

培养基和培养条件对栀子悬浮细胞合成多糖的影响

王关林^{1,2*} 石若夫² 方宏筠¹

¹(辽宁师范大学生命科学学院,大连市 116029) ²(大连理工大学化工学院,大连市 116022)

摘 要 对栀子悬浮细胞合成多糖的调控因子研究表明: B5 为最适培养基; 5 ~ 10d 继代周期的细胞可以保持良好的生长状态和多糖的合成能力; 80g/L 的鲜细胞的接种量有利于栀子细胞的生长和多糖的合成; 使用单一碳源时, 葡萄糖比蔗糖对细胞生长更有益, 但葡萄糖成本高, 因而混合碳源 45g/L (葡萄糖: 蔗糖 = 1:1) 是最佳配方; 氮源种类对细胞生长和多糖合成没有明显的影响, 但氮源浓度是主要因素, 40 ~ 50mmol/L 是最佳浓度, 同时运用悬浮细胞生产栀子多糖可以通过在不同时间收获的细胞来避免提取时黄色素的干扰, 具有很好的实际意义。

关键词 栀子, 悬浮细胞培养, 多糖

中图分类号 Q947.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)06-0688-05

大量临床实践表明多糖具有多种生物活性, 许多生物学专家预言多糖将成为抗艾滋病、抗肿瘤和抗衰老等新药的发展方向之一^[1]。到目前为止, 已有 300 多种多糖类化合物被从天然产物中分离提取出来, 其中来自植物, 尤其是中草药的水溶性多糖最为重要^[1]。李志孝等^[2]观察到栀子 (*Gardenia jasminoides* Eills) 多糖在体外对 S-180 肉瘤细胞和腹水肝癌细胞有一定的抑制作用。然而, 栀子多糖是从果实中提取, 资源有限, 而且提取率仅有 0.6%^[3]。同时从果实中提取多糖会受到同样具有水溶性的栀子黄色素的干扰。为此对栀子多糖的研究甚少, 也未得到充分利用。

应用植物细胞培养技术生产次生代谢产物一直是生物工程领域中一个重点课题。但是, 通过悬浮细胞培养生产初生代谢产物——多糖的研究很少^[4,5]。由于栀子多糖是初生代谢产物, 黄色素是次生代谢产物, 它们产生于植物细胞不同的生长时期, 通过控制细胞的收获时间, 可达到避免黄色素干扰多糖提取的目的。本文详细观察了生物和化学因子对栀子悬浮细胞的生长和多糖合成的影响, 为工业化生产提供了重要依据。

1 材料及方法

1.1 细胞株和培养条件

栀子细胞是从栽培植物叶子诱导得到的, 在含

1.0mg/L 6-苄基氨基嘌呤 (BA), 0.5mg/L 2,4-二氯环氧乙酸 (2,4-D) 和 30g/L 蔗糖的 B5 培养基中继代培养。150mL 摇瓶中装 50mL 培养基, 每摇瓶接种量为 40g/L 鲜细胞, 置于摇床 (110r/min, 25℃) 进行培养, 光照周期为 14h/10h, 光照强度为 1000lx, 15 ~ 20d 时收获细胞, 提取多糖并测定含量。

1.2 分析方法

细胞鲜重 (FW) 由定量培养的细胞经离心收集 (1000r/min, 10min) 后称重定量。提取多糖前先用 0.9% NaCl 洗细胞 2 次, 再用碱水提取粗多糖, 并用苯酚-硫酸法测定^[6], 培养基中的总糖用蒽酮-硫酸法测定^[7], 葡萄糖和果糖的测定参见文献 [8]。细胞生长量为收获细胞的总鲜重/培养液总体积 (g/L)。多糖生产量即多糖总提取量 (g/L), 而多糖含量 (%) = 多糖生产量 (g/L) / 细胞生长量 (g/L) × 100%。

2 结果与分析

2.1 栀子悬浮细胞的生长和多糖积累的曲线

取继代培养生长良好的栀子悬浮细胞, 分别接种于 B5、MS 和 White 培养基中, 接种量为 20g/L, 每隔 5d 随机取样, 测定细胞鲜重、提取并测定细胞中多糖的含量, 结果见图 1。栀子细胞在 3 种不同基本培养基中都是在 30d 左右细胞生长量达到最大值, 但 White 培养基中的细胞生长明显受到抑制, 其最大生长量约比另外两种培养基中的细胞少 100g/L,

收稿日期: 2001-06-25, 修回日期: 2001-08-23。

基金项目: 辽宁省教委攻关项目 (97-1207) 资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-0411-4258779; Fax: 86-0411-4212515; E-mail: guanlinwang@163.com

差异明显。同时我们还发现,作为初生代谢产物的多糖是在第 10 天左右含量最高,10d 之后多糖的含量会逐渐降低,但培养 10d 时每升的细胞数量少,当生长到 20d 时,细胞收获量大,因此尽管细胞中多糖含量略有降低,而每升培养液中多糖的产量则在培养的第 20 天达到最高(图 2),表现出初生代谢产物的模式。培养 30d 时细胞生长量达到最大,但细胞中多糖含量极低,只有 1g/L。另外在第 15 天以前从栀子细胞中未提取到黄色素,多糖粗提液为白色溶液。当 15~20d 后提取的多糖溶液开始附有黄色,而且随着培养天数增加黄色变深呈棕黄色,这说明细胞的主要次生代谢产物——栀子黄色素在 15d 前还未及生成或合成甚微,这一结果与钟青萍等的研究结果相同^[9],这为多糖的分离提取和纯化提供了便利条件。综合考虑这两个因素,我们选择了第 15~20 天为收获时间。

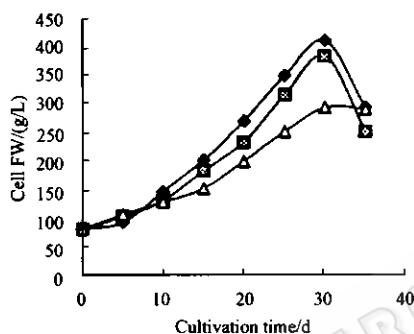


图 1 B5、MS 和 White 培养基中栀子悬浮细胞的生长曲线

Fig.1 Cell growth curve of *Gardenia jasminoides*

Eills in B5、MS、White suspension medium

◆:B5 medium; ■:MS medium; △:White medium

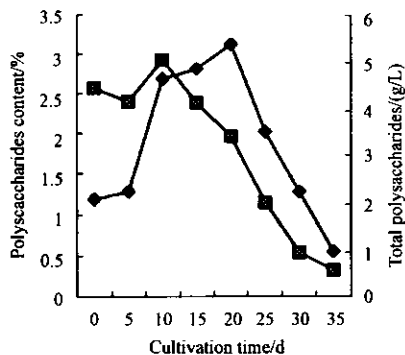


图 2 栀子悬浮培养细胞中多糖的含量和总生产量(B5 培养基)

Fig.2 Polysaccharide content and total polysaccharides of *Gardenia jasminoides* Eills in B5 medium

◆:Polysaccharides content(%); ■:Total polysaccharides (g/L)

2.2 接种量对细胞生长和多糖合成的影响

图 3 表明接种量对最终的细胞收获量影响不

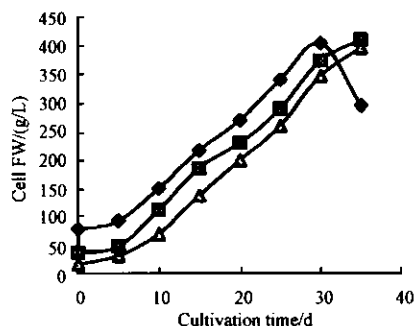


图 3 接种量对栀子悬浮细胞生长的影响

Fig.3 Effect of inoculum densities on cell growth in the flask culture of *Gardenia jasminoides* Eills

◆:Inoculum density 80g/L; ■:Inoculum density 40g/L;

△:Inoculum density 20g/L

大,最后均达到 410g/L 左右,但是接种量小的达到相同细胞量的时间会有延长。在相同培养天数下,细胞的收获量有明显的差异,20d 时接种量 80g/L 组为 300g/L 左右,而接种量 20g/L 组只有 200g/L。从工业化的角度讲达到最大细胞收获量的时间的延迟是非常不利的,因为不仅延长生产周期,而且在指数后期和静止期的细胞中多糖含量明显下降。实验中观察到培养 15~20d 时,80g/L 接种量组的多糖收获量达 6.45g/L,比 20g/L 的多糖产量高 2.5 个百分点,因此 80g/L 湿细胞的接种量最为合适,如果接种量大于 80g/L,由于细胞密度太大,生长速率反而降低。

2.3 继代周期对细胞生长和多糖合成的影响

细胞培养继代周期是维持长时间的细胞高产能力的重要指标之一^[10]。实验中的继代周期是指培养瓶中培养基的更换时间。如图 4 所示继代周期为 5d、10d、20d 和 30d 的细胞生长量。可见继代周期对

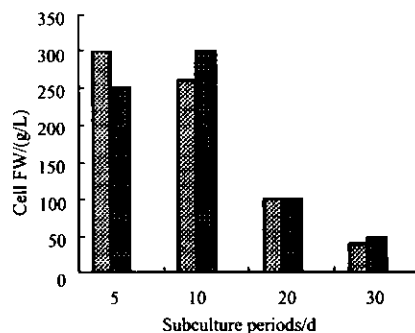


图 4 继代周期对栀子悬浮细胞生长和多糖合成的影响

Fig.4 Effect of subculture periods on cell growth and polysaccharide synthesis in suspension culture of *Gardenia jasminoides* Eills

□:Cell FW; ■:Polysaccharides content

细胞生长速率是有明显影响的。继代周期为 5d 和 10d 的样品,每次收获的细胞生长量比较稳定,均在

300g/L左右。而继代周期为 20d 和 30d 的样品,其每次收获时的细胞量却逐渐下降。另外,细胞在继代周期为 5d 和 10d 的培养条件下具有较高的多糖含量,分别为 2.5% 和 3.0%。而在继代周期为 20d 的条件下,细胞中多糖的含量很低。综合起来看,继代周期为 10d 的条件下生产多糖是比较理想的。

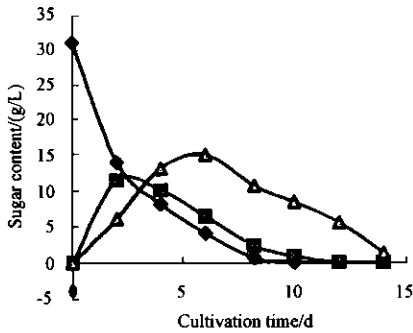


图 5 梔子悬浮细胞的糖利用动态曲线

Fig.5 Time-courses of sugar utilization in suspension culture of *Gardenia jasminoides* Eills

◆: Sucrose; ■: Glucose; △: Fructose

2.4 碳源对细胞生长和多糖合成的影响

植物细胞培养可采用蔗糖、果糖或葡萄糖为碳源。在分别向每升 B5 培养基中加入 10g、30g 和 50g 葡萄糖或蔗糖时,我们发现 30g/L 的碳源对梔子细胞生长是最合适的。在一定浓度范围内细胞中多糖的含量却随着初始糖浓度的增高而增加。不同碳源和混合碳源对合成梔子多糖的比较结果见表 1。葡萄糖比蔗糖更有利于细胞的生长和多糖的合成。从生产实践和经济成本分析,两者混合使用(葡萄糖:蔗糖 = 1:1)为最佳配方。

图 5 所示的是梔子悬浮细胞的糖利用动态曲线,从中可以看出蔗糖很快就会在培养基中完全降解成葡萄糖和果糖,这一过程一般需要 4 d 就可完成,这一结果在其他植物细胞培养中同样被观察到^[11]。从消耗曲线可以看出,葡萄糖浓度下降快于果糖,这说明梔子细胞将蔗糖转化为葡萄糖和果糖后,优先利用葡萄糖,并在第 10 天左右消耗殆尽,随后果糖的消耗加快,因为此时果糖成为培养基中唯一的碳源。

表 1 葡萄糖、蔗糖和混合使用对梔子悬浮细胞生长和多糖合成的影响

Table 1 Effects of glucose and sucrose on cell growth and polysaccharide synthesis in suspension culture of *Gardenia jasminoides* Eills

Carbon source	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Glucose(g/L)	10.0	30.0	50.0	0	0	0	14.415	22.5	22.5
Sucrose(g/L)	0	0	0	10.0	30.0	50.0	22.5	14.415	22.5
Cell FW(g/L)	184.0	316.0	210.0	145.0	282.0	172.0	189.3	214.2	189.5
Polysaccharides(%)	1.50	1.87	2.44	1.62	2.02	2.78	2.64	2.81	3.29

2.5 氮源对悬浮细胞的生长和多糖合成的影响

我们选择了 MS 和 B5 培养基中氨态氮和硝态氮作为指标,设计的实验及结果如表 2。氮源的量对悬浮细胞的生长有明显的影响,氮源浓度在 40 ~ 50mmol/L 范围内悬浮细胞生长最好。梔子悬浮细胞可以吸收氨态氮,也可以吸收硝态氮,对二者没有特别的选择性。氮源浓度对多糖的合成的影响比较明显,当浓度过低时,多糖的合成受到抑制。

2.6 激素对梔子悬浮细胞的生长和多糖合成的影响

对单一激素的研究表明,细胞分裂素 BA 和生

长素对梔子悬浮细胞的生长和多糖的合成都是必须的,两者配合使用是最佳条件。然而 BA 与 IAA 等生长素的浓度比例研究是十分复杂的问题,而且需要大量实验和筛选工作。因此,本实验采用二因素二次回归方程^[12]分析了细胞分裂素 BA 分别同生长素 IAA、NAA、2,4-D 配合使用对梔子悬浮细胞生长和多糖合成的影响。编码公式为 $x_1 = 2(\ln[BA] - \ln 2.0)/(\ln 2.0 - \ln 0.1) + 1$; $x_2 = 2(\ln[\text{生长素}] - \ln 2.0)/(\ln 2.0 - \ln 0.1) + 1$ 。

表 2 氮源对梔子悬浮细胞生长和多糖合成的影响

Table 2 Effects of nitrogen source on cell growth and polysaccharide synthesis in suspension culture of *Gardenia jasminoides* Eills

Nitrogen source	A	B	C	D	E	F	G	H	I
NH ₄ ⁺ (mmol/L)	35	0	20.62	20.62	1.28	21.3	11.3	11.3	11.3
NO ₃ ⁻ (mmol/L)	0	39.41	25	39.41	32.2	32.2	19.54	41.97	32.2
Cell FW(g/L)	138	148	154	128	156	126	132	128	156
Polysaccharides(%)	2.02	2.07	2.17	2.19	2.05	2.14	2.17	2.14	2.14

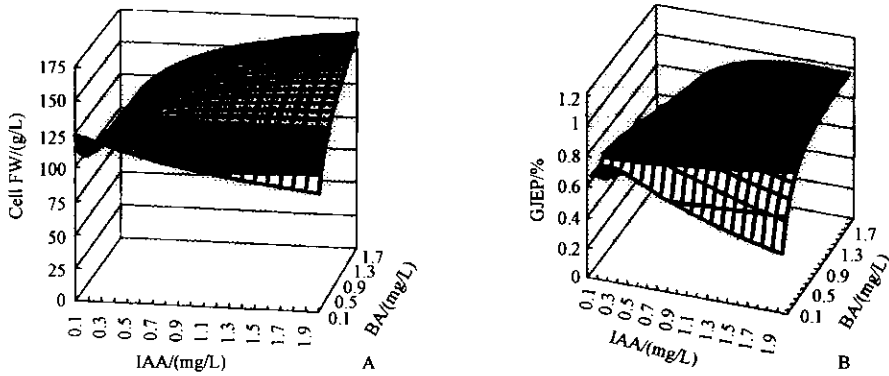


图 6 BA 和 IAA 对栀子悬浮细胞和多糖合成的影响

Fig.6 Effect of BA and IAA on cell growth and polysaccharide content in suspension culture of *Gardenia jasminoides* Eills

BA 和 IAA 配合使用得到悬浮细胞生长量的回归方程为: $\ln y = 0.025x_1^2 - 0.085x_2^2 + 0.249x_1x_2 - 0.06x_1 + 0.081x_2 + 4.762$, 此方程经 F 检验为极显著。生长量最大值 $Y_{\max} = 163.36$ (BA2.0, IAA2.0), 最小值 $Y_{\min} = 85.13$ (BA2.0, IAA0.1), 如图 6A 所示。细胞中多糖含量 (%) 的回归方程为 $\ln y = -0.242x_1^2 - 0.346x_2^2 + 0.445x_1x_2 - 0.0009x_1 + 0.182x_2 - 0.079$, 此方程经 F 检验为显著。多糖含量的最大值 $Y_{\max} = 1.007\%$ (BA0.8, IAA1.0), 最小值 $Y_{\min} = 0.275\%$ (BA2.0, IAA0.1), 如图 6B。

BA 和 NAA 联用时, 栀子细胞无论在生长量上还是在多糖含量上都比 BA 与 IAA 的配合使用的结果好。BA 和 2,4-D 配合使用使栀子悬浮细胞生长量和多糖含量有较大程度的提高。

3 讨论

植物初生代谢产物的合成特点与次生代谢产物有很大的不同, 主要表现在合成的时间上, 如栀子多糖主要合成于细胞培养的对数期, 即 5 ~ 10d, 而后多糖收获量逐渐下降, 原因可能是: 1) 培养基中的碳源一般在第 10d 左右消耗殆尽, 使悬浮细胞合成多糖时无以为继; 2) 多糖作为生物体内一种能源储备物质, 在逆境下会分解以解能量燃眉之需; 3) 初生代谢产物往往是次生代谢产物的前体, 在细胞的分化期, 次生代谢产物的积累需要初生代谢产物的物质支持^[13]。栀子中的黄色素主要产生于细胞培养的第 15 天左右^[11], 为了延迟黄色素的产生和尽可能多地获得多糖产率, 我们采用 BA 和 2,4-D 等抑制黄色素生成的激素组合, 利用初生多糖和次生黄色素产生时间的不同使多糖的提取纯化更容易。经过检测发现悬浮细胞培养中获得的多糖其结构和功能

与从栀子果实中提取获得的相同, 该内容我们将另文发表。

实验中我们还采用了二元二次回归法设计分析了不同激素组合对栀子悬浮细胞生长和多糖合成的影响。所获 2 个方程都显著, 所有方程中的误差均非来自系统误差, 表现出一定的普遍性。该设计可通过较少的实验次数获得大量的实验信息, 并容易上升为理论高度, 得到有规律性的方程, 解决了细胞培养中多因子对某些指标的影响问题, 因此具有比较实际的应用价值。

REFERENCES (参考文献)

- [1] TIAN G Y (田庚元), FENG Y C (冯宇澄), LIN Y (林颖). The research progress of plant polysaccharides. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine* (中国中药杂志), 1995, 20(7): 441 ~ 444
- [2] LI Z X (李志孝), MENG Y F (孟延发), MENG X Q (孟香琴) et al. Isolation and characterization of polysaccharides from *Gardenia jasminoides* Eills. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 1993, 25(3): 301 ~ 305
- [3] LAI Ching-Long, YANG Jui-Sen. Production of crocin by fruit callus of *Gardenia jasminoides* Eills. *Food Biotechnology New York*, 1999, 13(3): 209 ~ 216
- [4] ZHANG Y H (张以恒), ZHONG J J (钟建江), YU J T (俞俊棠). Mass culture of *Panax quinquefolium* cells to produce ginseng saponin and polysaccharides. *Journal of Chinese East University of Science and Technology* (华东理工大学学报), 1997, 23(3): 310 ~ 313
- [5] Zhong J J, Wang D J. Improvement of cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharides in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Cu^{2+} effects. *Journal Biotechnol*, 1996, 46: 69 ~ 72
- [6] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, 28: 350 ~ 356
- [7] ZHANG Z L (张志良). *Experiment Guide of Plant Physiology*. 2nd ed, Beijing: Higher Education Press, 1991, pp. 160 ~ 162
- [8] Shanghai plant physiology institute of scientific academy of China,

- Modern Experiment Guide of Plant Physiology, Beijing: Science Press, 1999, pp. 127 ~ 128
- [9] ZHONG Q P(钟青萍), YANG N S(杨宁生), CHEN M H(陈米慧). Study on Effects of Callus Growth and Yellow Pigment Formation of *Gardenia jasminoides* Eills, *Journal of Nanchang University (Natural Science)*(南昌大学学报(理科版)), 1994, 18(3): 258 ~ 262
- [10] ZHONG J J(钟建江), Masashi Yoshida, Toshiomi Yoshida. Effects of biological factors on cell growth and anthocyanin formation by cell suspension cultures of *Perilla frutescens*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1995, 11(2): 153 ~ 156
- [11] XING J M(邢建民), ZHAO D X(赵德修), LI M Y(李茂寅) *et al.* Effect of carbon and nitrogen sources on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *Saussures medusa*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1999, 15(2): 230 ~ 234
- [12] LUAN J(栾军). Modern Experiment Design Optimization, Shanghai Communication University Press, 1995, 3
- [13] ZHANG Y H, ZHONG J J, YU J T. Effect of osmotic pressure on cell growth and ginseng saponin and polysaccharides production by suspension cultures of *Panax notoginseng*. *Biotechnol Lett*, 1995, 11: 1347 ~ 1350

Effects of Medium and Culture Conditions on Polysaccharide Synthesis by Suspension Cell Culture of *Gardenia jasminoides* Eills

WANG Guan-Lin^{1,2*} SHI Ruo-Fu² FANG Hong-Jun¹

¹ (Biology Science College of Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

² (Chemical Engineering College of Dalian University of Technology, Dalian 116022, China)

Abstract The effects of medium and culture condition on polysaccharide synthesis by suspension culture of *Gardenia jasminoides* Eills were studied. The results show that B5 was the optimum medium, 5 ~ 10 days was suitable for subculture periods, and an inoculum of 80g/L wet cell was better to cell growth and polysaccharide accumulation. For carbon source, it was better to use glucose than sucrose on cell growth, but due to the higher price of glucose, 45g/L compound carbon source combined sucrose with glucose (1:1) was the optimum. The effect of different kinds of nitrogen source on cell growth and polysaccharide synthesis was not so big, and 40 ~ 50mmol/L nitrogen was optimum, lower concentration of nitrogen source could inhibit the synthesis of polysaccharides. In addition, by controlling the harvest time of the polysaccharide in the suspension culture, the accumulation of yellow pigment could be prevented, which is easier to the polysaccharide purification.

Key words *Gardenia jasminoides* Eills, suspension culture, polysaccharide synthesis

Received: June 25, 2001

This work was supported by Grant from Education Department of Liaoning Province(97-1207).

* Corresponding author. Tel: 86-411-4258779; Fax: 86-411-4212515; E-mail: guanlinwang@163.com

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