

西洋参细胞大量培养的研究

周立刚 郑光植 王世林

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

当西洋参细胞培养在MS培养液中, KNO_3 含量提高一倍而去掉 NH_4NO_3 时细胞生长速率和皂甙产量分别比在正常培养液中提高65.1%和166.2%。黑节草寡糖素和人参寡糖素均有利于西洋参细胞的生长和皂甙含量的提高, 尤其能增加Rg组皂甙的含量。西洋参细胞悬浮培养以生产皂甙收获的最佳时期为培养25天以上, 其合成皂甙的高峰在细胞生长的对数期稍后出现。细胞悬浮培养和发酵培养过程中均未见pH值回升的现象。pH值稳定的发酵培养和pH值任其变化的培养相比, 其皂甙含量, 生长速率和生物量均要高。最后对细胞的培养方式进行了比较。

关键词 西洋参; 皂甙; 寡糖素; 悬浮培养; 发酵培养

由于植物细胞大量培养技术的迅速发展, 使得生产有用次级代谢产物的植物细胞工程发展成为一门新兴的科研产业体系^[1]。植物细胞大量培养以生产次级代谢产物, 不仅克服了化学合成的缺点, 而且也克服了人工栽培中的不足。西洋参(*Panax quinquefolium*)为五加科(*Araliaceae*)人参属植物, 为名贵药材, 它具有健胃、降低血脂、镇静和造血等医疗作用, 现代化学和药理研究表明, 西洋参有效成分主要为皂甙(Saponin)。西洋参虽早有栽培, 但需5—6年才能成为商品, 他们的市场供需矛盾突出, 价格昂贵, 迄今为止其皂甙成分尚未人工合成, 因此有必要采用植物细胞大量培养的方法, 更快、更好地生产出数量多、质量优的西洋参制品, 以满足人们的需要。Jhang等^[2]曾进行过西洋参愈伤组织培养的研究, 郑光植等^[3]对其进行了悬浮培养的研究, 但对细胞悬浮培养过程中的动力学变化以及发酵培养的研究还未见报道。

材料与 方法

(一) 实验材料

从人工栽培的西洋参根中诱导出愈伤组织, 暗培养于附加2,4D 2.5mg/L, KT0.8mg/L, LH0.7g/L的MS^[4]培养基上。

(二) 培养方法

分三级培养, 第一级为愈伤组织培养, 第二级为细胞悬浮培养, 第三级为细胞发酵培养, 以上三级培养均为暗培养, 培养基为MS培养基, 愈伤组织培养温度为 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。细胞悬浮培养和发酵培养温度均为 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。悬浮培养和发酵培养(二者统称为大量培养)的激素浓度比愈伤组织培养降低一半。培养基在灭菌前均将pH值调至5.8, 发酵培养在实验过程中, 可按要求自行调节pH值。悬浮培养采用旋转式摇床(上海跃进医疗器械一厂, TNZ-82型), 转速120rpm, 振幅2.5cm, 采用500ml容积的三角瓶, 内装100ml培养液, 发酵培养采用日本丸菱公司生产的MD-500-10L型机械搅拌式发酵罐, 总容量为10L, 工作体积为6L, 培养时间为18天, 通气量为0.6—0.8vvm, 搅拌速度为50—60rpm。

本文于1989年9月15日收到。

(三) 生长速率、总皂甙含量、分组皂甙含量、糖利用率以及pH值的测定

1. 生长速率的测定: 细胞培养物培养一段时间后, 收获(300rpm离心 10min 或过滤), 然后置于 50°C 以下冰冻干燥至恒重, 文中所列结果均来自 3 次或 4 次重复平均值。采用绝对生长速率计算公式^[6] 即 $R = (W_2 - W_1) / t \cdot v$, 含义为单位体积(L)和时间(天)内的干重增加。在培养方式的比较研究中, 由于接种量差别较大, 还采用了相对生长速率的计算公式^[6] 即 $R = \ln(W_2 / W_1) / t$, 以上两计算公式的 R 代表生长速率; W_2 为收获物干重, W_1 为接种物干重, t 为培养时间。

2. 西洋参细胞培养物总皂甙的测定: 细胞培养物经冰冻干燥后, 粉碎, 用正丁醇冷浸 2 天, 经超声波(Soniprep150 型超声波仪, 日本)处理 10min, 用大孔吸附树脂D101(南开大学实验工厂)脱糖, 采用比色法^[6]测定。总皂甙除以干重为基础的百分含量表示外, 还以每一处理的皂甙百分含量乘以总干重得出的皂甙产率来表示。

3. 分组皂甙含量的测定: 采用高效液相色谱测定。色谱仪为美国 Waters 公司生产, 柱子为 Micropark-NH₂-5 氨基柱, 规格为 15cm(柱长)×4mm(内径), 柱压 48atm。分离条件: 流动相为乙腈:

甲醇:乙醇铵(v/v, 70:30:5:10), pH6.0, 流速 0.5ml/min, 柱温 25°C, 示差折光检测器, 灵敏度 2×10^{-5} Auf。

4. 糖利用率的测定: 当细胞培养一定时间后, 取其培养液, 按常规的蒽酮法^[7]测定, 测出所消耗的糖量除以起始加入的糖量即得糖利用率(URS)。

5. 培养液 pH 值的测定: 悬浮培养的培养液 pH 值, 采用 pH 值测定仪(TOA Electronics Ltd. HM-20E 型, 日本)测定。发酵培养液的 pH 值是通过 pH 探头连接的 pH 控制仪(LM-4HC 型, 日本丸菱)直接测定。

结果与讨论

(一) 氮源对西洋参细胞悬浮培养的影响

添加 6 种不同浓度的 KNO₃ 和 NH₄-NO₃ 的 MS 培养基, 对西洋参细胞悬浮培养的结果(表 1)表明: 仅加入 NO₃⁻ 有利于细胞的生长, 当 NO₃⁻ 浓度加倍又缺乏 NH₄⁺ 的情况下, 细胞的生长速率和皂甙含量分别比正常培养提高 65.1% 和 166.2%; 培养液中去掉 KNO₃ 而只有 NH₄NO₃ 时, 能提高皂甙含量, 但对生长有抑制作用, 正常培养生长速率为 0.223g dw./L·d, 而仅加入 NH₄NO₃ 的生长速率分别为 0.195g

表 1 氮源对西洋参细胞悬浮培养的影响

Table 1 Effects of nitrogen resources on suspension culture of *P. quinquefolium* cells*

硝酸钾 KNO ₃ (mg/L)	硝酸铵 NH ₄ NO ₃ (mg/L)	培养物干重 Dry weight of culture (gdw./L)	生长速率 Growth rate (gdw./L·d)	皂甙含量 Saponin content (%)	皂甙产率 Saponin yield (mg/L)
0	0	5.216	0.200	0.387	20.186
1650	0	6.275	0.242	0.203	12.751
0	1900	5.112	0.195	0.806	41.171
3300	0	9.559	0.373	0.577	55.146
0	3800	4.517	0.172	0.367	16.568
1650	1900	5.790	0.223	0.217	12.547

* 接种量 Inoculum quantity; 0.226g dw./L

dw./L·d(NH₄NO₃浓度为1900mg/L)和0.172g dw./L·d(NH₄NO₃浓度为3800mg/L)。Fujita等报道^[7], NH₄⁺抑制紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)培养细胞中紫草素衍生物(Shikonin derivatives)的产生而促进紫草细胞的生长;而Furuya等^[8]报道,当MS培养基中去掉NH₄NO₃仅添加KNO₃且浓度在500—600mg/L时,人参(*Panax ginseng*)培养细胞的生长速率相差不大。我们采用不同的氮源培养西洋参细胞的结果与培养人参细胞的结果相似。

(二)人参寡糖素和黑节草(*Dendrobium candidum*)寡糖素对西洋参细胞悬浮培养的影响

Funk等^[9]曾报道从酵母细胞中分离到的碳水化合物可做作为一种诱导剂,加入到大豆(*Glicinemax*)细胞培养物中,能抑制大豆细胞的生长但能明显地促进次级

代谢物glyceollin的形成。郑光植等^[3]报道,人参寡糖素能够促进三七(*Panax notoginseng*)细胞生长和提高其总皂甙的含量。我们用人参寡糖素和黑节草寡糖素对西洋参细胞悬浮培养的结果(表2)表明:这两类寡糖素均能有效地提高生长速率和总皂甙含量,并能有效地提高Rg组皂甙含量。人参寡糖素能使Rg组皂甙含量提高1.83倍,黑节草寡糖素能使Rg组皂甙含量提高0.78倍,这两类寡糖素还能影响Rg组与Rb组皂甙的比例,皂甙之比分别为6.283和6.247,而对照为3.525。以上结果不难看出这两类寡糖素对西洋参细胞的生长和次级代谢物皂甙的积累均有相似的促进作用,且可能有相似的作用机理。至于寡糖素如何作用,还有待于进一步研究。总之,寡糖素在植物细胞培养获得次级代谢产物的研究中,是一种很有前途的诱导剂。

表2 人参寡糖素和黑节草寡糖素对西洋参细胞悬浮培养的影响

Table 2 Effects of oligosaccharins of *P. ginseng* and *D. candidum* on cell suspension culture of *P. quinquefolium**

寡糖素 Oligo.	培养物干重 Dry weight of culture (g dw./L)	皂甙含量 Saponin content (%)	皂甙产率 Saponin yield(mg/L)			Rg组与Rb组 皂甙之比 Rg group/ Rb group
			Rg组皂甙 Rg group saponin	Rb组皂甙 Rb group saponin	总皂甙 Total saponin	
对照 Control	6.84	0.233	12.397	3.517	15.914	3.525
人参寡糖素 <i>P. ginseng</i> oligo.	9.70	0.420	35.122	5.590	40.712	6.283
黑节草寡糖素 <i>D. candidum</i> oligo.	8.36	0.307	22.063	3.532	25.595	6.247

* 接种量 Inoculum quantity: 0.48g dw./L

(三)西洋参细胞悬浮培养和发酵培养的时间进程

为了了解西洋参细胞悬浮培养的生长动态和皂甙积累情况,进行了西洋参细胞悬浮培养时间进程的研究,结果如图1所示。当细胞悬浮培养25天时,干重达最大值为9.62g/L,皂甙产率在培养25天时能明显增加,30天以后接近最大值。pH值

从开始培养时的5.95缓缓降至3.57,蔗糖利用率(URS)从开始时的0提高到81.79%。可见,作为西洋参细胞悬浮培养以生产次级代谢物皂甙,其最适培养期为25—30天,作为大量培养的孢子,要求细胞处于对数生长期,故最适培养期为20—25天。Tabata^[10]曾把细胞培养的产物-生长模型分为三个类型,西洋参细胞

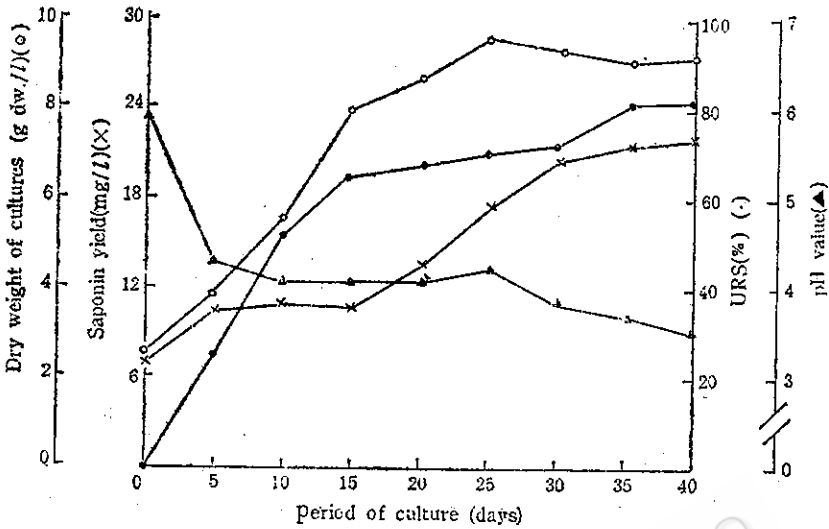


图 1 西洋参细胞悬浮培养的时间进程
Fig. 1 Time course of *P. quinquefolium* cell suspension culture

培养的产物-生长模型(图1)类似于第二种类型即产物形成进程落后于细胞的生长进程。

由于西洋参细胞生长缓慢,加之发酵罐培养过程中取样困难,仅对西洋参细胞发酵培养过程中pH值变化和糖利用率情况进行了测定,结果如图2所示。发酵培养的时间进程和悬浮培养的时间进程是很相似的,pH值从开始培养时的5.8降至

4.9,亦未见pH值回升的现象,URS从开始时的0提高到79.93%。

(四) pH值的变化对西洋参细胞发酵培养的影响

将一处理为培养过程中任pH值变化,另一处理为pH值稳定在 5.8 ± 0.2 ,结果如表3所示。pH值稳定在 5.8 ± 0.2 时,更有利于西洋参细胞的生长和提高皂甙含量,生长速率和皂甙含量分别为 $0.217 \text{ g dw./L}\cdot\text{d}$ 和 0.531% ;而pH值在培养过程中不调节任其变化时,细胞生长较慢,皂甙含量明显降低,生长速率和皂甙含量分

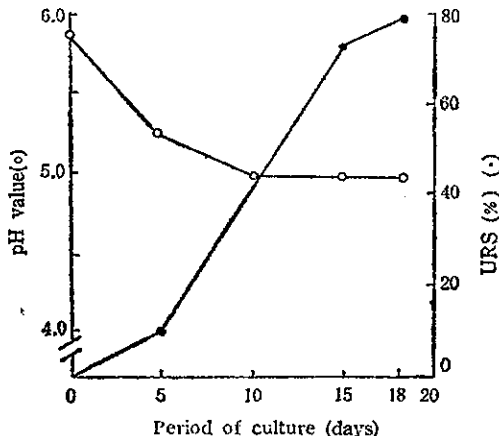


图 2 西洋参细胞发酵培养的时间进程
Fig. 2 Time course of *P. quinquefolium* cell fermentation culture

表 3 pH值的变化对西洋参细胞发酵培养的影响
Table 3 Effects of pH changing on fermentation culture of *P. quinquefolium* cells

pH值 pH value	接种量 Inoculum (g dw./L)	培养物干重 Dry weight (g dw./L)	生长速率 Growth rate (g dw./L·d)	皂甙含量 Saponin content (%)
固定在 5.8 ± 0.2	1.380	5.22	0.217	0.531
任其变化 Changed itself	1.745	4.28	0.141	0.251

固定在 5.8 ± 0.2

Fixed on 5.8 ± 0.2

任其变化
Changed itself

别为 0.141g dw./L·d和0.251%，从以上结果可以看出，西洋参细胞的生长和次级代谢物皂甙的积累要求有一个稳定而又适宜的pH值环境。

(五) 西洋参细胞培养方式的比较

植物细胞大量培养一般分为悬浮培养(即摇瓶培养)和发酵培养。对它们比较研究，结果如表4所示。细胞悬浮培养和发

酵培养的生长速率分别为 0.249g dw./L·d和 0.213g dw./L·d，而液体静止培养的生长速率为负值。由于接种量的差别较大，从而采用了相对生长速率计算公式，此公式不同程度地消除了接种量对生长速率计算的影响，从相对生长速率数值看，发酵培养和悬浮培养分别为 1.330d⁻¹和 0.026d⁻¹，静止液体培养的生长速率为

表 4 西洋参细胞培养方式的比较研究
Table 4 Studies on the Comparison of *P. quinquefolium* cell culture patterns

培养方式 Patterns of culture	培养时间 Period of culture (days)	接种量 Inoculum quantity (g dw./L)	工作体积(总体积) Working volume (Total volume) ml(mi)	皂甙含量 Content of saponin (%)	生长速率Growth rate	
					绝对 Absolute (g dw./L·d)	相对 Relative (d ⁻¹)
静止液体 Static liquid	25	6.69	100(500)	0.352	Negative	-0.214
正常悬浮 Regular suspension	25	6.69	100(500)	0.293	0.249	0.026
发酵培养 Fermentation	18	1.38	6000(10000)	0.531	0.213	1.330

负值。从皂甙含量看，发酵培养物为 0.531%，悬浮培养和液体静止培养的皂甙含量分别为0.293%和0.352%，均低于发酵培养物。对以上三种培养方式的培养细胞的镜检结果表明，液体静止培养细胞不成团，细胞碎片很多，这亦说明细胞的死亡速率大于生长。

植物细胞的发酵培养具有易于通气、氧溶速率高、节省能源和扩大规模培养等

优点，因而发酵培养成为植物细胞大量培养的主要方式^[11]。我们的研究结果亦表明，发酵培养无论对生长还是对次级代谢物的积累均是一种较为理想的培养方式。我们采用的装置是用来培养微生物的机械搅拌式发酵罐，由于植物细胞和微生物细胞存在很大的差异，故用来培养植物细胞还存在许多缺点。据报道，采用气升式发酵罐更适合于植物细胞的大量培养^[12]。

参 考 文 献

- [1] 郑光植：云南植物研究，增刊I：125—134,1988.
- [2] Jhang, J. J. et al.: *In Vitro*, 9(4):253—259,1974.
- [3] 郑光植等：云南植物研究，11(1): 97—102,1989.
- [4] Murashige, T. and Skoog, P.: *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473—497, 1962.
- [5] Singer, S. R.: *Canadian Journal of Botany*,64(1):233—237, 1986.
- [6] 章观德：药学学报，15(8): 175—180, 1980.
- [7] Fujita, Y. et al.: *Plant Cell Report*, 1(1):59—60,1981a.
- [8] Furuya, T. et al.: *Journal of Natural Products*, 47(1): 70—75, 1984.
- [9] Funk, C. et al.: *Phytochemistry*, 23(2):401—405.
- [10] Tabata, M.: In“Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application” (Barz, W. et al. eds.),pp.3—16, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,1977.
- [11] Wagner, F. and Vogelmann,H.: In“Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application” (Barz, W. et al. eds.),pp.245—252, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977.

[12] Fowler, M. W.: In "Plant Biology vol.3, Plant Tissue and Cell Culture" (Green, C. E. et al. eds.), pp.459—491, Alan R. Liss, Inc., New York, 1987.

STUDY ON MASS CULTURE OF *PANAX* *QUINQUEFOLIUM* CELLS

Zhou Ligang Zheng Guangzhi Wang Shilin
(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

It was found that MS medium minus NH_4NO_3 and added KNO_3 gave a higher growth rate and saponin content than regular MS medium. The growth rate and saponin content with the medium only added KNO_3 (3300mg/L) were increased 65.1% and 166.2% separately when compared with the regular medium. Application of oligosaccharins from *Panax ginseng* and *Dendrobium candidum* increased both saponin content and growth rate. Especially, the content of Rg group saponins was well stimulated. It was more than 25 days for the cell suspension cultures to produce saponins in large amounts. The curve of saponin formation lagged slightly behind the growth curve in cell suspension culture and fermentation culture. The cell fermentation culture with a fixed pH value was better than the culture with a changing pH value by itself on saponin content, growth rate and biomass. The culture patterns of *P. quinquefolium* cells were compared at last.

Key words

Panax quinquefolium; saponin; oligosaccharin; suspension culture; fermentation culture