

几种因素对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质的影响

魏楠楠, 姚睿, 李阳, 朴炫春, 廉美兰

(延边大学 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要:以铁皮石斛原球茎为试材,应用 3 L 气升式生物反应器,研究了反应器不同培养时期、通气方式和接种量对铁皮石斛原球茎生物量及有效物质积累的影响,并比较了铁皮石斛不同来源材料的多糖与生物碱含量。结果表明:铁皮石斛原球茎的生物量及多糖和生物碱的积累量均在培养至 30 d 时达到最大值,在反应器培养过程中逐步调节通气量由 0.1 vvm 至 0.3 vvm,可提高原球茎的生物量及有效物质的含量,接种量为 20~25 g/L 均可获得较高的原球茎生物量且有效物质含量和产量也较高,铁皮石斛原球茎的多糖和生物碱含量均高于 1 年生植株和组培苗。因此,铁皮石斛原球茎反应器培养 30 d,培养期间将通气量由 0.1 vvm 调节至 0.3 vvm,接种量为 20~25 g/L 有利于大量生产原球茎及其有效物质。

关键词:培养时期;接种量;通气方式;多糖;生物碱

中图分类号:R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0156-04

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Kimura et Migo) 属兰科石斛属气生草本植物,作为传统珍贵中药对滋阴清热、生津益胃等有显著功效^[1],又因其富含多糖、生物碱等活性化合物而具有免疫调节和抗氧化作用^[2]。然而由于铁皮石斛苛刻的生长环境,较低的自然产量以及人们长时期的过度采挖,致使野生资源日益减少^[3-4]。近年来,利用植物组织培养进行其繁殖已经成为持续研究利用野生资源的主要方式^[5-6],但传统的组织培养技术不利于商业大规模生产且生产成本较高,生物反应器因其具有较高的生产能力与可控的物理和化学条件,逐渐应用在铁皮石斛的大规模生产中^[7],以提高生物量并获得大量的生物活性物质。目前,关于培养方式、光照强度和通气量等对铁皮石斛原球茎生长和有效物质积累的影响已被报道^[7-8],因此,现以铁皮石斛原球茎为试验材料,研究不同培养时期、通气方式和接种量对气升式生物反应器培养铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累的影响,并比较铁皮石斛不同来源材料的有效成分含量,以期为规模化生产铁皮石斛及其有效物质奠定理论基础。

第一作者简介:魏楠楠(1991-),女,硕士研究生,研究方向为植物组织培养。E-mail:weinannan91211@163.com.

责任作者:廉美兰(1963-),女,博士,教授,现主要从事植物组织培养和生物反应器等研究工作。E-mail:lianmeilan2001@yahoo.com.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160079)。

收稿日期:2014-04-01

1 材料与方法

1.1 试验材料

将采自浙江温州的铁皮石斛种子消毒后进行无菌播种诱导原球茎,并进行增殖培养。增殖培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA+2 mg/L BA+0.165 g/L KH₂PO₄+3 g/L 蛋白胨+5 g/L 倍力凝,pH 调节至 5.8。将其置于温度(25±2)℃,相对湿度 70%,光照强度 1 600 lx,光周期为 16 h 的培养条件下,继代培养周期为 30 d。将培养 30 d 的原球茎切成约 0.5 cm×0.5 cm (鲜物重约 0.05 g)的小块作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 不同培养时期铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累 在 3 L 气升式生物反应器中注入 2 L 培养基(1/2 MS+0.5 mg/L NAA+2 mg/L BA+0.165 g/L KH₂PO₄+3 g/L 蛋白胨,pH 5.8),接入原球茎 20 g,通气量为 0.1 vvm[空气体积/(培养基体积·min)],培养条件同 1.1,每个处理 3 次重复。接种后 4 个反应器分别在 10、20、30、40 d 将原球茎取出,用自来水将其表面冲洗干净,沥干水分后称取其鲜物重,再将原球茎放入烘干箱(55℃)烘干至恒重后称得干物重,进而测定原球茎中多糖和生物碱含量,计算多糖及生物碱产量。

1.2.2 通气方式对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质的影响 利用气升式生物反应器(3 L)培养铁皮石斛原球茎,添加 2 L 液体培养基,培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA+2 mg/L BA+0.165 g/L KH₂PO₄+3 g/L 蛋白

豚, pH 为 5.8。接种量为 10 g/L, 培养条件同 1.1。2 个反应器最初的通气量均设为 0.1 vvm, 在培养至第 15 天原球茎开始下沉时, 将其中一个反应器通气量调节至 0.25 vvm, 在接种后 26 d 反应器内原球茎大部分下沉时将通气量继续调节至 0.3 vvm 进行培养, 每个处理 3 次重复。培养 30 d 后调查原球茎的鲜物重、干物重以及多糖和生物碱的含量和产量。

1.2.3 接种量对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质的影响 利用 3 L 气升式生物反应器培养铁皮石斛原球茎, 培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA+2 mg/L BA+0.165 g/L KH_2PO_4 +3 g/L 蛋白胨, pH 5.8。每个反应器中加入 2 L 培养基, 将接种量分别设为 10、15、20、25、30 g/L。通气量为 0.1 vvm, 培养条件同 1.1, 每处理重复 3 次。培养 30 d 后将原球茎分别取出, 称取其鲜物重、干物重, 进而测定原球茎中多糖和生物碱含量, 计算多糖及生物碱生产量。

1.2.4 不同来源铁皮石斛有效成分含量比较 比较铁皮石斛 1 年生植株、继代培养 6 个月的组培苗和反应器培养 30 d 原球茎的多糖及生物碱含量。

1.3 项目测定

1.3.1 多糖含量的测定 参照李满飞等^[9]的方法对多糖含量进行测定。精密称取干燥至恒重的葡萄糖 100 mg, 加蒸馏水溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 量取 10 mL 溶液置于 100 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容, 此为标准品溶液。精密量取标准品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8 mL 分别置于试管中, 加蒸馏水至 2.0 mL, 再加入 1.0 mL 苯酚试液, 均匀混合后迅速滴加 5.0 mL 浓硫酸, 摇匀后静置 5 min, 置于沸水浴中加热 15 min, 取出后放入冷水中迅速冷却至室温, 以蒸馏水为对照。于 490 nm 波长处测定吸光度, 然后绘制标准曲线。将培养得到的干燥原球茎研磨成粉末, 精确称取原球茎粉末 0.1 g, 在室温下用 10 mL 80% 乙醇浸泡 6 h 后, 收集沉淀物再次添加 10 mL 80% 乙醇浸泡 6 h, 向最终收集到的沉淀物中加入 20 mL 蒸馏水, 超声波处理 30 min, 过滤收集上清液, 同时继续将沉淀物用蒸馏水浸泡重复超声波处理共计 3 次, 将收集到的滤液混合, 用苯酚-浓硫酸法测定多糖含量。

1.3.2 生物碱含量的测定 参照李亚芳等^[10]的方法对生物碱含量进行测定。精密称取石斛碱标准品 1 mg, 加氯仿溶解并定容在 100 mL 量瓶中, 然后称取标准品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 分别置于分液漏斗中, 添加氯仿稀释至 10 mL, 再加入 5.0 mL pH 4.5 的磷酸盐缓冲液和 1.0 mL 0.04% 溴甲酚绿溶液, 用力摇动 3 min, 静置 30 min 后, 用氯仿浸泡处理并已干燥的脱脂棉过滤, 取 6.0 mL 滤液于试管中, 加入 1.0 mL 氢氧化钠无水乙醇溶液(0.01 mol/L)后摇匀, 以氯仿作为空白对照。于 620 nm 波长处测定吸光值, 绘制标准曲线。称取 0.5 g 反应器处理中获得的原球茎干燥粉末, 加入适量氨水将其浸湿, 密封放置 30 min 后加入 10 mL 氯仿并称重, 80℃ 水浴回流 2 h, 冷却后再次称重并用氯仿补足至原重, 过滤, 取 2 mL 滤液于试管中, 添加氯仿定容至 10 mL, 按上述方法用分光光度计于 620 nm 测定并计算石斛碱含量。

1.4 数据分析

利用 SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) 程序中方差分析(ANOVA)对试验数据进行分析, 采用邓肯氏新复极差法进行比较, 显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 不同培养时期对铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累的影响

铁皮石斛原球茎的生长状况以及多糖和生物碱的含量与培养天数密切相关(表 1)。原球茎生物量随着天数的增加逐渐增加, 鲜物重在培养第 10~20 天增长较快, 在第 30 天达到最大值(152.84 g), 30 d 后稍有降低, 干物重有相同的趋势, 同样在第 30 天达到最大值, 为 14.43 g; 多糖含量在培养第 10~20 天有一定增长, 在第 20~30 天增长较快, 第 30 天达到最大值(214.18 mg/g DW), 30 d 后多糖含量开始下降, 多糖产量也相应地在培养第 30 天达到最大值, 为 1.55 g/L; 而原球茎内生物碱含量则在第 10~20 天增长最快, 之后继续增长在第 30 天含量达到最高(228.03 $\mu\text{g/g}$ DW), 30 d 后逐渐降低, 生物碱产量也在培养 30 d 时达到最大值, 为 1.65 mg/L。因此, 培养 30 d 为铁皮石斛原球茎最佳的培养时期。

表 1 不同培养时期对铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累的影响

Table 1 Effect of culture days on accumulation of biomass and bioactive compounds during bioreactor culture of *Dendrobium candidum* PLB

培养天数 Culture day	生物量 Biomass		多糖 Polysaccharide		生物碱 Alkaloid	
	鲜物重 Fresh weight/g	干物重 Dry weight/g	含量 Content/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW	产量 Productivity/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	含量 Content/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW	产量 Productivity/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
10	39.30 c	4.23 c	127.78 d	0.27 c	121.02 d	0.26 d
20	112.04 b	12.05 b	167.67 c	1.01 b	182.98 c	1.10 c
30	152.84 a	14.43 a	214.18 a	1.55 a	228.03 a	1.65 a
40	150.66 a	14.20 a	211.11 a	1.50 a	203.19 b	1.44 b

注: 不同小写字母代表 0.05 水平下差异显著, 下同。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level, the same below.

铁皮石斛原球茎中多糖和生物碱积累与原球茎的生长呈正相关。培养前 10 d,生物量与多糖含量均较低,可能由于刚继代的原球茎在培养初期需要一段时间来适应新的生长环境,准备进行快速繁殖,多糖物质可能被转换为其它物质供应增殖生长,进入对数生长期后,多糖才重新开始在原球茎中积累,培养 30 d 后,多糖含量下降可能与培养基中养分供应不足及次生代谢产物积累有关;铁皮石斛原球茎在生长期生物碱的积累和原球茎的生长趋势相同,30 d 后,原球茎由对数生长期进入缓慢生长期,生物碱含量下降可能由于次生生长受到抑制。因此,反应器培养末期,原球茎生长缓慢,多糖和生物碱含量下降可能与培养基中养分缺失和积累的大量代谢产物有关。

2.2 通气方式对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累的影响

反应器通气量大小对铁皮石斛原球茎的生长以及有效物质的积累有一定影响。由表 2 可知,铁皮石斛原球茎反应器培养过程中将通气量由 0.1 vvm 调节至 0.3 vvm,原球茎生物量有显著增加,鲜物重和干物重

表 2 通气方式对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累的影响

Table 2 Effect of aeration methods on accumulation of biomass and bioactive compounds during bioreactor culture of *Dendrobium candidum* PLB

通气方式 Aeration method	生物量 Biomass		多糖 Polysaccharide		生物碱 Alkaloid	
	鲜物重 Fresh weight/g	干物重 Dry weight/g	含量 Content/mg · g ⁻¹ DW	产量 Productivity/g · L ⁻¹	含量 Content/μg · g ⁻¹ DW	产量 Productivity/mg · L ⁻¹
0.1 vvm	145.85 b	14.43 b	156.43 b	1.13 b	187.35 b	1.35 b
0.1~0.3 vvm	172.25 a	16.39 a	241.29 a	1.90 a	242.24 a	1.99 a

2.3 接种量对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累的影响

在铁皮石斛原球茎反应器培养过程中,适宜的接种量是大量获得原球茎及其有效物质的重要前提条件。在 3 L 反应器(2 L 工作体积)中分别接种 10、15、20、25、30 g/L 原球茎培养 30 d 后,由表 3 可知,增加接种量原球茎的生物量有所提升,在接种量为 25 g/L 时鲜物重和干物重达到最大(287.75 g 和 27.94 g);多糖含量随接种量的增加而增加,在接种量为 25 g/L 时达到最大(314.64 mg/g DW),但与接种量为 20 g/L 时的多糖含

表 3 接种量对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质积累的影响

Table 3 Effect of inoculation density on accumulation of biomass and bioactive compounds during bioreactor culture of *Dendrobium candidum* PLB

接种量 Inoculation density/g · L ⁻¹	生物量 Biomass		多糖 Polysaccharide		生物碱 Alkaloid	
	鲜物重 Fresh weight/g	干物重 Dry weight/g	含量 Content/mg · g ⁻¹ DW	产量 Productivity/g · L ⁻¹	含量 Content/μg · g ⁻¹ DW	产量 Productivity/mg · L ⁻¹
10	164.55 d	14.73 d	226.49 c	1.67 d	241.22 c	1.78 c
15	214.72 c	21.76 c	239.59 c	2.61 c	239.80 c	1.77 c
20	264.23 b	25.65 b	290.97 a	3.73 b	294.29 a	3.78 a
25	287.75 a	27.94 a	314.64 a	4.40 a	271.84 b	3.80 a
30	256.03 b	24.86 b	279.89 b	3.48 b	224.90 c	2.80 b

在植物组织培养过程中,接种量与植物体的生长和器官分化有密切联系,反应器培养过程中选择恰当的接

分别达到 172.25 g 和 16.39 g,均高于恒定通气量(0.1 vvm)反应器培养条件下原球茎生物量;多糖含量也在逐步提高通气量的反应器培养中获得显著提高,达到 241.29 mg/g DW,产量也获得相应提高(1.90 g/L);调整通气量后生物碱含量也提升,提高到 242.24 μg/g DW,相应的产量为 1.99 mg/L,均显著高于 0.1 vvm 恒定通气量培养时的多糖和生物碱积累量。因此,在铁皮石斛原球茎反应器培养过程中应采用逐渐增大通气量(0.1~0.3 vvm)的通气方式以获得大量的多糖和生物碱。

通气条件是气升式生物反应器的主要控制因素,反应器培养铁皮石斛原球茎过程中,通气量一直保持 0.1 vvm 的情况下,由于原球茎不断增殖,在培养约 15 d 左右原球茎开始出现下沉现象,培养后期部分原球茎沉积在反应器下部,严重影响通气条件和原球茎的生长,因此在培养过程中提高通气量可保证原球茎与液体培养基的充分接触和液体培养基内的溶氧量,避免因原球茎沉积导致通气孔堵塞使通气量不足,而使铁皮石斛原球茎无法正常生长,降低其生物量与多糖和生物碱的积累量。

量(290.97 mg/g DW)无明显差异,随着接种量的继续增多,多糖含量呈下降趋势,多糖产量也相应地在接种量为 25 g/L 时达到最高,为 4.40 g/L;生物碱含量与多糖含量有相同的增长趋势,在接种量为 20 g/L 时达到最大(294.29 μg/g DW),后逐渐降低,生物碱产量也随接种量的增多而升高,在接种量为 25 g/L 时达到最大(3.80 mg/L),但与接种量为 20 g/L 时的产量(3.78 mg/L)无显著性差异。因此,为满足大规模商业生产的需要,生物反应器接种量在 20~25 g/L 均适宜多糖和生物碱的大量积累。

接种量是调节器官生长过程中必不可少的^[11]。接种量过多培养物无法充分吸收培养基内营养成分进而浪费资

源,然而接种量过少培养物生长缓慢且容易死亡。不同物种之间接种量也存在很大差异,已有研究表明贯叶连翘不定根反应器培养中适宜的接种量为 20 g^[12],这可能与植物种类有关。寻找适当的接种量是反应器培养的重要因素,因此,该试验为获得大量的多糖和生物碱,选择 20~25 g/L 作为接种量。

2.4 铁皮石斛不同来源材料有效成分含量比较

比较铁皮石斛 1 年生植株、继代培养的组培苗(6 个月)和反应器培养 30 d 的原球茎中多糖和生物碱含量,如图 1 所示,多糖含量在反应器培养的铁皮石斛原球茎中最高,达到 314.64 mg/g DW,其次是 1 年生植株中多糖含量,为 201.32 mg/g DW,组培苗中多糖含量最低,仅为 184.45 mg/g DW;生物碱含量与多糖含量有相同的存在情况,均在反应器培养的原球茎中最高,为 288.37 μ g/g DW,1 年生植株中生物碱含量虽较原球茎中稍低,但二者无显著性差异,达到 285.23 μ g/g DW,组培苗中最低,仅为 250.64 μ g/g DW。

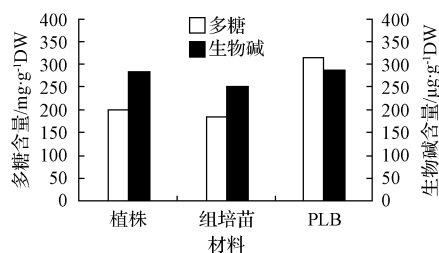


图 1 铁皮石斛不同来源材料多糖及生物碱含量比较

Fig. 1 Comparison of polysaccharide and alkaloid contents of *Dendrobium candidum* from different sources

3 讨论

相关研究表明,铁皮石斛悬浮培养的原球茎与铁皮石斛原药材的多糖含量相近,人工培养的铁皮石斛原球

茎具有相当高的营养价值,可以弥补野生资源不足等问题^[13]。该试验中多糖和生物碱含量在反应器培养的铁皮石斛原球茎中明显高于 1 年生栽培植株和组培苗中二者的含量,因此用反应器大量生产铁皮石斛原球茎可进一步解决铁皮石斛野生资源匮乏以及其利用难、来源不足的问题,从而满足商业生产的需求。

参考文献

- [1] 叶庆华,赵维民,秦国伟. 石斛属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 药物化学进展,2004(3):113.
- [2] Ng T B, Liu J, Wong J H, et al. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93: 1795-1803.
- [3] 王旭红,余国冀. 中国兰科植物药用植物[J]. 中国野生植物资源, 1993(4):21.
- [4] 蒋向辉,余朝文,王善粉,等. 不同激素浓度对铁皮石斛高效快繁体系的影响[J]. 江苏农业科学, 2009(6):76-78.
- [5] 周俊辉,钟雪锋,蔡丁稳. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖的研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1):23-26.
- [6] 刘瑞驹,蒙爱东,邓锡青,等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究[J]. 药学报, 1988, 11(3):45-47.
- [7] Cui H Y, Hosakatte N M, Sang H M, et al. Production of biomass and bioactive compounds in protocorm cultures of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. Using balloon type bubble bioreactors [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 53:28-33.
- [8] 姚睿,朴炫春,李铁军,等. 利用气升式生物反应器培养铁皮石斛原球茎[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24):3763-3767.
- [9] 李满飞,徐国钧,平田正,等. 中药石斛类多糖的含量测定[J]. 中草药, 1990, 21(10):10-12.
- [10] 李亚芳,张晓华,孙国明. 石斛中总生物碱和多糖的含量测定[J]. 中国药事, 2002(7):426-428.
- [11] Debabrata S, Ramesh C, Prakash S N. Effect of inoculation density on potato micropropagation[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1997, 48(1):63.
- [12] 于晓坤,朴炫春,代月,等. 贯叶连翘不定根反应器培养的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24):3808-3811.
- [13] 何铁光,苏江,王灿琴,等. 铁皮石斛不同来源材料多糖和氨基酸含量的测定[J]. 广西农业科学, 2007, 38(1):31-34.

Effect of Several Factors on Accumulation of Biomass and Bioactive Compounds during Bioreactor Culture of *Dendrobium candidum* PLB

WEI Nan-nan, YAO Rui, LI Yang, PIAO Xuan-chun, LIAN Mei-lan

(Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules, Ministry of Education, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: Taking *D. candidum* PLB as experiment material, the effect of culture days, aeration method and inoculation density on accumulation of biomass and bioactive compounds of *D. candidum* PLB were studied, by using 3 L air-lift bioreactor. Additionally, the content of polysaccharide and alkaloid from different sources were compared. The results showed that the accumulation of biomass and bioactive compounds achieved the highest on the 30 d, when the air volume was adjusted from 0.1 vvm to 0.3 vvm during bioreactor culture and inoculation density was 20~25 g/L. The content of polysaccharide and alkaloid in *D. candidum* PLB was higher than cultivation plants and tissue culture seedlings. It was conducive to accumulation of biomass and bioactive compounds of *D. candidum* PLB in that conditions.

Key words: culture days; inoculation density; aeration method; polysaccharide; alkaloid