

野葛细胞固定化培养及异黄酮化合物的生产*

方从兵 宛晓春 苏二正 江昌俊 李贺勤

(安徽农业大学教育部、农业部茶叶生物化学与生物技术重点实验室,合肥,230036)

摘要 以海藻酸钠固定化处理的野葛细胞为试材,研究了固定化细胞培养周期中细胞生长、糖源消耗和异黄酮含量的变化。结果表明,野葛细胞生长曲线呈“S”形,可分为3个主要阶段,即迟滞期(0~8 d)、指数生长期(8~14 d)和稳定增长期(14~18 d)。在培养的第18天达到最大生物量(48.56 g(FW) L⁻¹),约为初始接种量的3.04倍。同时,糖源随细胞生长量的增加而不断消耗。在野葛细胞培养周期中,固定化细胞胞内黄酮和培养液黄酮逐渐累积,培养体系中的总黄酮含量与细胞生长量呈同步增长的关系,第16天,总黄酮含量约为初始培养时的17.28倍。试验结果为采用野葛细胞固定化培养的方法进行异黄酮化合物的生产提供了实验依据。

关键词 异黄酮,野葛,细胞固定化,海藻酸钠

自 Brodelius^[1]首次报道高等植物细胞的固定化研究以来,研究人员经过多年研究发现,与悬浮培养相比,细胞固定化培养具有很多优点,如提高次生物质的合成和积累,能长时间保持细胞活力,可以反复使用,抗剪切能力强,耐受有毒前体的浓度高,后处理难度小^[2],以及促进或改变产物的释放^[3]等,从而有助于提高次生产物的产量。迄今,通过植物细胞固定化培养生产次生代谢产物的研究已取得了重大进展^[4]。用于植物细胞固定化的方法有凝胶包埋、吸附、泡沫固定及应用膜反应器等;其中,凝胶包埋法因固定条件温和、方法简单而得以广泛应用^[4,5]。

野葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi.] 是原产于我国的一种重要的野生药用植物资源,其主要生物活性成分为葛根素(puerarin)、大豆苷(daidzin)、大豆苷元(daidzein)和3'-甲氧基葛根素(3'-methoxy-puerarin)等异黄酮类化合物。近年来,大量临床实验证实,异黄酮类化合物具有广泛的药理功能^[6~9]。葛根或葛根提取物据报道已开始在商业上被用作食品添加剂^[10]。随着对野生葛根的不断开发利用以及市场需求的不断加大,葛根黄酮的供求矛盾日趋明显,人们开始考虑采用野葛植物组织离体培养方法生产异黄酮类化合物^[11~13]。本试验尝试采用凝胶包埋法固定化培养野葛细胞,研究固定化细胞的生长、糖源消耗和异黄酮生产的动力学特性,以探讨野葛细胞固定化方法生产异黄酮的潜力与应用前景。

第一作者:博士研究生,副教授(宛晓春为通讯作者)。

* 国家科技部科技成果转化项目[国科发农科字(2002)208号]和安徽省科技厅“十五”重大科技专项(01803025)

收稿日期:2005-12-05

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试野葛取自安徽舒城,种植于安徽农业大学农

1.2 仪器与试剂

Waters600型高效液相色谱仪,Hyersil ODS C₁₈柱(250 mm×4.6 mm i. d., 5 μm, Supelco 公司),2847 双波长紫外检测器,Millinum³² 色谱工作站,SGE 25 μL 微量进样针(Australia),756MC 紫外分光光度计(上海),控温摇床(ZHWY211B, 上海),T6328B 型万分之一电子天平(上海)。

CCPU(吡效隆)、2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、NAA(α-萘乙酸)、KT(激动素)购于中国药品生物制品检定所,海藻酸钠购于中国医药集团上海化学试剂公司,壳聚糖购于 Sigma 公司(脱乙酰度85%),乙腈和乙酸为色谱纯(TEDIA 公司),葛根素购于 Sigma 公司,大豆苷、大豆苷元和3'-甲氧基葛根素为供含量测定用的化学对照品;水为去离子石英双蒸蒸馏0.45 μm 膜过滤水,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 野葛细胞悬浮系的建立^[14]

以野葛新梢为外植体,愈伤组织诱导培养基为 MS+ 0.5 mg/L CCPU,愈伤组织继代培养、细胞悬浮系的建立与继代培养均选择 B₅+ 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA+ 0.5 mg/L KT 培养基(pH 5.8)。

1.3.2 固定化细胞珠粒的制备

取处于指数生长期(第5天)的野葛培养细胞,加入 B₅ 培养基配制的 20g/L 海藻酸钠溶液,在摇床上

振摇 30 min 混匀;用注射器将混合液滴入 10 g/L CaCl_2 溶液中,振摇 30 min;用 7.5 g/L 的生理盐水清洗 2 次后,转入 2 g/L 壳聚糖溶液中,振摇 30 min;用 7.5 g/L 的生理盐水清洗 2 次, B_5 培养基清洗 3 次。制得的微囊球形度、均一性较好,粒径为 2.8~3.0 mm。

1.3.3 固定化野葛细胞的培养

取 200 粒固定化细胞微囊[初始接种量约 0.8 g (FW)],接种于装有 50 mL 新鲜 B_5 培养基的 250 mL 摇瓶中进行振荡培养,培养条件: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 闭光, 110 r/min。每 2 d 取样 1 次,测定相应指标。

1.3.4 细胞生长曲线的测定

采集的细胞样品经蒸馏水冲洗干净,测定细胞鲜重。以每瓶细胞培养物的鲜重表示培养过程中的生长变化,每 2 d 测定 1 次,每次收集 3 瓶,求平均值,共观察 20 d,绘制细胞生长曲线。细胞生长过程的参数处理参照应佩青等^[15]的方法,每天测得的细胞鲜重表示为 X ,生物质量浓度 $C_x = X/V$,其中, V 为培养物总体积;细胞的生长速率可近似表示为 $dC_x/dt \approx \Delta C_x/\Delta t$ 。

1.3.5 培养液中残糖含量的测定

采用硫酸苯酚法测定培养液中糖含量^[16]。

1.3.6 异黄酮含量的测定

1.3.6.1 胞外黄酮含量的测定

固定化培养物通过抽滤方法进行样品收集,滤液浓缩至干,溶剂萃取,并作适当稀释,采用紫外分光光度法测定样品溶液异黄酮含量,3 次重复。测定条件:以葛根素为对照品并制作标准曲线,线性范围 0~9 $\mu\text{g/mL}$,测定波长 254 nm。

1.3.6.2 胞内黄酮含量的测定

(1) 异黄酮 4 标样标准曲线

精密称取葛根素对照品 25 mg,加 30% 甲醇定容至 100 mL,配制成浓度为 0.25 mg/mL 的对照品溶液,再分别将其稀释成 0.0125、0.025、0.05、0.1、0.15、0.2 和 0.25 mg/mL 的葛根素标准溶液。同法配置 0.005、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.1 mg/mL 的大豆苷、大豆苷元和 3'-甲氧基葛根素标准溶液。采用 HPLC 法进行进样分析,色谱条件:流动相为乙腈(A 相)和 0.5% 乙酸(B 相),梯度洗脱,0~40 min,0~30% A,40~60 min,30%~40% A,柱温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,流速 1 mL/min,进样量 10 μL ,检测波长 250 nm。以不同异黄酮组分标准溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

(2) 样品溶液的制备及其异黄酮含量的测定

采用抽滤方法收集固定化细胞珠粒,蒸馏水冲洗干净并经研磨破碎,加入 70% 乙醇,超声振荡处理 60 min,再静置浸提 24 h 以上,浸提液经 0.45 μm 滤膜过滤,采用 HPLC 法测定细胞样品中异黄酮含量,色谱条件同(1)。

1.3.6.3 固定化细胞培养体系中异黄酮总量的计算

$$\text{异黄酮总量}(\text{mg}) = \text{培养细胞异黄酮含量}(\text{mg/g}) \times \text{细胞鲜重}(\text{g}) + \text{细胞培养液异黄酮含量}(\text{mg/L}) \times \text{培养液体积}(\text{L})$$

2 结果与分析

2.1 野葛固定化培养细胞的生长特性

取固定化细胞微囊进行悬浮培养,定期收集细胞珠粒,测定野葛固定化细胞鲜重的变化情况,并绘制细胞生长曲线。由图 1 可知,野葛细胞生长曲线呈“S”形,可分为 3 个主要阶段,即迟滞期(0~8 d)、指数生长期(8~14 d)和稳定增长期(14~18 d)。在培养的第 18 天达到了最大生物量(48.56 g(FW)/L),约为初始接种量的 3.035 倍;此后开始下降。在野葛固定化细胞培养过程中,至培养的第 14 d,细胞培养液开始发生轻微褐化现象,此后褐化情况逐渐加重。根据野葛细胞生长曲线的测定结果及细胞培养过程中的培养反应情况,确定野葛固定化细胞培养的最佳继代周期为 14~16 d。

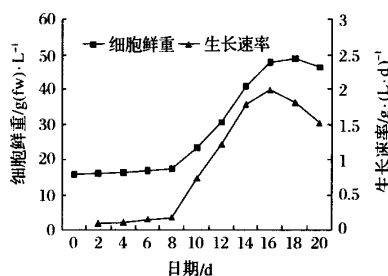


图 1 野葛固定化培养细胞的生长进程及生长速率变化情况

2.2 野葛固定化细胞培养液中异黄酮含量及蔗糖含量变化情况

以葛根素标准溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为 $y = 0.0617x + 0.0062$, x 为葛根素标准溶液浓度($\mu\text{g/mL}$), y 为样品溶液吸光度(OD 值), $R^2 = 0.9967$ 。取上述定期收集的细胞培养物,按照方法 1.3.6.1 制备样品溶液并测定样品中异黄酮含量的变化情况。由图 2 可知,野葛固定化细胞在培养后 2 d 即开始向培养液中分泌

异黄酮物质,并随着细胞培养进程培养液中异黄酮含量逐渐升高,并于培养后 16 d 达到最高值(52.56 mg/L),此后略有下降。结合图 1 和图 2 分析可知,在野葛细胞培养周期中,野葛细胞培养液中异黄酮化合物的积累与细胞生长大体呈现相同的生长趋势。

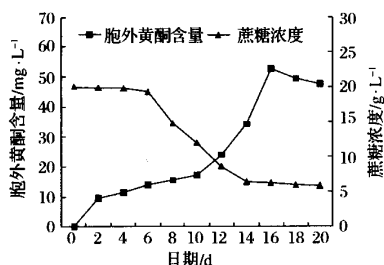


图2 野葛固定化细胞培养体系中胞外异黄酮含量及蔗糖含量的变化情况

以葡萄糖标准溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为 $y = 0.0139x + 0.1143$, x 为葡萄糖标准溶液浓度($\mu\text{g/mL}$), y 为样

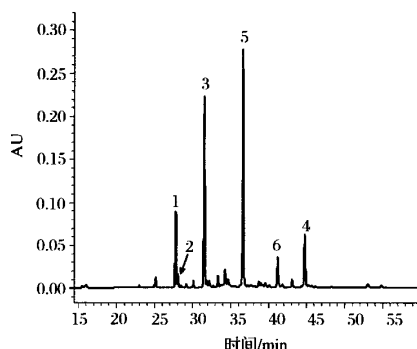
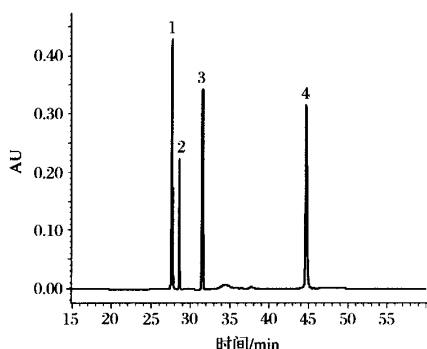


图3 异黄酮标准品(左)及野葛固定化细胞异黄酮组分(右)的 HPLC 分析图谱

1. 葛根素;2. 3'-甲氧基葛根素;3. 大豆苷;4. 大豆苷元;5. 染料木苷;6. 鸡豆黄素

以不同异黄酮组分标准溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并计算回归方程,如表 1 所示。根据各色谱峰面积以及对照品的回归方程,计算各供试样品中不同异黄酮组分的含量。其中,3'-甲氧基葛根素因样品中含量较少,故不作定量分析;染料木甙和鸡豆黄素尚无标准品,未能制作标准曲线,但由于它们与葛根素具有相似的 UV 吸收光谱,故以它们与葛根素的峰面积比值进行定量分析。

结果表明,单位鲜重细胞中不同异黄酮组分含量均随培养时间的延长而逐步提高(如表 2)。其中,主要异黄酮组分大豆苷和染料木苷于培养的第 16 天达到最大值,分别为初始培养细胞的 5.72 和 4.60 倍。

品溶液吸光度(OD 值), $R^2 = 0.9951$ 。按方法 1.3.5 制备样品溶液,测定培养液中蔗糖含量的变化情况(如图 2)。在野葛细胞培养周期中,细胞生长曲线的迟滞期(0~8 d)由于细胞生长量增长有限,对糖源的消耗很少;而在细胞指数生长期(8~14 d),细胞培养液中蔗糖含量不断下降,反映了细胞生长对糖源的大量消耗。

2.3 野葛固定化培养细胞中异黄酮含量

按照对照品和供试品溶液的制备和检测方法制备样品溶液,并对 4 种对照品和不同生长时期的野葛固定化细胞样品的 HPLC 图谱进行了检测,见图 3。其中,采用液-质联用法(HPLC/ESI-MS)对异黄酮组分 5 和 6 作定性分析,并将其分别鉴定为染料木甙和鸡豆黄素^[17]。由图 3 可知,在野葛固定化培养细胞的异黄酮组成中,大豆甙和染料木苷为主要组分,葛根素、大豆苷元和鸡豆黄素次之,而 3'-甲氧基葛根素含量甚少。

随着固定化细胞生长量的不断增长以及胞内黄酮含量的提高及其向胞外的不断分泌,单位体积(L)细胞培养物异黄酮总量迅速提高,培养的第 16 天为初始培养细胞黄酮总量的 17.28 倍。此后,随着细胞培养体系中各类营养物质的逐渐消耗以及培养过程中代谢废弃物的积累,细胞培养条件逐步恶化;同时,由于细胞培养液中异黄酮的逐渐累积(如图 2)及其对代谢产物形成的反馈抑制作用,使得培养细胞中异黄酮的合成下降。结合图 1 和表 2 分析可知,在野葛细胞培养周期中,野葛固定化细胞培养体系中总黄酮的积累与细胞生长基本为同步增长的关系。

表 1 异黄酮四标样 HPLC 分析的回归方程

异黄酮种类	线性范围/mg. mL ⁻¹	回归方程	相关系数 (R ²)
葛根素	0.012 5~0.25	y = 4.026 9 × 10 ⁷ x + 136 920	0.997 7
大豆苷	0.005 ~ 0.1	y = 3.443 7 × 10 ⁷ x + 31 363	0.996 5
大豆苷元	0.005 ~ 0.1	y = 2.985 6 × 10 ⁷ x - 78 432	0.999 4
3'-甲氧基葛根素	0.005 ~ 0.1	y = 4.940 9 × 10 ⁷ x - 27 853	0.999 2

表 2 野葛固定化培养细胞中不同异黄酮组分含量和总黄酮含量的变化情况

取样时间 /d	异黄酮含量/mg. g ⁻¹ (FW)					总黄酮含量 ^{a)} /mg. L ⁻¹
	葛根素	大豆苷	染料木苷	鸡豆黄素	大豆苷元	
0	0.012	0.548	0.598	0.105	0.111	31.89
2	0.013	0.502	0.547	0.108	0.107	39.24
4	0.035	0.673	0.678	0.158	0.179	50.69
6	0.038	0.908	0.881	0.401	0.516	68.41
8	0.045	1.476	1.392	0.683	0.719	103.69
10	0.046	1.648	1.539	0.707	0.798	150.04
12	0.053	2.087	1.963	0.907	0.984	244.05
14	0.078	2.693	2.516	1.101	1.196	408.81
16	0.106	3.134	2.748	1.094	0.938	551.17
18	0.115	2.994	2.698	0.813	0.854	542.36
20	0.109	2.806	2.529	0.764	0.832	492.98

a) 总黄酮含量为培养细胞中异黄酮含量和培养液中异黄酮含量之和。

3 结论与讨论

采用海藻酸钠凝胶包埋法固定化培养野葛细胞,固定化细胞生长曲线呈“S”形,可分为3个主要阶段,即迟滞期(0~8 d)、指数生长期(8~14 d)和稳定增长期(14~18 d);在培养的18 d时达到最大生物量(48.56 g(FW)/L),约为初始接种量的3.04倍。在固定化细胞指数生长期,随着细胞的持续增长,培养液中糖源不断消耗。同时,在野葛细胞培养周期中,固定化细胞胞内黄酮和培养液黄酮逐渐累积,培养体系中的总黄酮含量与细胞生长量呈同步增长的关系,培养后的第16 d达到最大值,总黄酮含量约为初始培养时的17.28倍。因此,采用细胞固定化培养可以实现野葛异黄酮类化合物的生产。

刘慧丽^[14]等对野葛悬浮培养细胞的生长动态及异黄酮积累情况进行了研究。结果表明,野葛悬浮培养细胞生长曲线呈“S”形,接种后0~2 d为迟滞期,第2天后进入指数生长期,第7天细胞生物量达到最高峰,约为初始接种量的6.7倍;在细胞培养周期中,总黄酮含量与细胞生长量呈正相关,培养后的第7天达到最大值,约为初始接种时的4.37倍。通过野葛细胞固定化培养与悬浮培养的比较可以发现,固定化培养具有较长的迟滞期,细胞培养周期也大大延长,单位时间内固定化细胞生长量低于悬浮培养细胞。其可能的原因是,在细胞固定化培养中,由于包埋材

料的阻隔,细胞生长所需养分的供给效率低于悬浮培养细胞;并且细胞生长过程中产生的代谢废弃物大量积累在培养细胞的周围,易造成细胞的自毒。但同时,固定化培养方式提高了细胞的组织化程度,有利于培养细胞中次生物质的合成和积累,并能长时间保持细胞活力;同时,培养的细胞珠粒容易回收,可以反复使用,从而较细胞悬浮培养更有利于工业化生产。

参 考 文 献

1 Brodelius P, Deus B, Mosbach K, et al. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products[J]. FEBS Lett, 1979, 103(1): 93~97

2 Bringi V, Shuler M J. In: Bont J A M(ed). Physiology of Immobilized Cells[M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990, 161~172

3 Shibasaki K N, Iizuka Y, Yonemoto T. Cultures of *Nicotiana tabacum* cells immobilized in calcium alginate gel beads coated with cell-free gel film[J]. J Chem Eng Japan, 2001, 34(11): 1 431~1 438

4 Rao S R, Ravishankar G A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites[J]. Biotech. Advances, 2002, 20: 101~153

5 Tyler R T, Kurz W G W, Paiva N L, et al. Bioreactors for surface immobilized cells[J]. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1995, 42: 81~90

6 Yanagihara K, Ito A, Toge T, et al. Antiproliferative effects of isoflavonoids on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract[J]. Cancer Res, 1993, 53: 5 815~5 821

- 7 Keung W M. Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae* [J]. Alcohol Clin Exp Res, 1993, 17: 1 254~1 260
- 8 Ishida H, Uesugi T, Hirai K, et al. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistein, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet [J]. Biol Pharm Bull, 1998, 21: 62~66
- 9 Yu O, McGonigle B. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis[J]. Advances in Agron, 2005, 86: 147~190
- 10 Prasain J K, Jones K, Kirk M, et al. Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 4 213~4 218
- 11 Adam Matkowski. In vitro isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi [J]. J Plant Physiol, 2004, 161(3): 343~344
- 12 李 玲, 刘慧丽, 史永忠. 三裂叶葛愈伤组织形成和异黄酮类的产生[J]. 高技术通讯, 2001(5): 25~27
- 13 Hakamatsuka T, Ebizuka Y, Sankawa U. in: Y P S Bajaj (Ed.), Biotechnology in Agricultural and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants VII [J]. Springer Berlin, 1994, 28: 386~400
- 14 刘慧丽. 野葛细胞培养及其异黄酮类物质的产生[D]. 广州: 华南师范大学, 2001, 36~38
- 15 应佩青, 许建峰, 苏志国. 丹参冠瘿组织培养特性及培养动力学研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(5): 478~482
- 16 林 颖, 吴毓敏, 吴 雯, 等. 天然产物中糖含量测定方法正确性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(3): 5
- 17 Fang C B, Wan W C, Tan HR, et al. Identification of isoflavonoids in several kudzu samples by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC/ESI-MS) [J]. J Chromatogr Sci, 2006, 44(2): 57~63

The Immobilized Cell Cultures of *Pueraria lobata* and the Production of Isoflavonoids

Fang Congbing Wan Xiaochun Su Erzheng Jiang Changjun Li Hegin

(Key Laboratory of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education and Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT Cell suspension cultures of *Pueraria lobata* were immobilized with 3% alginate, and then cultured in B5 liquid medium supplemented with 1 mg/L(NAA), 1 mg/L 2, 4-D. 0.5 mg/L KT and 20 g/L sucrose. During the growth cycle of immobilized cell cultures, cell growth, sucrose consumption and isoflavone accumulation in the culture system were examined respectively. The main results were as follows: the growth curve of immobilized cell cultures was typical "S" type, and can be divided into three main stages, the initial lag phase of 8 days, the exponential phase (from d 8 to d 14) and the stable growth phase (from d 14 to d 18), in which the maximum biomass attained at d 18 was 48.56gFW/L, about 3.04 fold of that of the initial inoculation, and the sucrose content in culture system decreased with the increase of immobilized cell biomass. Meanwhile, isoflavonoids inside immobilized cell cultures and cultured medium accumulated constantly, and isoflavone content which associated with the growth of immobilized cell cultures increased in the culture system and reached the growth peak at d 16, about 17.28 fold of that of the initial inoculation. The results obtained in this paper were helpful to explore the production of isoflavonoids with the immobilized cells cultures of *P. lobata*.

Key words isoflavonoids, *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi, cell immobilization, alginate

(上接第 22 页)

Study on the Acid Hydrolysis Factors of Low Viscosity Octenyl Succinic Anhydride Modified Starch

Yao Hongbo Wu Yinglong

(Department of Food Science, Sichuan Agriculture University, Yaan 625014, China)

ABSTRACT Hydrolysis time, temperature, acid concentration are the main hydrolysis factors on the viscosity of octenyl succinic anhydride modified starch. Response surface analysis(RSA) was used to study on the hydrolysis factors. The regression model was set up to predict the hydrolysis parameters of octenyl succinic anhydride starch modified starch. The experiment results showed that the optimal parameters of preparing low-viscosity octenyl succinic anhydride modified starch (DS 0.156, 0.004Pa·s) by acid hydrolysis were hydrolysis time 6.39h, temperature 49.85℃, and concentration of hydrochloric acid 1.48%, respectively.

Key words octenyl succinic anhydride modified starch, acid hydrolysis, viscosity