慧磊, 彭丽桃. 发酵柑桔汁中产香酵母的筛选及生长特性研究 [J]. 中国酿造, 2010, 217(4): 67 - 69.
- [14] 许慧卿, 汪志君, 王畏畏, 等. 德汉逊氏酵母对风鸭肌肉蛋白降解的影响 [J]. 扬州大学学报, 2008, 29(2): 82 - 84.
- [15] Renouf V, Falcou M, Miot - Sertier C, et al. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking [J]. Appl Microbiol, 2006, 100(6): 1208 - 1219.
- [16] 徐军, 罗惠波, 崔德宝, 等. 大曲中酵母菌的分离及其鉴定 [J]. 酿酒, 2008, 25(8): 95 - 96.
- [17] 周秀珍, 孙继梅. 浅绿气球菌致新生儿败血症一例 [J]. 小儿急救医学, 2001, 8(4): 200 - 201.
- [18] 徐芳, 唐道邦, 肖更生, 等. 凉果盐胚中菌落总数与盐度酸度等指标间的相关性分析 [J]. 食品科技, 2010, 35(9): 321 - 324.

(上接第363页)

- [7] 莫小路, 黄学林, 孟辰. 银杏悬浮细胞叶绿体的分化与黄酮类产物的积累 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2003, 42(6): 94 - 97.
- [8] 江静, 尚富德, 高清雨. 银杏细胞悬浮培养及其黄酮类物质生产 [J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2002, 32(3): 20 - 24.
- [9] 胡燕梅, 张治华, 周骏江. 正交试验优化银杏胚愈伤组织继代培养及黄酮积累 [J]. 北方园艺, 2009, 22(12): 34 - 37.
- [10] 刘佳佳, 江文辉, 赵国玲, 等. 银杏致密细胞聚集体颗粒悬浮培养生产银杏内酯研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4): 16 - 19.
- [11] Chen S Y, Chen K S, Liu W H, et al. Regulation and expression of the PAL in plant and its outlook [J]. J Fruit Sci, 2003, 20(5): 351 - 357.
- [12] 潘瑞焱. 植物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 133.
- [13] 吕东平, 赵德修, 黄艳, 等. 前体物对水母雪莲悬浮培养细胞黄酮合成的影响 [J]. 云南植物研究, 2001, 23(4): 497.
- [14] 王梦亮, 任振兴, 刘滇生. 前体和诱导子饲喂黄芩愈伤组织强化黄芩苷生产研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 128 - 130.
- [15] 翟雪霞, 李友勇. 几种氨基酸前体物对红豆杉愈伤组织的生长和紫杉醇含量的影响 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(10): 2494 - 2497.
- [16] 姜玲, 章文才, 马湘涛. 生长素对银杏愈伤组织细胞生长和黄酮含量的影响 [J]. 果树科学, 1999, 8(4): 378 - 382.
- [17] 姜玲, 章文才. 银杏悬浮细胞系的建立及黄酮苷的产生 [J]. 果树科学, 1999, 16(2): 131 - 134.
- [18] 杨林, 周吉源. 银杏愈伤组织培养形成及其黄酮的产生 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 10(3): 48 - 51.
- [19] 杨林, 周吉源. 银杏细胞悬浮培养及黄酮的产生 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2002, 11(3): 43 - 45.