

稀土等对霍山石斛组培苗石斛多糖含量的影响

谢寅峰¹, 徐 丽^{1,2}

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 南京市园林科学研究所, 江苏 南京 210037)

摘要:以霍山石斛试管苗为材料, 研究硝酸镧稀土(10~40 mg/L)、水杨酸(0.2~5.0 mg/L)和L-赖氨酸(0.5~12.5 mg/L)对石斛多糖含量的影响, 并对石斛多糖提取工艺进行探讨。结果表明: 稀土镧和L-赖氨酸对石斛多糖含量具有极显著影响, 水杨酸有显著影响, 在各自浓度范围内提高石斛多糖含量最适浓度分别为20、2.5和0.2 mg/L, 与对照相比多糖含量(质量分数)分别增加76.33%、77.11%和23.60%。正交试验表明石斛多糖提取工艺的最佳方案为: 100 mL的石油醚+100 mL体积分数为80%的乙醇+40 mL的料液。各因素对霍山石斛多糖提取的影响大小顺序依次为: 体积分数为80%乙醇量、石油醚量、料液量。

关键词: 稀土; L-赖氨酸; 水杨酸; 石斛多糖; 霍山石斛

中图分类号: S718

文献标识码: A

文章编号: 1000-2006(2008)06-0039-04

Effects of rare earth and so on on polysaccharides content of *Dendrobium huoshanense* plantlet in vitro

XIE Yin-feng¹, XU Li^{1,2}

(1. College of Forest Resources and Environment Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. Nanjing Institute of Gardening Science, Nanjing 210037, China)

Abstract: The effects of rare earth lanthanum (10—40 mg/L), salicylic acid (0.2—5.0 mg/L) and L-lys (0.5—12.5 mg/L) on the content of polysaccharides in *Dendrobium huoshanense* seedling were examined under tissue culture condition. The extraction condition of polysaccharides was determined. The results showed that lanthanum and L-lys had highly significant effects on the polysaccharides content, while salicylic acid had significant effects. The best concentration within each definite concentration range in improving the polysaccharides in *D. huoshanense* was 20mg/L lanthanum nitrate, 2.5 mg/L L-lys and 0.2 mg/L salicylic acid. The content increased 76.33%, 77.11% and 23.60% respectively compared with the control. The orthogonal test showed that the optimum plan of polysaccharides extraction in *D. huoshanense* was 100 mL of the content of petroleum ether, 100 mL of 80% using ethanol and 40 mL of the feed. The order of three factors to influence polysaccharides extraction was 80% using ethanol, petroleum ether, material over solvent. The above results could be used as the reference for the development and utilization of *D. huoshanense* resources.

Key words: Rare earth; L-lys; Salicylic acid; Polysaccharides; *Dendrobium huoshanense*

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. j. Cheng)为中药石斛中的上品,其药效明显^[1-2]。霍山石斛含有人体所需的多种有益成分,其主要药用成分石斛多糖具有增加机体免疫力和抗肿瘤活性等功效^[3]。目前,有关如何提高霍山石斛多糖含量的研究虽有一定的报道,但多以原球茎为材料通过液体悬浮培养体系进行^[4-7],以试管苗为直接对象,稀土、水杨酸和赖氨酸对霍山石斛多糖影响的研究未见报道。笔者通过组培条件下外源稀土等添加物对霍山石斛试管苗多糖含量调控进行研究,并在前人研究基础上对石斛多糖提取纯化工艺进一步探讨,以期对霍山石斛的开发利用提供参考。

收稿日期:2008-02-02

修回日期:2008-09-23

基金项目:江苏省高校自然科学基金资助项目(05KJB220053)

作者简介:谢寅峰(1966—),男,副教授,主要研究方向为植物生理生化,xiyf@njfu.edu.cn。

引文格式:谢寅峰,徐 丽. 稀土等对霍山石斛组培苗石斛多糖含量的影响[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2008,32(6):39-42.

1 材料与方 法

1.1 供试材料及处理

霍山石斛试管苗及培养条件见文献[8]。以1/2MS+0.2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+0.3 mg/L 6-BA为基本培养基,分别添加不同浓度的水杨酸、L-赖氨酸、镧稀土(硝酸镧),以调控霍山石斛多糖的含量。其中添加硝酸镧的浓度分别为:10、20、40 mg/L;水杨酸分别为:0.2、1.0、5.0 mg/L;L-赖氨酸分别为:0.5、2.5、12.5 mg/L。进行30 d的诱导培养后,取出整株试管苗,洗净,于60℃下干燥至恒重,粉碎、过筛备用。

1.2 石斛多糖的制备

(1)石斛多糖的提取精制:装定量干燥的霍山石斛粉末于索氏提取器中,加石油醚于90℃下回流一次脱脂,趁热过滤,挥干溶媒以体积分数为80%的乙醇于90℃下回流一次除去单糖和低聚糖,趁热过滤,挥干溶媒,再加蒸馏水于100℃下回流提取1 h,之后趁热过滤得提取液,加体积分数为95%的乙醇沉淀,放置过夜。然后在4 000 r/min下离心15 min得到沉淀,将此沉淀溶于蒸馏水,加三氯乙酸-Sevag试剂脱蛋白,在4 000 r/min下离心15 min再得沉淀。依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤最后所得沉淀物并干燥,得到精制的霍山石斛多糖。

(2)多糖的鉴定:糖在浓硫酸的作用下脱水形成糠醛及其衍生物,与苯酚作用生成黄棕色复合物,可作为糖的定性鉴定。

(3)提取工艺的正交设计:以石油醚加量(80、100、120 mL)、体积分数为80%的乙醇加量(80、100、120 mL)、料液加量(80、100、120 mL)为因素,3水平建立正交设计。精密称取干燥至恒重的霍山石斛粉末1.000 g,按正交设计中条件提取石斛多糖^[9]。

1.3 石斛多糖的测定

(1)标准曲线的制作:称取在105℃下干燥至恒重的葡萄糖0.010 g,配制成浓度为100 mg/L的标准溶液,以及配制体积分数为5%的苯酚,作为贮备液。

绘制标准曲线时,将葡萄糖标准溶液稀释至不同浓度,分别加入1 mL体积分数为5%的苯酚摇匀,室温静置5 min后,在沸水浴中加热15 min,迅速冷却后待测。以1 mL蒸馏水同上操作作空白对照在490 nm处测吸光值,绘制标准曲线,得线性回归方程 $y = 0.0124x - 0.0164$, $R^2 = 0.9947$ 。

(2)换算因素的测定:精密称取60℃干燥至恒重的霍山石斛多糖5 mg,置于50 mL容量瓶,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取0.3 mL的贮备液,按标准曲线项下操作,测定吸光值。求出霍山石斛多糖溶液中葡萄糖的浓度,按下式计算换算因素 $f^{[10]}$:

$$f = \text{多糖溶液的浓度}(\mu\text{g/mL}) / \text{多糖溶液的葡萄糖浓度}(\mu\text{g/mL})。$$

(3)样品石斛多糖含量的测定:将制备的石斛多糖,按标准曲线法操作,测定吸光值,另外再重复两次同法操作,按下式计算样品中多糖的含量:

$$\text{多糖含量} = (C \cdot V \cdot f / W) \times 100\%。$$

式中: C 为供试液葡萄糖浓度($\mu\text{g/mL}$), V 为供试品溶液的体积, f 为换算因子, W 为供试品重量(μg)。

2 结果与分析

2.1 石斛多糖提取工艺的分析

经过石油醚量、80%乙醇量及料液量的3因素3水平9个组合的正交试验,发现不同的组合处理下霍山石斛多糖的提取具有较大的差异(表1)。对试验结果进行直观分析表明,石油醚量、80%乙醇量及料液量这3个因子对霍山石斛多糖提取的影响高低顺序依次为:80%乙醇量、石油醚量、料液量,筛选出提取工艺的最佳方案为: $A_1B_1C_1$,即100 mL的石油醚量+100 mL的80%乙醇量+40 mL的料液量。但是直观分析不能进行误差的估计,没有作误差分析,无法估计各因子及各水平之间的差异是由于试验误差造成的,还是水平间实质性变化。通过进一步的方差分析发现: $F_{0.05} < F_{\text{石油醚量}} < F_{0.1}$, $F_{0.05} < F_{80\%乙醇量} < F_{0.1}$,说明石油醚量和80%乙醇量对石斛多糖提取具有显著影响,而料液量则没有显著性影响。

表 1 霍山石斛多糖提取工艺 $L_9(3^4)$ 试验结果的直观分析

Table 1 The analysis concerning to the result of the extraction process of polysaccharides in *Dendrobium huoshanense*

代号 No.	因素 Factor			多糖浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Content of polysaccharides	水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C			A	B	C	
1	1	1	1	38.451 6	K_1	81.317 2	85.921 1	76.833 3	$T = 195.195 2$
2	1	2	2	23.930 1	K_2	62.233 0	56.408 5	62.286 7	
3	1	3	3	18.935 5	K_3	51.645 0	52.865 6	56.075 2	
4	2	1	2	25.663 1	$K_{1\text{平均}}$	27.105 7	28.640 4	25.611 1	
5	2	2	3	15.333 3	$K_{2\text{平均}}$	20.744 3	18.802 8	20.762 2	
6	2	3	1	21.236 6	$K_{3\text{平均}}$	17.215 0	17.621 9	18.691 7	
7	3	1	3	21.806 4	R	9.890 7	11.018 5	6.919 4	
8	3	2	1	17.145 1	优水平	A_1	B_1	C_1	
9	3	3	2	12.693 5					

2.2 石斛多糖含量调控的分析

2.2.1 水杨酸(SA)对霍山石斛多糖含量的影响

培养基中添加浓度为 0.2 mg/L 的水杨酸经过 30 d 培养后,对试管苗石斛多糖含量有明显促进作用,与对照相比增加了 23.60%。随着水杨酸浓度的增加,石斛多糖的含量逐渐下降,5.0 mg/L 的水杨酸处理与对照基本持平。方差分析发现, $F_{0.05} < F < F_{0.1}$,表明添加不同浓度的水杨酸对霍山石斛多糖的含量具有显著影响(图 1A)。

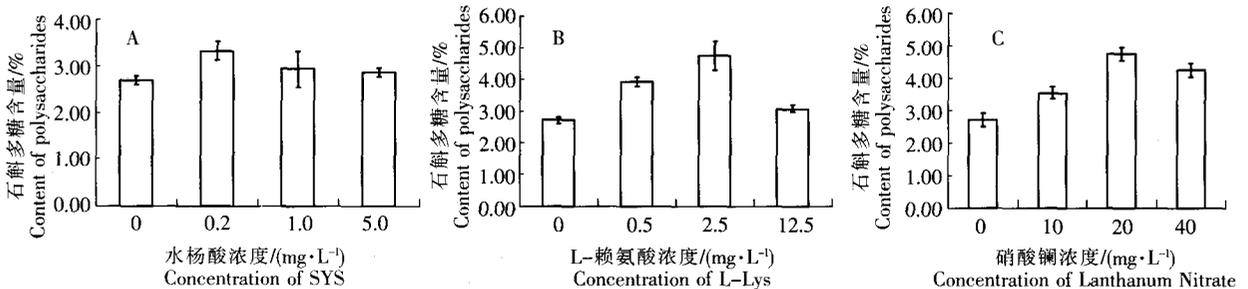


图 1 不同调节物对霍山石斛试管苗石斛多糖含量的影响

Fig. 1 Effect of different regulators on content of polysaccharides in *D. huoshanense* under tissue culture condition

2.2.2 L-赖氨酸(L-Lys)对霍山石斛多糖含量的影响

培养基中添加浓度为 0.5 ~ 12.5 mg/L 的 L-赖氨酸对石斛多糖含量均有不同程度的促进作用,其中 2.5 mg/L 的 L-赖氨酸促进作用最强,与对照相比增加 77.11%。通过方差分析发现, $F > F_{0.1}$,表明添加不同浓度的 L-赖氨酸对霍山石斛多糖的含量具有极显著的影响(图 1B)。

2.2.3 稀土镧对霍山石斛多糖含量的影响

培养基中添加浓度分别为 10 ~ 40 mg/L 的硝酸镧稀土对试管苗石斛多糖含量均有不同程度的促进作用(图 1C),其中 20 mg/L 的硝酸镧处理石斛多糖的含量达到最高,相比对照增加了 76.33%。通过方差分析发现, $F > F_{0.1}$,表明添加不同浓度的硝酸镧对霍山石斛多糖的含量具有极显著影响。

3 讨论

(1)影响石斛多糖提取的因素较多,相关的研究中关于材料的粉碎度、加水量、提取温度、pH、提取时间及次数等方面的研究多有报道^[11-14]。该试验针对材料预处理纯化过程中溶剂对石斛多糖提取的影响作用,并参考多糖纯化常用的有机溶剂石油醚(脱脂、去色素、使水解酶变性)、80%乙醇(去除单糖和低聚糖),在预试验基础上设置正交试验,尝试探讨加液量对石斛多糖提取的影响及其优化组合。结果显示石油醚量、80%乙醇量均对石斛多糖提取产生显著影响,加液量过多或过少均不利于多糖提取,加液量过少使样品脱脂和醇溶性糖不完全,会导致多糖提取含量偏低^[15],而加液量过多则可能导致多糖损失增加,可见石斛成分中非糖分子对多糖提取含量有较大影响,影响的具体机制还有待进一步研究。该研究结果为霍山石斛多糖提取纯化过程中工艺条件优化的研究提供参考。

(2)已有研究表明,稀土元素对植物的生长发育、代谢等均有显著调节作用^[8],稀土在药用植物细胞和组织培养中已有不少的应用^[17],但对石斛多糖影响作用的报道仅见以铁皮石斛为试材的研究,其结果表明培养基中添加适当浓度的镧稀土最高可使石斛多糖含量增加75.7%^[18],该研究结果显示20 mg/L的硝酸镧处理可提高石斛多糖含量76.33%,且与对照相比差异显著。可见,镧稀土在提高石斛多糖含量方面的明显作用,不仅对霍山石斛和铁皮石斛有效,对其他石斛类可能也具有普遍性。稀土的作用可能与其提高植物光合能力、促进碳水化合物合成及提高有关代谢酶活性有关。由于稀土在促进霍山石斛试管苗生长、增殖方面也有较强的作用^[8,19],加之成本低、用量少、稳定和施用方便等特点,因而在霍山石斛开发利用方面将具有较高的应用价值,同时对其他石斛类资源的开发利用也具有较强的参考应用意义。

(3)水杨酸作为抗性信号分子能在一定程度上提高药用植物的次生代谢产物^[20-21],L-赖氨酸作为生物碱合成前体物之一能促进生物碱的合成^[22],水杨酸的作用可能与糖代谢过程有关酶活性的调节有关,张玉研究表明水杨酸能调节猕猴桃果实成熟过程中蔗糖磷酸合成酶(SPS)、酸性转化酶(AI)和淀粉酶等活性^[23],其机制尚待进一步研究。至于赖氨酸对石斛多糖的促进机理也有待探讨,陆仕华等曾报道4种氨基酸(精氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、天冬氨酸)对石刁柏愈伤组织生长和多糖含量的影响,发现4种氨基酸对多糖含量均有促进作用^[24],但对其机制未作进一步分析。该研究结果表明适当浓度的水杨酸和L-赖氨酸均能有效提高霍山石斛试管苗多糖含量,但对于水杨酸的最适浓度还有待进一步探索。

[参 考 文 献]

- [1] 丁亚平,杨道麟,吴庆生,等.安徽霍山三种石斛总生物碱的测定及其分布规律研究[J].安徽农业大学学报,1994,21(4):503-506.
- [2] 吴庆生,杨道麟,徐云鹏,等.中药霍山石斛的微量元素分析及TE图谱鉴定[J].微量元素与健康研究,1995,2(1):31-32.
- [3] 顾慧芬,忻晓君,周文婷,等.铁皮石斛试管苗快速生长与栽培研究及多糖含量测定[J].中成药,1999,21(12):658-659.
- [4] 魏明,姜绍通,罗建平.霍山石斛类原球茎在气升式反应器中补料培养合成多糖[J].过程工程学报,2007,7(2):375-379.
- [5] 刘咏,罗建平.霍山石斛原球茎液体培养条件的优化[J].食品科学,2005,26(9):84-87.
- [6] 查学强,罗建平,姜绍通.悬浮培养霍山石斛原球茎合成活性多糖的研究[J].食品科学,2005,26(4):41-44.
- [7] 姜绍通,魏明,罗建平.磷对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长和多糖合成的影响[J].生物工程学报,2006,22(4):613-618.
- [8] 谢寅峰,徐丽,王莹.霍山石斛组培丛生芽诱导增殖及生根技术[J].林业科技开发,2007,21(6):72-74.
- [9] 张静,刘平,蔡利.中药甘草水溶性多糖的提取与测定[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2005,33(2):65-68.
- [10] 张西玉.三种川产人工栽培石斛的多糖含量测定[J].乐山师范学院学报,2004,19(5):88-89.
- [11] 倪立坚,蒋小平,陈东红.石斛中石斛多糖提取工艺的优选[J].中药与天然药物,2004,12(4):41-42.
- [12] 钱叶,吕不望.石斛中石斛多糖的提取工艺研究[J].中国现代应用药学杂志,2005,22(4):293-294.
- [13] 朱晓霞,罗学刚.多糖提取与纯化技术应用进展[J].食品研究与开发,2007,28(3):186-189.
- [14] 黄森,查学强,罗建平,等.Box-Behnken法优化提取霍山石斛活性多糖的研究[J].中药材,2007,30(5):591-594.
- [15] 熊丽萍,万屏南,袁友泉.几种石斛多糖的提取分离及其抗氧化性能研究[J].江西中医学院学报,2006,18(4):55-56.
- [16] 何跃君,薛立.稀土元素对植物的生物效应及其作用机理[J].应用生态学报,2005,16(10):1893-1889.
- [17] 袁晓凡,赵兵,王玉春.稀土元素在药用植物细胞和组织培养中的应用[J].植物学通报,2005,22(1):115-120.
- [18] 周伟,沈亚芳,刘材材,等.稀土微肥对铁皮石斛试管苗壮苗的影响[J].中草药,2006,37(11):1719-1723.
- [19] 刘石泉,钟桐生,赵新民,等.稀土元素对霍山石斛试管苗生长的影响[J].生物技术,2008,18(3):72-74.
- [20] 尹玲莉,侯晓杰.植物抗性信号分子——水杨酸研究进展[J].中国农学通报,2007,23(1):338-342.
- [21] Verpoorte R, van der Heijden R, Hoopen H J G, et al. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21:467-479.
- [22] Hemscheidt T, Spenser I D. Biosynthesis of anosmine: incorporation of intact six-carbon chain of lysine and of piperolic acid[J]. J Nat Prod, 1993, 56(8):1281-1286.
- [23] 张玉.水杨酸对采后猕猴桃果实成熟衰老的调控及其机理研究[D].杭州:浙江大学,2004.
- [24] 陆仕华,蒋琳,周正来.维生素氨基酸对石刁柏愈伤组织生长和多糖含量的影响[J].上海农业学报,1995,11(1):87-90.

(责任编辑 郑瑛焱)