

愈伤组织培养提取药用活性成分是一种行之有效的办法。郭志刚^[5]等对盐生肉苁蓉愈伤组织培养方法与苯乙醇苷化合物合成进行了研究,认为愈伤组织中的主要成分与天然肉苁蓉基本相同。于荣敏等^[6]对银杏愈伤组织培养和其代谢产物银杏内酯进行了研究,筛选出了银杏内酯高产细胞系,银杏内酯量达万分之一,与天然植物的量相当。

笔者利用高效液相色谱技术对野生肉苁蓉肉质茎和由肉质茎诱导出的愈伤组织物质中主要药用活性成分麦角甾苷的测定比较,证明了愈伤组织培养物质中含有较高质量浓度的毛蕊花糖苷。《中国药典》2005年版一部^[9]中对肉苁蓉药材质量标准的要求中明确指出,样品干样中松果菊苷($C_{35}H_{46}O_{20}$)和毛蕊花糖苷($C_{29}H_{36}O_{15}$)的量应不低于0.3%。测定的愈伤组织干物质中松果菊苷($C_{35}H_{46}O_{20}$)和毛蕊花糖苷($C_{29}H_{36}O_{15}$)的量为4.37%,野生肉苁蓉肉质茎为3.99%。充分说明利用肉苁蓉愈伤组织培养技术来提取药用有效成分是可行的,可以减少对自然资源的采挖压力。

References:

- [1] Jin X L, Su Y K. Research survey in pharmacology of *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24 (10): 550-552.
- [2] Xu Z H, Yang J S, Lu R J, et al. Studies on the chemical constituents of cesertliving cistanche (*Cistanche deserticola*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (4): 244-246.
- [3] Fu L G. *China Plant Red Data Book* (中国植物红皮书) [M]. Beijing: Science Press, 1992.
- [4] Yang J Q, Zhang X Y, Chai S Z. Technology of planting *Haloxylon ammodendron* and *Cistanche deserticola* [J]. *Mod Agric* (现代农业), 2002, (12): 14-15.
- [5] Guo Z G, Yu J M, Liu R Z, et al. Studies on culture of *Cistanche salsa* callus and synthesis of phenylethanoid glycosides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (2): 204-207.
- [6] Yu R M, Zhao H L, Zheng Y G, et al. Studies on the callus culture of *Ginkgo biloba* and its metabolites-ginkgolides [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1999, 15 (1): 52-58.
- [7] Zhong Y H, Chen C Y, Tang Q R, et al. Studies on calluses induced from various explants of *Cistanche deserticola* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24 (4): 242-243.
- [8] Wu X, Li S, Dong X C, et al. Callus culture of *Cistanche deserticola* [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1998, 15 (3): 103-104.
- [9] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

槲寄生对光合细菌生长的促进作用

杨官斌^{1,2}, 张肇铭^{1*}, 王玉军¹, 马怀彦¹, 白红娟¹

(1. 山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006; 2. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001)

摘要:目的 考察槲寄生对光合细菌生长的促进作用。方法 通过光合细菌培养液中不同槲寄生浓度及常规培养基浓度对光合细菌活菌数的影响、不同浓度槲寄生对光合细菌生长曲线的影响及槲寄生提取液对光合细菌脱氢酶活性的影响来考察槲寄生对光合细菌生长的促进作用。结果 培养液中添加槲寄生最高可使光合细菌活菌数增加达8倍以上;而且可以使光合细菌不经过延迟期直接进入指数期,缩短光合细菌的生长周期;且使光合细菌脱氢酶活性提高8.4倍。结论 培养液中添加槲寄生提取物可促进光合细菌生长,提高光合细菌的活力。

关键词:槲寄生;光合细菌;生长促进作用

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)08-1241-04

Improvement effects of *Viscum coloratum* on growth of photosynthetic bacteria

YANG Guan-e^{1,2}, ZHANG Zhao-ming¹, WANG Yu-jun¹, MA Huai-yan¹, BAI Hong-juan¹

(1. College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: **Objective** To study the improvement effects of *Viscum coloratum* on growth of photosynthetic bacteria (PSB). **Methods** Improvement effect of *V. coloratum* on growth of PSB was researched by observing the effects of various *V. coloratum* concentrations and general culture medium concentration on the number of alive bacteria, observing the effects of *V. coloratum* on growth curve of

收稿日期:2005-11-20

基金项目:国家科技攻关项目(2001BA540C)

作者简介:杨官斌(1967—),女,山西怀仁人,副教授,在读博士,研究方向为天然药物化学。

Tel: (0351) 4690143 E-mail: yangguane@yahoo.com.cn

* 通讯作者 张肇铭 Tel: (0351) 7011409

PSB and dehydrogenase activity. **Results** Adding *V. coloratum* into culture medium was able to increase the number of alive PSB in 8 times to act PSB directly entering exponential period without delay period which shortened the growth period of PSB, and to improve dehydrogenase activation of PSB in 8.4 times. **Conclusion** Adding *V. coloratum* into culture medium is able to improve both the growth and the activity of PSB.

Key words: *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai; photosynthetic bacteria (PSB); growth improvement effects

光合细菌是一类具有原始光能合成体系的原核生物,在自然界分布十分广泛。在不同的自然环境下,具有固氮、脱氮、固碳、硫化物氧化等多种功能。自 20 世纪 80 年代以来,人们逐步认识到菌体的营养价值及一些特殊的生理活性,被广泛应用于生态环境及人类生活方面^[1,2],如何在短时间低成本条件下,获得高浓度高活性的光合细菌菌体,以适应生产实际的需要,是一个值得研究的课题。英荣等^[3]通过研究发现,木瓜、栝楼、女贞子、郁金、夏枯草等 5 种药材对光合细菌的生长均有不同程度的促进作用。

槲寄生来源于桑寄生科槲寄生 *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai 的带叶茎枝,其中含有黄酮、生物碱、三萜、蛋白质、多糖等类型化合物。已有文献报道,槲寄生粗提物、槲寄生总生物碱具有抗肿瘤活性,但因其中含有对人体有害的毒肽和小分子蛋白质,限制了其应用^[4,5]。光合细菌可以转化中药中的一部分成分^[6,7]。本课题组通过一定工艺制得光合细菌转化槲寄生制剂,前期动物实验证明:其抗肿瘤活性明显高于槲寄生提取液、纯光合细菌培养液、简单的槲寄生提取物加光合细菌培养液;其毒性显著低于槲寄生提取液,给最大可用药量未见受试动物出现任何毒性作用。但其前提条件必须是槲寄生可以促进光合细菌的生长。本实验对槲寄生促进光合细菌的生长作用进行了研究。

1 材料

1.1 药材:槲寄生饮片,购自定州医药公司东亭批发部,经山西医科大学高建平教授鉴定为桑寄生科植物槲寄生 *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai 的干燥茎叶。

1.2 实验菌株:光合细菌系紫色非硫菌群红细菌属的球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides*,由山西大学光合细菌研究室分离鉴定保藏^[8],采用下述培养基,光照厌氧培养 3 d,菌液含菌数 5.0×10^8 个/mL。

1.3 培养基:乙酸钠 1 640 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, EDTA 20 mg,酵母膏 1 000 mg, K_2HPO_4 900 mg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 320 mg,

KH_2PO_4 600 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11.8 mg,微量元素 1 mL,去离子水 1 000 mL, pH 6.8~7.2。

2 方法

2.1 实验条件:实验用培养基和器皿都经过高温灭菌消毒,实验前又在洁净工作台内经过 30 min 紫外线照射灭菌。实验容器为 100 mL 血清瓶,平行样 3 个,重复 3 次。实验温度 $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照厌氧培养,光照强度 2 500 lx 左右。用血球计数法测定菌液活菌数以示球形红细菌的生长。在平行样之间的相对偏差小于 15% 时,实验数据取至 3 个平行样的均值。

2.2 培养方法:槲寄生饮片称质量后分别加入 5 倍量水提取 3 次,每次 30 min,合并滤液,浓缩至一定体积,按槲寄生原药材不同的克数分装入不同的血清瓶,分别加入不同毫升数的水或培养基,调节 pH 值为 7.0 左右,121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min,得不同质量浓度常规培养基(全量常规培养基、半量常规培养基、无常规培养基)、不同质量浓度槲寄生提取液(1 000、400、200、100 g/L 等)(按槲寄生原药材计)的光合细菌培养基。无菌条件下,接种 1/10 体积的光合细菌菌液后培养 3 d 得槲寄生光合细菌菌液。

2.3 脱氢酶活性测定方法:取培养好的光合细菌菌液 500 mL,离心后得湿菌体 1.02 g,以聚乙烯醇为固定化材料,以饱和硼酸溶液为固定剂,制成固定化细胞 20.6 g,于培养基中活化 12 h 后,取一半培养于 250 mL 常规培养基中,一半培养于 250 mL 25 g 槲寄生水提取液中,各培养 3 d 后,弃去培养液,取固定化细胞用蒸馏水洗数次,以氯化三苯基四氮唑(TTC)法^[9]测定固定化光合细菌脱氢酶活性(以每小时每毫升光合细菌菌液产生的三苯基甲酯(TF)为一个活力单位)。实验重复 3 次。

3 结果

3.1 不同槲寄生浓度和常规培养基浓度对光合细菌生长的影响:由图 1 可知,在全量常规培养基条件下,随着槲寄生质量浓度的增加(3.125~12.5 g/L),光合细菌活菌数由 5.1×10^8 个增加到 16.8×10^9 个,以后随着槲寄生浓度的继续增加(12.5~

1 000 g/L), 光合细菌活菌数由 1.68×10^9 个减少到 3.8×10^8 个。说明在全量常规培养基条件下, 当槲寄生质量浓度比较低时, 槲寄生可以促进光合细菌的生长, 且呈量效关系, 但随着槲寄生质量浓度的继续增加, 在一定程度上开始抑制光合细菌的继续生长, 当为 400 g/L 时, 基本和原菌液菌数相同, 当浓度继续增加时, 表现为比较强的抑制作用; 在半量常规培养基条件下, 随着槲寄生提取液浓度的增加, 可以一直促进光合细菌的生长, 但当质量浓度为 1 000 g/L 时, 虽菌液含活菌量为 4.11×10^9 个, 但高压灭菌过程中发生喷瓶现象, 在实验或生产操作过程中有一定困难, 推荐培养液槲寄生最高为 1 000 g/L, 且任何浓度活菌数均高于半量常规培养基时的活菌数 3.5×10^8 个, 槲寄生达到 6.25 g/L 时, 活菌数即开始超过全量常规培养基时的活菌数 5.0×10^8 个; 在无常规培养基条件下, 随着槲寄生提取液浓度的增加, 可以一直促进光合细菌的生长, 但当 1 000 g/L 时, 虽菌数活菌数达 4.04×10^9 个, 但高压灭菌过程中亦发生喷瓶现象, 在实验或生产操作过程中有一定困难, 推荐培养液槲寄生最高为 1 000 g/L, 当升高到 25 g/L 时, 菌液活菌数开始大于全量常规培养基时的活菌数 5.0×10^8 个, 即槲寄生提取液可以作为光合细菌生长的唯一培养基。

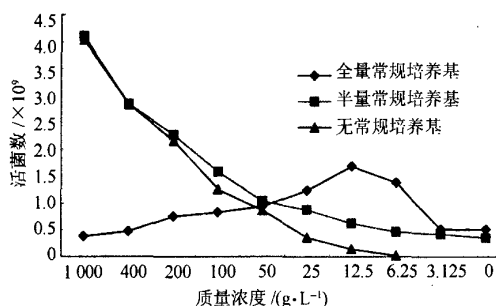


图 1 不同浓度常规培养基条件下槲寄生浓度对光合细菌活菌数的影响

Fig. 1 Effects of *V. coloratum* concentration on number of alive PSB under various culture medium concentrations

3.2 不同浓度槲寄生对光合细菌生长曲线的影响: 由 3.1 可知, 200 g/L 槲寄生半量常规培养基、6.25 g/L 槲寄生全量常规培养基可以很好地促进光合细菌的生长, 为初步探索其促生长机制, 以常规培养基、200 g/L 槲寄生半量常规培养基、6.25 g/L 槲寄生全量常规培养基平行作生长曲线。由图 2 可知, 常规培养基中光合细菌大约 30 h 度过延迟期, 开始进入指数期, 大约 60 h 进入稳定期, 以后逐渐进入衰

亡期; 200 g/L 槲寄生半量常规培养基、6.25 g/L 槲寄生全量常规培养基中光合细菌基本无延迟期, 直接进入指数期, 大约 40、50 h 分别进入稳定期, 且延迟进入衰亡期的时间。说明槲寄生提取液特别适合光合细菌的生长, 可以不经延迟期直接进入指数期, 缩短了光合细菌的生长周期, 并且使菌数分别提高大约 4、3 倍。

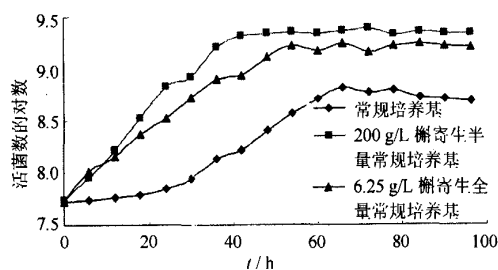


图 2 槲寄生浓度对光合细菌生长曲线的影响

Fig. 2 Effects of *V. coloratum* concentration on PSB growth curve

3.3 槲寄生对光合细菌脱氢酶活性的影响: 常规光合细菌培养基中固定化细胞脱氢酶活性为 $23.5 \mu\text{g TF}/(\text{mL} \cdot \text{h})$, 槲寄生提取液中固定化细胞脱氢酶活性为 $196.8 \mu\text{g TF}/(\text{mL} \cdot \text{h})$, 即槲寄生提取液中固定化细胞脱氢酶活性是常规培养基中固定化细胞脱氢酶活性的 8.4 倍, 证明槲寄生可以提高光合细菌的活性。

4 讨论

在全量常规培养基条件下, 当槲寄生质量浓度小于 400 g/L 时, 可以使光合细菌活菌数提高, 且可以缩短光合细菌的生长期, 提高光合细菌的活力。当槲寄生为 12.5 g/L 时, 光合细菌的活菌数达到最高, 为 1.68×10^9 个, 是未加槲寄生的原光合细菌菌液中光合细菌活菌数的 3 倍 (原为 5.0×10^8 个)。为在短时间低成本条件下, 获得高浓度高活性的光合细菌菌体创造了条件。

在半量常规培养基、无常规培养基条件下, 当槲寄生分别大于 6.25、25 g/L 时, 可以使光合细菌活菌数提高, 当槲寄生为 1 000 g/L 时, 菌液含活菌量分别为 4.11×10^9 个、 4.04×10^9 个, 分别是未加槲寄生的原光合细菌菌液中光合细菌活菌数的 8 倍多 (原为 5.0×10^8 个), 但高压灭菌过程中发生喷瓶现象, 实验中已不可能再增加槲寄生的浓度, 如果能解决这一问题, 槲寄生浓度继续增加, 还能否促进光合细菌的生长, 有待于进一步研究。不仅为在短时间低成本条件下, 获得高浓度高活性的光合细菌菌体创造了条件, 而且为制得光合细菌转化槲寄生抗肿瘤

制剂创造了条件。

另外,在实验过程中发现,培养液中只要添加少量槲寄生,即可改变光合细菌的贴壁性能,解决了光合细菌培养过程中由于贴壁现象造成的光线不能透过培养液的问题。

本课题组通过总蛋白测定表明,光合细菌转化槲寄生培养液中总蛋白的量低于槲寄生提取液总蛋白量的80%以上,证明光合细菌利用了槲寄生提取液中的蛋白类成分,在一定程度上可以解释槲寄生促进光合细菌生长的机制。但槲寄生对光合细菌生长的促进作用机制需进一步探索。

本实验只对中药槲寄生对光合细菌生长的促进作用进行了研究,具体应在什么条件下培养光合细菌需要根据用途而定,如果仅仅需要光合细菌菌体,比如饲料、肥料中应用,应在全量常规培养基条件下,槲寄生质量浓度3.125~12.5 g/L(以槲寄生原药材计)为佳;如果是用于抗肿瘤制剂,应在充分考虑槲寄生生物转化的前提下,提高光合细菌活菌数。具体的最佳培养条件不是仅仅根据光合细菌活菌数来确定的,课题组正在进一步研究。

References:

- [1] Okezie I A, Monica D, Antonella R, *et al.* Assessment of the ability of the antioxidant cocktail-derived from fermentation of plants with effective microorganisms (EM-X) to modulate oxidative damage in the kidney and liver of rats *in vivo*: studies upon the profile of poly- and mono-unsaturated fatty acids [J]. *Toxicol Lett*, 2002, 135: 209-217.
- [2] Toshihiko K, Masayasu A, Toshiro H, *et al.* Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment [J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93 (2): 145-150.
- [3] Ying R, Wang Y P, Hong X H, *et al.* Application of plants extracts in the development of photosynthetic bacteria [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (4): 293-295.
- [4] Schumacher U, Valentiner U. Current understanding of mistletoe lectins [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8 (1): 17-18.
- [5] Bauer C, Oppel T, Przybilla B, *et al.* IgE-Mediated anaphylaxis to viscotoxins of mistletoe (*Viscum album*) extracts [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 2003, 113 (2, Suppl): S309.
- [6] Ceng Y, Duan X H. Using photosynthetic bacteria fermenting and transforming bran [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2001, 11 (5): 44-46.
- [7] Wang X H, Li Q D, Cao Q E. New field for study of TCM through fermentation by microbe [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (3): 267-268.
- [8] Zhang Z M. The study on purple nonsulfur photosynthetic bacteria. 1. Separating, identifying and living characteristics of *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *J Shanxi Univ* (山西大学学报), 1984, 7 (4): 201-204.
- [9] Yin J, Tan X J, Zhang L G, *et al.* Extractant selection in measuring activity of dehydrogenase [J]. *China Water Wast Water* (中国给水排水), 2004, 20 (7): 96-98.

光强和光质对灯盏花生长与总黄酮量影响的研究

苏文华¹, 张光飞¹, 李秀华¹, 顾发祥², 石秉亮²

(1. 云南大学生态学与地植物学研究所, 云南 昆明 650091; 2. 云南生物谷灯盏花药业有限公司, 云南 昆明 650224)

摘要:目的 光强和光质对灯盏花生长与总黄酮量的影响。方法 用遮阳网形成的不同光强以及不同颜色塑料膜下形成的不同光质的光照条件生境下,种植灯盏花试管苗至开花,取样测定生物量和黄酮的量。结果 全光照和遮光20%生境中的植物生物量和黄酮的量明显高于遮光50%生境的植株;与无色塑料膜相比,黄、红、紫和蓝色塑料膜下平均植株的生物量均下降;无色和有色塑料膜下,蓝色膜下植株的黄酮量最高,而无色塑料膜下植株的黄酮产量最高。结论 光强和光质影响灯盏花生长与总黄酮量,灯盏花在全阳光照射下植株有最高的生物量积累和黄酮产量。

关键词:灯盏花;总黄酮含量;光强;光质

中图分类号:R282.6

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)08-1244-04

Effect of light intensity and light quality on growth and total flavonoid accumulation of *Erigeron breviscapus*

SU Wen-hua¹, ZHANG Guang-fei¹, LI Xiu-hua¹, GU Fa-xiang², SHI Bing-liang²

(1. Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Yunnan Biovally Dengzhanhua Pharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650224, China)

Abstract: Objective To study the effect of light intensity and light quality on the growth and total

收稿日期:2005-11-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30360009)

作者简介:苏文华(1962—),男,云南昆明人,副教授,主要从事植物次生代谢生态学研究。E-mail: whsu@ynu.edu.cn