

文章编号:1673-1689(2005)03-0027-03

银杏细胞的悬浮培养研究

王德强, 王晓玲

(安徽工业大学 化学工程学院, 安徽 马鞍山 243002)

摘要: 研究了银杏在 SH、MS、B5、N6 等培养基中的愈伤组织诱导培养, 考察了在 MS 培养基中悬浮培养下溶解氧含量、激素浓度等对银杏黄酮苷生产的影响。结果表明: 银杏在 SH、MS、B5、N6 等 4 种培养基中均可以诱导出愈伤组织, 其中 N6、MS 培养基中诱导率最高, 愈伤组织生长最好。悬浮培养结果表明, 溶解氧、激素浓度对黄酮苷影响最大。

关键词: 黄酮苷; 银杏; 悬浮培养

中图分类号: Q 945.12

文献标识码: A

Callus Suspension Culture of *Ginkgo biloba* L

WANG De-qiang, WANG Xiao-ling

(School of Chemical Engineering, University of Technology of Anhui, Maanshan 243002, China)

Abstract: Callus was induced from young leaves of *Ginkgo biloba* L. in medium of SH、MS、B5、N6. The effect of NAA and O₂ concentration on cell growth and synthesis of flavonol glycoside in suspension culture of MS were studied. The results show the following results: The callus could be induced in the medium of SH、MS、B5、N6. In the MS and N6 medium, the callus grew better than the others, and the ratio of callus induction was also higher than the others. In suspension culture, the concentrations of NAA and O₂ were the most affecting factors to the cell growth and flavonol glycoside synthesis.

Key words: flavonol glycoside; *Ginkgo biloba* L; suspension culture

由于银杏提取物中的黄酮和内酯两类生理活性物质, 在防治老年性心脑血管疾病、保护中枢神经系统、改善脑营养、抗衰老、增强肌体免疫功能、增强脑部动脉血管的动力等有特殊功效, 使得人们对银杏提取物的需求量日益增加。采用组织培养和细胞培养法进行银杏培养研究具有重要意义, 对生产银杏黄酮苷也具有着潜在的重大意义^[1,2]。作者对银杏幼叶的愈伤组织诱导的培养基的类型、激素种类、培养条件及其他相关因素进行了研究, 同时

对细胞悬浮培养进行了研究, 考察了溶解氧对悬浮培养的影响。

1 材料与方法

1.1 培养基

愈伤组织诱导的固体培养基分别采用 SH、MS、B5、N6 等 4 种培养基, 为研究激素种类和浓度对愈伤组织的影响, 采用上述培养基加入不同激素及浓度组合的优化培养基, 液体悬浮培养基采用

收稿日期: 2004-09-30; 修回日期: 2004-10-22.

基金项目: 安徽省高等学校青年教师科研资助计划(2003jq133)资助课题。

作者简介: 王德强(1968-), 男, 安徽繁昌人, 讲师, 工学硕士。

MS培养基^[3-5]。

1.2 培养材料

雌性银杏的幼叶。

1.3 外植体消毒方法

将刚采来的银杏幼叶用蒸馏水冲洗数次,用滤纸吸干,放入体积分数为75%的乙醇溶液中消毒25~28 s,立即用无菌水冲洗3次,然后放入质量分数0.15%的升汞溶液中灭菌10~12 min,转移到超净工作台上,无菌水冲洗干净,在无菌滤纸上切成0.5 cm²左右的小块,接种在准备好的培养基上。每瓶接种10块,每d光照10~12 h,温度控制在26±1℃,定期记录培养物的颜色、质地、生长量等。

1.4 悬浮培养

培养方法^[6]:挑选生命力强、质地疏松、黄绿泛白的愈伤组织,定量转移到液体培养基中,在摇床上振荡培养7 d左右,以获得单细胞或小块愈伤组织悬浮液。选出比较均一、生长势较旺的细胞株系建立液体培养体系。及时转入摇瓶继代培养,更换新鲜液体培养液。培养温度为27±2℃,每天光照14 h,研究不同溶解氧、激素浓度等对黄酮苷生长的影响^[6]。

萘乙酸(NAA)质量浓度对黄酮苷生产的影响实验:在6组1 L反应器中加入200 mL的MS培养基,接种愈伤组织后分散悬浮培养。

供氧情况对黄酮苷生产的影响实验:在4组容量为1 L的培养瓶中分别采用了不同的装液量,培养基采用MS培养液,外加0.5 mg/L的萘乙酸(NAA),0.1 mg/L的激动素(KT)和0.1 mg/L的吲哚-3-乙酸(IAA),温度、光照条件不变。反应液中黄酮苷测定时,取液量均补液到初始量。所有实验的进气均采用间断供气,气量为反应器总容积的倍数。

1.5 黄酮苷测定方法

有效成分的提取:称取1.2 g干重培养物,用干净滤纸包扎,置于盛有体积分数75%乙醇溶液的三颈烧瓶中,在(62±2)℃下,3次回流提取8 h,合并滤液,减压蒸馏,5 mL质量分数18%的盐酸水解回流1 h,定容,过滤,测定黄酮苷质量浓度^[7]。

定量步骤:取一定量的样品置于25 mL容量瓶中,用一定体积分数的乙醇稀释;加入0.7 mL质量分数5%NaNO₂溶液摇匀,放置5 min;加入7 mL质量分数10%Al(NO₃)₃溶液摇匀,放置6 min;加入5 mL 1 mol/L的NaOH溶液混匀,定容,放置0~10 min;以芦丁为标准品在波长510 nm处测定其吸光度。该方法的测定时间较长,一次测定约20

min。

2 结果与讨论

2.1 培养基对银杏愈伤组织生长的影响

银杏幼叶在KT质量浓度分别为0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/L的MS、B5、SH、N6等4种固体培养基中(NAA:0.5 mg/L, IAA:0.5 mg/L)培养14 d,结果见表1。

表1 银杏愈伤组织在MS、B5、SH、N6中的培养结果

Tab.1 Callus of *Ginkgo biloba* L cultured in MS、B5、SH、N6

KT质量浓度/(mg/L)	培养基			
	MS	B5	SH	N6
0.1	愈伤组织 浅黄绿色	愈伤组织 浅黄绿色	愈伤组织 浅黄绿色	愈伤组织 浅黄绿色
0.2	愈伤组织 浅黄绿色	看不到绿色,但无褐变	愈伤组织 浅黄绿色	愈伤组织 浅黄绿色
0.3	少量已褐变	部分已褐变	部分已褐变	愈伤组织 浅黄绿色
0.4	部分已褐变	部分已褐变	部分已褐变	部分已褐变

从表中的结果可看出:MS、B5、SH、N6等4种培养基都适合银杏形成层细胞的生长,但是随着KT质量浓度的增加,愈伤组织的褐化倾向加重。在KT质量浓度为0.3 mg/L时,各种培养基中的愈伤组织在10 d后相继开始发生褐化,而对于0.4 mg/L的KT实验组,愈伤组织均发生褐化。实验表明,KT质量浓度对于银杏的愈伤组织诱导影响较大,KT质量浓度越大,越容易发生褐化;而MS、B5、SH、N6培养基对愈伤组织的诱导和生长并无明显影响。表明了无论是无机盐浓度和种类差别(MS无机盐浓度高于其它培养基)还是其它营养物的差别(SH培养基中肌醇浓度高于其它培养基)对于银杏愈伤组织诱导的影响并不大。

2.2 NAA质量浓度对银杏愈伤组织生长的影响

同时进行了银杏在NAA质量浓度为1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L的MS固体培养基中的实验,KT质量浓度均为0.1 mg/L,经过30 d的愈伤组织诱导培养,结果见表2。

以上结果表明,添加不同质量浓度的NAA均可以诱导银杏愈伤组织的发生,NAA质量浓度不同对愈伤组织的生长有一定的影响。当NAA质量浓度由1.0 mg/L增加到2.0 mg/L后,愈伤组织生长速度增大,愈伤组织细胞由较紧密变得更加疏松,当质量浓度达到3.0 mg/L、4.0 mg/L时愈伤组织也变得较容易褐化,同时愈伤组织的诱导率表

现出降低趋势,可能是高质量浓度下外植体代谢活动较高,不利于愈伤组织的生长同时还造成褐化速度更快。

表2 银杏在不同NAA质量浓度的MS固体培养基中的培养结果

Tab. 2 Callus of *Ginkgo biloba* L cultured in deferent concentrations of NAA of MS

NAA 质量浓度/ (mg/L)	愈伤组织状态	显微镜检查细胞状态	愈伤组织生成率/%
1.0	愈伤组织浅绿色	细胞小,排列紧密	80
2.0	愈伤组织大,浅绿色	细胞较大疏松	80
3.0	愈伤组织大,浅绿色,少量已褐化	细胞较大疏松	75
4.0	愈伤组织浅黄白色,褐化较早	细胞较大疏松	55

2.3 愈伤组织和细胞的悬浮培养

2.3.1 悬浮培养下NAA质量浓度对黄酮苷产量的影响 在6组1L反应器中加入200mL的MS培养基,液体培养基中NAA质量浓度分别为0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L; KT质量浓度为0.1 mg/L, 另加入0.1 mg/L的植物激素吲哚-3-乙酸(IAA)。每罐接入充分分散培养后收集的愈伤组织细胞2g, 温度为25℃, 光照强度2000 lx, 光照时间12 h, 培养过程中通入无菌空气培养, 培养1周后测定各组培养液中的黄酮苷质量浓度, 结果见表3。

表3 NAA质量浓度对愈伤组织黄酮苷生产的影响

Tab. 3 The effect of NAA on flavonol glycoside production

NAA 质量浓度/ (mg/L)	黄酮苷质量浓度/ (mg/L)	(黄酮苷产量/ 生物量)/ (mg/g)
0	未检测到	生物量无明显增长
0.5	7.3	7.9
1.0	4.4	4.7
2.0	2.0	2.1
3.0	1.8	1.9
4.0	1.9	2.0
5.0	1.9	1.9

试验表明, NAA质量浓度变化对于黄酮苷的形成影响很明显, 从1周后测定出的培养液中黄酮苷的质量浓度分析看, 在NAA质量浓度为0.5 mg/L的情况下, 培养1周后黄酮苷产量最高为7.3 mg/L; 而NAA为1.0 mg/L时黄酮苷为4.4 mg/L; 而当NAA质量浓度达到2 mg/L以上时, 黄酮苷

产量急剧下降到1.9 mg/L以下, 表明高质量浓度NAA对于黄酮苷生产不利。同时从单位生物量(鲜重)产黄酮苷的分析同样表明低质量浓度的NAA有利于黄酮苷的增加; 如当NAA为0.5 mg/L时, 每克愈伤组织产黄酮苷的量为7.9 mg, 而当NAA质量浓度增加到2.0 mg/L以上时, 每克银杏愈伤组织的黄酮苷产量则下降到2.0 mg以下。因此在银杏细胞的悬浮培养时低质量浓度的NAA是有利的。

2.3.2 悬浮培养下气液比对黄酮苷含量的影响

由于培养液中的溶解氧的含量对于愈伤组织的增加和黄酮苷的产量影响较大, 本试验在4组容量为1L的培养瓶中分别采用了不同的气液比, 培养基采用MS培养液, 外加0.5 mg/L的NAA, 0.1 mg/L的KT和0.1 mg/L的IAA, 温度、光照条件不变。装液量体积分数分别为转动鼓容积的1/10、1/20、1/40、1/100, 培养一周后测定培养液中黄酮苷质量浓度以及黄酮苷产量/生物量(鲜重)以及培养液的密度, 结果见表4。

表4 供氧情况对黄酮苷生产的影响

Tab. 4 The effect of oxygen supply on flavonol glycoside production

装液量 体积分数	黄酮苷质量 浓度/(mg/L)	(黄酮苷产量/ 生物量)/ (mg/g)	培养液 密度/ (g/mL)
1/100	4.4	8.0	1.011
1/40	2.9	3.7	1.026
1/20	2.4	1.6	1.062
1/10	1.2	1.4	1.076

结果表明, 供氧量体积对黄酮苷的影响较明显, 当装液量分数为1/10时, 每克银杏愈伤组织细胞(鲜重)产黄酮苷为1.4 mg, 而装液量占转鼓容积分数为1/40时, 黄酮苷产量增长明显, 达到3.7 mg/g, 而装液量占转鼓容积分数为1/100时, 黄酮苷的增加更明显, 达到8.0 mg/g。试验表明: 在液体悬浮培养条件下, 氧气含量对于愈伤组织细胞生产黄酮苷影响非常显著。通过对培养液的密度分析表明, 装液量分数越小, 培养液的密度降低越大, 在装液量体积分数为1/100时, 1周后培养液的密度下降到1.011 mg/L, 而装液量体积分数为1/10时, 密度下降最少, 1周后为1.076 mg/L。随着装液量体积分数的减小, 愈伤组织细胞呼吸作用增大, 造成糖分消耗速率增大, 培养液密度降低, 黄酮苷的产量增加。

能比十二烷基硫酸钠稍好一些.这说明,由于物质的多样性,分子结构的差异,表面活性剂乳化体系的性能是相对的.

表2 不同取代度辛烯基琥珀酸淀粉酯对不同物质的乳化力

Tab.2 Emulsibility for different substance of SSOS products

取代度	食用油	甲苯	液体石蜡
0.007 0	270	3	98
0.011 0	340	8	140
0.015 7	570	10	198
对照物 (十二烷基硫酸钠)	120	145	40

3 结 论

考察了辛烯基琥珀酸淀粉酯的一些表面性质,结合表面活性剂及胶体化学理论对实验结果进行了研究,实验证明:

1)随着取代度的增大,辛烯基琥珀酸淀粉酯样品的乳化性增强,但乳化对象具有明显的针对性,乳化性能的优劣体系具有一定适用条件.

2)不同取代度的辛烯基琥珀酸淀粉酯样品在常温下与 SDS、CTAB 进行复配,与 SDS 具有正协同作用,与 CTAB 具有负协同作用.

参考文献:

- [1] 张力田. 变性淀粉[M]. 广州:华南理工大学出版社,1992.
- [2] 赵国玺. 表面活性剂的物理化学[M]. 北京:北京大学出版社,1984.
- [3] 李坤兰. 烷基多苷与其它表面活性剂的泡沫性能研究[D]. 广州:华南理工大学,2001.
- [4] 郑茂强. 辛烯基琥珀酸淀粉酯的制备工艺研究[J]. 食品科技,2002,(8):28-29.
- [5] 胡飞. 二步法合成烷基糖苷表面活性剂产品的应用性能研究[J]. 现代化工,2000,(1):34-36.
- [6] Shinji Tamaki. Structural change of maize starch granules by ball-mill treatment[J]. Starch,1988,50:342-348.

(责任编辑:朱明)

(上接第29页)

3 结 论

银杏对于实验中的培养基具有较强的适应性,均可以诱导出愈伤组织,但高质量浓度的生长激素和细胞分裂类激素对于愈伤组合培养容易造成褐

化现象,效果较差.采用MS液体培养基悬浮培养愈伤组织细胞时,高质量浓度的NAA对于黄酮苷生产不利.溶解氧含量也是重要影响因素,提高溶解氧浓度对于悬浮培养生产黄酮苷具有重要意义.

参考文献:

- [1] 姜建萍. 银杏叶的现代药理研究概况[J]. 中国医药科技,2000,7(4):268-269.
- [2] 张可炜,徐誉泰,张举仁,等. 银杏叶和柘树提取物的抗氧化作用[J]. 山东大学学报(自然科学版),2000,(4):469-472.
- [3] 江静,尚富德,李锁平. 银杏愈伤组织的诱导与激素优化组合研究[J]. 河南大学学报(自然科学版),2000,30(3):51.
- [4] 房建国,阙国宁. 银杏愈伤组织生长和黄酮类化合物积累的关系[J]. 林业科学研究,1998,11(2):124-129.
- [5] 陈学森,邓秀新,章文才. 银杏组织培养与黄酮生产的研究[J]. 中国农业科学,1997,30(6):55-60.
- [6] 罗紫娟. 银杏茎段的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1985,3(1):35-36.

(责任编辑:朱明)