

丹參毛狀根培養建立與其丹參酮產量之研究¹

陳威臣² 詹効松⁴ 李秋儀² 曹進義² 劉禎祺³ 李艷琪³ 夏奇鈺^{2,5}

摘 要

陳威臣、詹効松、李秋儀、曹進義、劉禎祺、李艷琪、夏奇鈺。2008。丹參毛狀根培養建立與其丹參酮含量之研究。台灣農業研究 57:305–316。

本研究以丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 無菌瓶苗葉片經農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*, R1601) 感染所得之毛狀根為材料，測試毛狀根接種部位、接種量及培養時間在液態培養系統中，對於生質量與其丹參酮類 (tanshinones) 含量之影響。分別以固態與液態培養根尖與根段培植體之試驗結果顯示，根尖培植體於液態培養條件下有較高生質量與丹參酮類含量。毛狀根接種量試驗以每 20 mL 培養液接種 5–20 條根尖培植體，結果顯示當培養達 8 週時，10 至 20 根尖處理組間之乾重與丹參酮類含量的差異並不顯著，其中以 10 根尖處理效果較佳。毛狀根之錐形瓶液態時序培養結果顯示，培養液中蔗糖與氨態氮含量於培養第 3 週時分別降至初始濃度之 9% 與 10%，此時毛狀根乾重累積有減緩之現象，推測蔗糖與氨態氮可能為丹參毛狀根生長限制因子。丹參毛狀根在培養 6 週後可達最高乾重約為 5.8 g L⁻¹，此時收穫之毛狀根與培養液經高效液相層析法 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析毛狀根與培養液之結果顯示，其三種主要丹參酮類產量僅約 11.4 mg L⁻¹；若繼續培養至第 8 週則丹參酮類產量可達約 64 mg L⁻¹。

關鍵詞：丹參、時序培養、氮源、蔗糖、二次代謝物。

前 言

丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 為唇形科 (Labiatae) 鼠尾草屬 (*Salvia*) 多年生草本植物，其乾燥根具有活血化瘀之功效，列為神農本草經上品，是治療心血管疾病的之重要中藥。丹參藥效成分主要包括脂溶性二萜類 (diterpenoids) 之丹參酮 I (tanshinone I; Tan I)、丹參酮 II A (tanshinone II A; Tan II A) 及隱丹參酮 (cryptotanshinone; Crypto)，以及水溶性之酚酸類 (phenolic acid) 之丹參

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2339 號。接受日期：97 年 11 月 21 日。
2. 本所生技組助理研究員、計畫助理、聘用人員與副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 本所農化組助理研究員與助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 朝陽科技大學生化科技所助理教授。台灣 台中縣 霧峰鄉。
5. 通訊作者，電子郵件：cnhsia@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04) 23302806。

素 (Salvianic acid A)、丹酚酸 A (salvianolic acid A) 與丹酚酸 B (salvianolic acid B) 等 (Hu *et al.* 2005; Li *et al.* 2002)；現代藥理研究證實丹參具有保護心肌缺血及缺氧、改善微循環、抑制血小板聚集和血栓形成及抗菌消炎等作用，尤其對於冠心病與心絞痛具有良好的療效 (Hu *et al.* 1999; Park *et al.* 1999)。此外，Wu *et al.* (1998) 亦指出丹參具有抗氧化、降膽固醇和預防動脈硬化效果，其臨床治療上的潛能不容忽視。目前丹參市場所需藥材皆來自中國，因人為大量採挖已造成丹參野生資源逐漸減少，近年來已積極進行丹參栽培，然各地藥材品質參差不齊，更有偽劣品充斥市場的現象 (Guo *et al.* 2002)。此外，近來植物藥材在美國、印度與巴西均被檢驗出有重金屬污染與農藥殘毒等問題 (Saper *et al.* 2004; Caldas & Machado 2004)。各國政府因而紛紛針對植物藥材製品實施層層把關，以維護全球數百萬人使用植物藥材製品的安全性。

利用植物組織、細胞與器官培養方式可直接獲取培養物之有效活性成分，具有不受天候影響、提高二次代謝物產率與縮短培養週期等諸多優點，具有商業開發之潛力與價值 (Kim *et al.* 2002; Nalawade *et al.* 2003)。植物細胞商業化生產二次代謝物雖可行但成功案例並不多，主要遭遇的困難為培養植物細胞或組織之遺傳穩定性及其二次代謝物生產之調控，故如何建立一個穩定的植物細胞/組織培養系統，並藉由代謝調控的方式增加二次代謝物的產率，乃為商業化生產的首要步驟 (Roberts & Shuler 1997; Zhong 2001)。相較於一般懸浮細胞培養系統，毛狀根培養應用於二次代謝物生產具有高穩定性、高產率及其二次代謝物含量超過原植株等優點 (Hamill & Lidgett 1997; Wielanek & Urbanek 1999)。目前丹參毛狀根培養已有數篇報告 (Chen *et al.* 2001; Ge & Wu 2005; Yan *et al.* 2005, 2006)，本研究室已建立其固態培養系統 (Lin 2005)，然對於將來大量繁殖所需的眾多參數卻未有相關報導，因此值得探討丹參毛狀根液態培養下參數與其丹參酮產量之關係，以作為後續大量培養丹參毛狀根生產丹參酮之重要參考依據。本研究由比較丹參毛狀根最適培養基型式、接種部位與接種量的差異，藉以提高其生長效率與穩定性。此外，利用時序培養之因子調查，偵測毛狀根乾重、培養基碳、氮源消耗與丹參酮含量，可進一步瞭解其生長、養分吸收與二次代謝物累積的關係。

材料與方法

本研究利用丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 無菌瓶苗葉片經農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*, R1601) 感染所得之毛狀根為材料 (Lin 2005)，將篩選所得高產之毛狀根系作為試驗材料，切取其根尖 (長約 1.5 cm) 培養於含 3% 蔗糖之 B5 (Gamborg & Miller 1968) 固態培養基，於 25°C、無光照環境中進行培養，繼代培養週期為 4 週。固態培養係於加入凝膠物質 (Difco Bacto-agar) 前以 0.1–1 N NaOH 及 HCl 將 pH 值調至 5.7 ± 0.1 ，液態培養則不添加凝膠物質，而 pH 值調至 5.2 ± 0.1 ，培養基以 121°C、15 lb in⁻² (1.05 kg cm⁻²) 進行高溫高壓滅菌 15 min 後冷卻備用。固態培養係於毛狀根接種後置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 恆溫、黑暗環境靜置培養；液態培養則是於毛狀根接種後 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 恆溫、黑暗環境、轉速 80 rpm 之水平迴轉震盪器進行試驗。

利用固態培養 2 週之毛狀根根尖與根段作為培植體，接種於固態與液態培養基比較其生長狀況，培養 8 週後稱其乾重；液態培養以每瓶接種 5 個根尖或根段，每處理 3 瓶為 1 重複，進行 3 重複。固態培養處理為內含 20 mL 培養基之塑膠培養皿 (90 mm × 15 mm, α plus, 台灣)，每處理

3 培養皿為 1 重複，進行 3 重複試驗。最佳接種量試驗係切取生長狀態良好之毛狀根尖（長約 1.5–2 cm），分別接種 5、10、15、20 條根尖於內含 20 mL 培養液之 125-mL 三角錐瓶進行試驗，培養 8 週後稱其乾重；每處理 3 瓶為 1 重複，進行 3 重複。生長時序觀測係切取 10 條毛狀根根尖（約 0.03 g 鮮重）接種於內含 20 mL 液態培養基之 125-mL 錐形瓶中進行培養，培養過程中每週取樣 3 瓶進行調查分析，項目包括毛狀根之乾重、培養液 pH 值、培養液中碳、氮源濃度以及毛狀根與培養液中內含之丹參酮類含量等。

毛狀根乾重調查係將毛狀根以濾紙將其表面水分吸乾後，置於 45–50°C 烘箱中乾燥兩天，所得重量即為乾重。烘乾之毛狀根以適量萃取溶劑 [二氯甲烷 (dichloromethane)：甲醇 (methanol) = 1：4] 進行研磨萃取，經超音波震盪 20 min 後收集濾液，殘渣再加適量萃取溶劑再萃取 1 次。合併所得濾液並以真空減壓濃縮機 (EYELA, 日本) 濃縮至乾，利用甲醇定容後以 0.45 μm 濾膜 (Millipore, 日本) 過濾，以 HPLC 法檢測丹參酮類之含量 (修改自 Chen *et al.* 2005)。利用液-液萃取法分析培養液中丹參酮類含量，方法為吸取適量培養液置於分液漏斗中，並加入同體積之乙酸乙酯 (Ethyl acetate)，經劇烈震盪後靜置至分層，取出有機層，隨後再以適量正己烷 (n-Hexane) 重複上述步驟；合併所得有機層以真空減壓濃縮機濃縮至乾，利用甲醇定容後以 0.45 μm 濾膜過濾以供 HPLC 法檢測丹參酮類含量之用 (修改自 Chen & Chen 1999)。上述萃取分析所使用之溶劑，均使用 Merck (美國) 公司 LC 級試劑。

HPLC 法採用美商沃特斯公司相關儀器設備與軟體介面 (Waters, 美國)；層析管柱為 RP-18, LiChroCART® 250-4 (5 μm , 4.6 × 250 mm) (Merck, 美國)。在 30°C 控溫條件下，以 Methanol：Tetrahydrofuran：Glacial Acetic Acid：H₂O = 18：35：1：46 (v/v) 為移動相 (Merck, 美國)，流速 1 mL min⁻¹，檢測波長為 254 nm 進行丹參酮類含量分析 (修改自 Chen *et al.* 2005)。丹參酮 I (Tan I)、丹參酮 II A (Tan II A) 與隱丹參酮 (Crypto) (九鼎生技, 台灣) 之標準溶液配製濃度為 100、80、60、40 及 20 mg L⁻¹，在上述的層析條件下每次注射 10 μL 進行測定，每個濃度重複 3 次，以求得線性迴歸方程式。丹參毛狀根及其培養液等樣品分別注射 10 μL 濾液、重複注射 3 次，依所得線性迴歸方程式推算各樣品中 Tan I、Tan II A 及 Crypto 含量。

培養液中蔗糖與葡萄糖濃度利用醣類快速分析儀 (YSI 2700 SELECT biochemistry analyzer, Yellow Springs, 美國) 進行測試，儀器搭配蔗糖 (YSI 2703 membrane kit) 與葡萄糖 (YSI 2365 membrane kit) 酵素膜進行分析，取培養液 2 mL 經離心 (8000 rpm) 後，取上清液進行檢測。培養液中氨態氮 (ammonia nitrogen) 與硝酸態氮 (nitrate nitrogen) 分析係利用氮素自動分析儀 (Nitrogen Auto-analyzer, ALPKEM, 美國) 進行偵測 (EPA-600/4-79-020 1984)。培養液中的硝酸態氮與氨態氮濃度係以硝酸鉀 (KNO₃, 濃度 0–10 ppm) 與硫酸銨 [(NH₄)₂SO₄, 濃度 0–100 ppm] 作為標準品，樣品分析時各取培養液 1 mL 經離心 (8000 rpm) 取上清液稀釋定量後，依上述方法進行檢測。

培養試驗中所得毛狀根之乾重、丹參酮含量，培養基之 pH 值、醣類及氮源含量與培養液中丹參酮濃度變化，取樣自同批培養之 3 個錐形瓶之毛狀根與培養液，並計算其平均值與標準偏差。試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析，若處理間差異顯著 ($p < 0.05$)，則利用 Least significant difference test (LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結 果

根尖與根段培植體培養對毛狀根生長與其丹參酮類含量之影響

利用毛狀根根尖與根段作為培植體，分別以固態與液態培養 8 週後結果列於表 1，根尖與根段培植體在液態培養，分別可獲得毛狀根乾重為 3.5 g L⁻¹ 與 3.6 g L⁻¹，較固態培養之根間與根段乾重 2.3 g L⁻¹ 與 2.5 g L⁻¹ 為高，根尖或根段培植體在同一型態培養基中之生質量差異並不顯著。當毛狀根培養達 8 週時，利用 HPLC 法分析其丹參酮類含量結果顯示，根尖與根段培植體在液態培養可獲得丹參酮類 (Tan I + Tan II A + Crypto) 含量分別為 8.12 mg g⁻¹ 與 5.43 mg g⁻¹，較固態培養所得之丹參酮類含量分別為 2.10 mg g⁻¹ 與 3.61 mg g⁻¹ 為高。就總產量而言，根尖培植體在液態培養可獲得丹參酮類產量 (生質量 × 含量) 為 28.13 mg L⁻¹，較根段培植體處理之 19.81 mg L⁻¹ 為高。

毛狀根接種量對毛狀根生長與丹參酮類含量之影響

利用接種不同數目之毛狀根根尖測試錐形瓶培養最佳接種量，經過 4 週的培養後接種量高於 15 根尖試驗組間 (15 與 20 根尖) 的鮮重已無顯著變化，毛狀根乾重已達約 6.97–7.97 g L⁻¹，顯著高於 4.60 g L⁻¹ 之 10 根尖處理組與 2.43 g L⁻¹ 之 5 根尖處理組 (圖 1)。繼續培養達 8 週時，10 至 20 根尖處理組之毛狀根鮮重已達約 9.83–10.22 g L⁻¹，處理組間差異並不顯著，但顯著高於 6.93 g L⁻¹ 之 5 根尖處理組。利用 HPLC 法分析培養達 8 週之毛狀根丹參酮類 (Tan I + Tan II A + Crypto) 含量結果顯示，10–20 根尖處理組可獲得約 14.72–14.89 mg L⁻¹ 丹參酮類，較高於 5 根尖處理組之 10.57 mg L⁻¹ (圖 1)。

影響毛狀根液態時序培養生長因子之調查

毛狀根於錐形瓶液態培養 10 週其鮮、乾重累積情形如圖 2A 所示，毛狀根培養初期生長較緩慢，但於培養 1 週後觀察到毛狀根之側根迅速增長，而後在第 2 週開始進入對數生長期 (exponential

表 1. 根尖與根段培植體於固態或液態培養對丹參毛狀根生長與丹參酮類含量之差異性比較

Table 1. Comparison of root tips and tip-free root segments of *Salvia miltiorrhiza* as inoculum on root growth and tanshinones production in liquid or solid culture^z

Treatment	Root biomass (g dw. L ⁻¹)	Tanshinones (mg g ⁻¹)			SUM
		Crypto ^x	Tan I ^x	Tan II A ^x	
Solid culture					
root-tip	4.76 ± 0.08 c ^y	1.14 ± 0.005 d	0.54 ± 0.013 d	0.42 ± 0.001 d	2.10 ± 0.008 d
root-segment	5.08 ± 0.03 b	1.96 ± 0.003 c	0.79 ± 0.004 c	0.86 ± 0 c	3.61 ± 0.002 c
Liquid culture					
root-tip	7.04 ± 0.07 a	2.48 ± 0.029 a	2.16 ± 0.054 a	2.18 ± 0.018 a	6.82 ± 0.102 a
root-segment	7.36 ± 0.09 a	2.11 ± 0.020 b	1.79 ± 0.054 b	1.53 ± 0.024 b	5.43 ± 0.049 b

^z Liquid cultures (5 explants/20 mL B5 medium/flask) were placed on a shaker (80 rpm) for 8 weeks, 9 flasks/treatment. Solid culture (5 explants/20 mL B5 medium/Petri dish) were incubated at 25 ± 1°C in dark for 8 weeks, 9 dishes/treatment.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

^x Crypto = Cryptotanshinone, Tan I = tanshinone I, and Tan II A = tanshinone II A

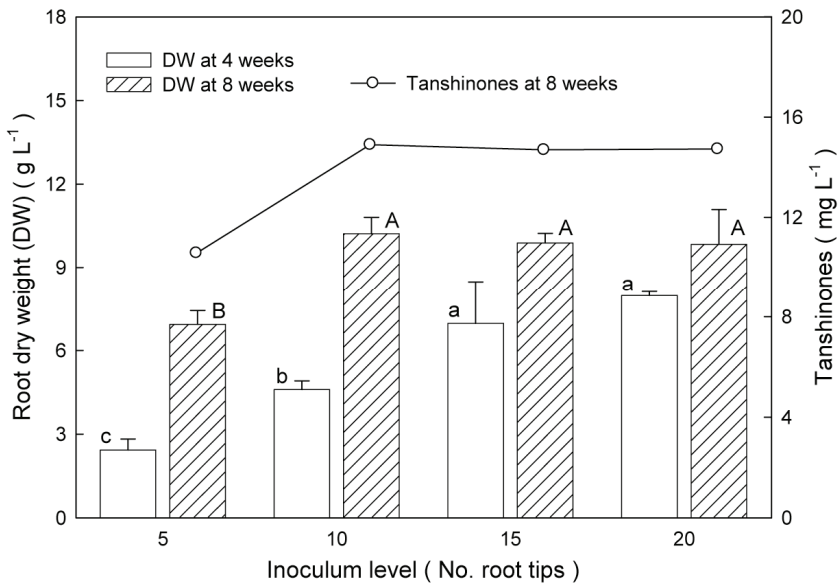


圖 1. 不同丹參毛狀根根尖接種數量對毛狀根生長與丹參酮類產量之差異性比較。

Fig. 1. Comparison of number of root tips of *Salvia miltiorrhiza* inoculated in B5 liquid medium on root growth and tanshinones production. Hairy root cultures (5, 10, 15, or 20 root tips/20 mL B5 medium/flask), were placed on a shaker (80 rpm) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark for 4 and 8 weeks to determine root biomass and for 8 weeks to determine tanshinones (sum of Cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone II A) production. The columns with same shade followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by LSD test.

phase)。在培養第 3 週後之毛狀根乾重增加趨勢減緩，於培養第 6 週時可達毛狀根最高乾重為 5.8 g L^{-1} 。計算毛狀根乾重增加速率之變化得知，毛狀根於培養第 3 週後之乾重增加速率已開始下降（資料未列），此時毛狀根生長狀態應屬於對數生長期的末期。

在時序培養過程中同時分析培養液中氮源 (NH_4^+ 與 NO_3^-)、碳源（蔗糖與葡萄糖）之濃度變化，結果顯示培養第 3 週時培養液中 NH_4^+ 濃度已降至初始濃度之 10%，而 NO_3^- 濃度於培養過程中持續下降至培養第 6 週之生長停止期後，即呈現穩定的狀況（圖 2B）。培養液中蔗糖與葡萄糖濃度隨之變化如圖 2C 顯示，蔗糖濃度隨毛狀根生長而快速下降，於培養第 3 週時之蔗糖濃度僅為初始濃度之 13%；然而培養液中葡萄糖濃度在培養初期會隨著毛狀根生長而緩緩增加，在蔗糖濃度最低時（培養第 3 週），此時葡萄糖濃度上升至最高點約為 1.72%，而後則穩定下降至培養第 10 週之 0.63%。培養液之 pH 值變化（圖 2D）在培養初期與對數生長期時，其值會隨毛狀根生長而下降至培養第 1 週之最低點（pH 4.4），而後隨即上升至 pH 4.9（培養第 3 週），其後維持在 4.8 與 4.9 間直至培養 10 週試驗終止。

毛狀根於錐形瓶液態培養下丹參酮的累積情形如圖 3 所示，毛狀根丹參酮的濃度在其生長進入定常期（培養第 7 週）後開始大量累積，此時毛狀根丹參酮產量約為 15.8 mg L^{-1} ，而培養第 8 週時，培養所得毛狀根之丹參酮產量可達 54.1 mg L^{-1} 。此外，在錐形瓶培養過程中可發現培養液隨著培養

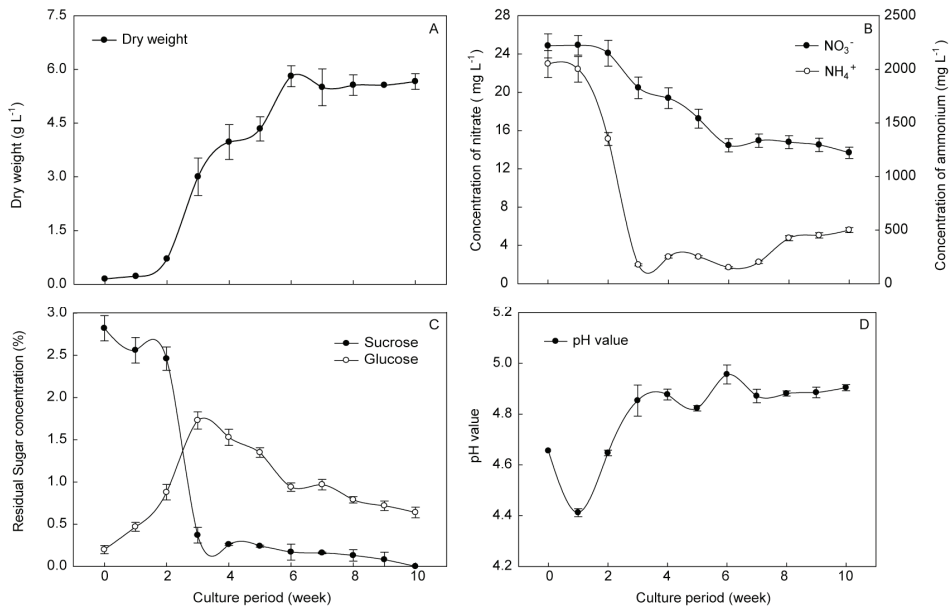


圖 2. 丹參毛狀根液態時序培養及其影響因子調查。毛狀根於 B5 液態培養基培養 10 週期間之 (A) 乾重；(B) 培養液中氨態氮與硝酸態氮；(C) 培養液中蔗糖與葡萄糖及 (D) 培養液 pH 值的變化。

Fig. 2. Time-course study on factors affecting hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*: (A) root dry weight, (B) concentration of ammonium and nitrate in culture medium, (C) concentration of sucrose and glucose in culture medium, and (D) pH value of medium. Hairy root cultures, (10 root tips/20 mL B5 medium/flask), were placed on a shaker (80 rpm) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark for 10 weeks.

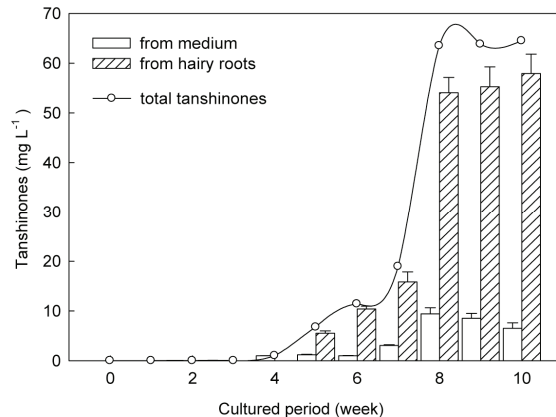


圖 3. 丹參毛狀根於 B5 液態培養基培養 10 週期間之丹參酮類產量時序變化，丹參酮類分別萃取自毛狀根及培養液。

Fig. 3. Time-course study on tanshinones production of *Salvia miltiorrhiza* in liquid cultures. Tanshinones were extracted from hairy roots and culture medium of the cultures (10 root tips/20 mL B5 medium/flask), placed on a shaker (80 rpm) and incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark for 0, 2, 4, 6, 8, and 10 weeks.

時間增加而漸呈紅褐色 (圖 4)，推測係培養過程中部分毛狀根之丹參酮外泌至培養液造成。利用液-液萃取方式分析培養液中丹參酮含量結果顯示，培養液中丹參酮量約為總丹參酮量的 10–20%，在培養第 10 週時培養液中丹參酮量可達約 6.5 mg L^{-1} ，此時每升培養之毛狀根與培養液丹參酮產量可達約 64.5 mg。

討 論

Hitaka *et al.* (2000) 於紅甜菜 (red beet, *Beta vulgaris* L. 'Detroit dark red') 毛狀根培養研究中指出，毛狀根之增生現象係藉由毛狀根延長 (elongation) 與側根形成等兩種機制所造成，而毛狀根所能生長之部位為根尖 (root tip meristem) 部位，隨著毛狀根之延長及側根形成，可快速生長並累積生質量達到高密度培養。本研究結果並顯示，於毛狀根根段在接種後需經 1 週培養才會陸續長出側

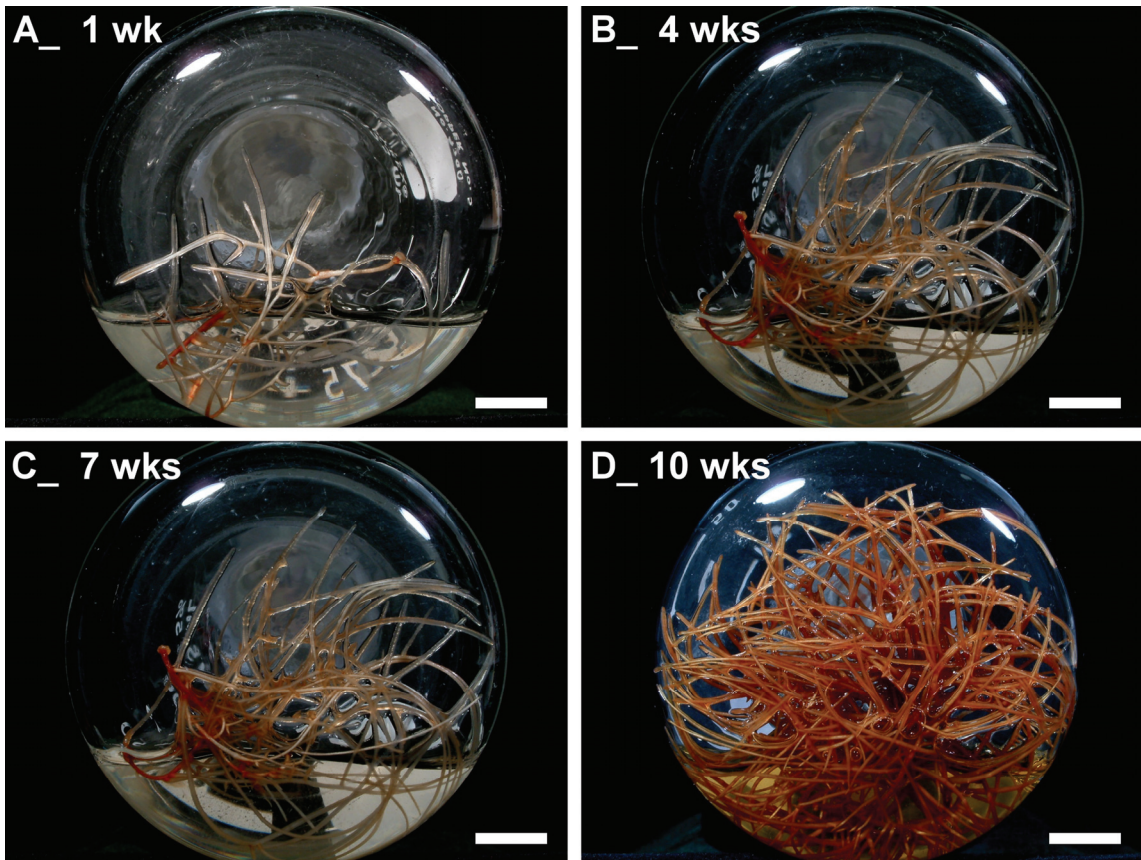


圖 4. 丹參毛狀根於 B5 液態培養基培養 10 週期間之生長及顏色變化情形。

Fig. 4. Growth and color of hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* in B5 medium for 1 (A), 4 (B), 7 (C), and 10 weeks (D). Hairy root cultures (10 root tips/20 mL B5 medium/flask), were placed on a shaker (80 rpm) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark for 1, 4, 7, and 10 weeks. Bar = 1 cm.

根，進而開始生長，顯示若在培養初期能直接接種根尖培植體，則可縮短毛狀根生長的適應期並可節省時間成本。此外，試驗結果亦顯示根尖培植體於液態培養中不僅生長狀況穩定，且可獲得較高之生質量與丹參酮類含量，因此後續試驗均以根尖培植體於液態培養條件下進行試驗。在眾多毛狀根培養文獻中少有針對毛狀根培植體的條件進行探討，然毛狀根之接種量，長度與根齡等因子之差異均會影響培養結果 (Mano *et al.* 1986; Sharp & Doran 1990)。丹參毛狀根培養試驗多以 0.3 g 鮮重培養於 40–50 mL 液態培養基的接種量進行試驗 (Chen *et al.* 2001; Yan *et al.* 2005, 2006)。本研究試驗結果顯示，利用鮮重僅 0.03 g 之 10 條丹參毛狀根尖，培養於含有 20 mL 之 125-mL 錐形瓶中進行試驗，此方式較其他高接種量處理所得之毛狀根的生長較穩定且均一，可做為後續丹參毛狀根培養基本條件。Han *et al.* (2004) 指出，利用毛狀根培養大量生產具經濟價值之二次代謝物系統，需要配合有效的擴大培養規模，以及後續產品純化與回收等流程，以達到經濟上的成本考量。然而，若依本研究試驗結果顯示，低接種量之培養效果雖較其他處理佳，但若後續丹參毛狀根大規模培養需有大量根尖時，則有其操作施行上仍有待進一步探討克服此困難。

Huang & Chou (2006) 於藜豆毛狀根培養系統中，評估毛狀根生長過程中主要培養參數 (如 pH、碳源消耗、導電度、氮源濃度及生長速率) 間的關係，藉以探討促進毛根生長與二次代謝物產量之適當操作策略。本研究為尋求毛狀根培養所需之重要參數，建立提高丹參毛狀根生質量與丹參酮產量的培養策略，因此藉由錐形瓶液態培養方式進行毛狀根時序培養之因子調查，以瞭解毛狀根於液態培養中生長、養份吸收與二次代謝物的累積情形。針對丹參毛狀根生長而言，本研究鮮重約 0.03 g 之毛狀根於培養 6 週後可獲得最大的乾重為 5.8 g L⁻¹；然而，其他丹參毛狀根培養研究結果則顯示，其乾重分別為 14 g L⁻¹ (接種量約 0.3 g fw. 40 mL⁻¹、培養 5 週) (Yan *et al.* 2005)、6 g L⁻¹ (接種量約 0.3 g fw. 40 mL⁻¹、培養 3 週) (Yan *et al.* 2006) 與 4 g L⁻¹ (接種量約 0.3 g fw. 50 mL⁻¹、培養 4 週) (Chen *et al.* 2001)，若考量最初之接種量差異達 10 倍而言，則顯示本研究之毛狀根生長效率顯著高於其他研究。若與其他毛狀根培養研究進行比較，顯著高於葫蘆巴 (*Trigonella foenum-graecum*) (Fernando *et al.* 2001) 毛狀根培養之 13 g L⁻¹ (接種量約 0.1–0.2 g fw. 40 mL⁻¹、培養 5 週)，但低於藜豆 (*Stizolobium hassjoo*) (Huang & Chou 2006) 毛狀根培養之 8.2 g L⁻¹ (接種量約 0.006 g fw. 50 mL⁻¹、培養 3 週)；此外，本研究丹參毛狀根乾重累積至 6 週時達最大量，而後則不再累積乾重。因此本文作者推測，此毛狀根乾重累積的差異，除植物種類間毛狀根生長特性不同外，培養基養分不足是造成此差異的原因之一。

毛狀根液態培養系統中，除了其本身生長特性之因素會影響生質量外，培養基組成中碳源及氮源對於毛狀根生長影響亦甚鉅。Huang & Chou (2006) 於藜豆毛狀根培養研究，在培養後期於培養液中分別添加原始濃度 1.5 倍硝酸鉀 (KNO₃) 與原始濃度 1.5 倍硫酸銨 [(NH₄)₂SO₄]，可增加其生質量達 16%與 28%，此結果顯示藜豆毛狀根生長受培養基氮源影響甚鉅。Shin *et al.* (2003) 利用紅甜菜毛狀根培養結果顯示，培養液中蔗糖濃度隨著紅甜菜毛狀根的生長而迅速下降，當培養液中蔗糖消耗殆盡時，毛狀根的生長則受到阻抑。根據本研究時序培養之相關數據顯示，丹參毛狀根生長於第 2 週後進入對數生長期 (圖 2A)，並於培養後第 6 週進入定常期 (stationary phase)，與一般細胞培養三個階段之生長曲線相符。在培養過程中分析培養液中氮源 (NO₃⁻與 NH₄⁺) (圖 2B) 及碳源 (蔗糖與葡萄糖) (圖 2C) 濃度變化得知，NH₄⁺與蔗糖濃度於培養後第 3 週時已幾乎消耗殆盡，毛狀根開始以葡萄糖為其主要碳源，致使葡萄糖濃度持續下降，此時毛狀根之生長速率已開始減

緩，推測其原因可能與培養液中碳、氮源之養分受限有關。Shin *et al.* (2003) 研究指出，培養基初期的酸化現象 (acidification) 是 NH_4^+ 的消耗所致，而培養基酸化後之再鹼化作用，與培養液中 NH_4^+ 和 NO_3^- 被吸收利用的先後順序有關。本研究結果顯示，丹參毛狀根培養第 3 週時培養液中 NO_3^- 尚有約 1350 mg L^{-1} ，而後隨毛狀根之生長而緩速下降，而當毛狀根生長進入定常期 (培養第 6 週) 時， NO_3^- 濃度變化則趨減緩，此現象似乎顯示 NH_4^+ 較 NO_3^- 易被丹參毛狀根所吸收利用。此外，本研究結果顯示培養液的酸化現象於培養的第 1 週內發生，pH 值由 4.7 降至 4.4，隨後又鹼化至 pH 值 4.8 (培養第 3 週)，而後則持續微量變化至培養後期之 pH 4.9 (圖 2D)。

Huang & Chou (2006) 於藜豆毛狀根研究結果指出，毛狀根培養至後期時添加硫酸銨，可促進左旋多巴胺 (L-3,4-二羥基苯氨酸, L-3,4-dihydroxy-phenylalanine, L-DOPA) 的產率。本研究結果顯示，當培養達第 6 週時，分析毛狀根與培養液之結果顯示，其三種主要丹參酮類產量僅約 11.4 mg L^{-1} ，若繼續培養至第 8 週時則每升丹參酮類產量可達約 64 mg，但持續偵測至 10 週時未見其增加。Chen *et al.* (2001) 試驗結果指出，丹參毛狀根經 4 週培養後，其隱丹參酮 (Crypto) 產量僅達 0.04 mg L^{-1} ，顯示此時毛狀根尚未開始累積丹參酮。Yan *et al.* (2005) 研究結果指出，在丹參毛狀根 60 天的培養過程中添加新培養液，可增進期生質量累積，但對於丹參酮含量反而降低，由 $0.56 \text{ mg g}^{-1}\text{dw}$. (30 天) 降至 $0.23 \text{ mg g}^{-1}\text{dw}$. (60 天)。然而，Zhang *et al.* (2004) 研究結果指出，丹參毛狀根培養過程中添加新培養液，對其生質量與丹參酮產量均有促進之效果。Hu & Alfermann (1993) 丹參毛狀根研究指出，當培養至第 12 天時調整蔗糖濃度為起始濃度 (3%) 後，再繼續培養至第 20 天，可有效促進丹參酮類成分累積。此外，Lin (2005) 指出，6%蔗糖處理可獲得最大丹參酮單位含量與產量。因此，培養過程中進行培養基更新，對於丹參毛狀根確有促進之效果，但對於丹參酮累積則需進一步探討。針對丹參毛狀根培養之生質量累積與丹參酮產量間之關係而言，如何利用補充養分以持續提供丹參毛狀根生質量累積，並同時能夠累積二次代謝物的生產方式，將是未來研究探討的重點；此外，許多報告中亦提及添加誘引劑 (elicitors) 之處理，也是增產丹參酮的方法之一，期能在後續研究中尋求提高丹參毛狀根生質量與丹參酮產量的最適培養策略。

誌 謝

本試驗研究承農委會農業生物技術國家型計畫經費補助 (NSC 95-2317-B-055-003、NSC 96-2317-B-055-007)，特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Caldas, E. D. and L. L. Machado. 2004. Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil. *Food Chem. Toxicol.* 42:599–603.
- Chen U. C., J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2007. *In vitro* shoot acclimation and tanshinones analysis of *Salvia miltiorrhiza*. *J. Agric. Res. Taiwan* 56:21–30. (in Chinese with English abstract)
- Chen, H. and F. Chen. 1999. Kinetics of cell growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. *Biotechnol. Lett.* 21:701–705.

- Chen, H., F. Chen, C. K. Francis, C. K. Chiu, and M. Y. Lo. 2001. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme Microb. Technol.* 28:100–105.
- EPA-600/4-79-020. 1984. Nitrogen Ammonia. Methods for Chemical Analysis of Water Wastes. Method 350.1, Storet No. Total 00610, dissolved 00608.
- Fernando, P. L., R. M. Martha, A. C. Carlos, B. Jean-Marie, and C. C. Graciano. 2001. Sotolone production by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* in airlift with mesh bioreactors. *J. Agric. Food Chem.* 49:6012–6019.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151–158.
- Guo, B. L., Y. X. Feng, and Y. J. Zhao. 2002. Review of germplasm resources studies on *Salvia miltiorrhiza*. *China J. Chin. Mater. Med.* 27:492–495. (in Chinese with English abstract)
- Hamill, J. D. and A. J. Lidgett. 1997. Hairy root cultures: Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. p.1-29. *in: Hairy Roots: Culture and Applications.* (Doran, P. M., ed.) Harwood Academic. Australia.
- Han, B., J. C. Linden, N. P. Gujarathi, and S. R. Wickramasinghe. 2004. Population balance approach to modeling hairy root growth. *Biotechnol. Prog.* 20:872–879.
- Hitaka, Y., Y. Takahashi, M. Kino-oka, M. Taya, and S. Tone. 2000. Culture of red beet hairy roots by considering variation in sensitivity of tip meristems to hydraulic stress. *Biochem. Eng. J.* 6:1–6.
- Hu, P., Q. L. Liang, G. A. Luo, Z. Z. Zhao, and Z. H. Jiang. 2005. Multi-component HPLC fingerprinting of radix *Salviae miltiorrhizae* and its LC-MS-MS identification. *Chem. Pharm. Bull.* 53:677–683.
- Hu, Z. B., D. Liu, and A. W. Alfermann. 1999. Genetic transformation of *Salvia miltiorrhiza*. p.249-260. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 45* (Bajaj, Y. P. S., ed.) Transgenic Medical Plants. Springer-Verlag, New York.
- Huang, S. Y. and S. N. Chou. 2006. Elucidation of the effects of nitrogen source on proliferation of transformed hairy roots and secondary metabolite productivity in a mist trickling reactor by redox potential measurement. *Enzyme Microb. Technol.* 38:803–813.
- Kim, Y. J., B. E. Wyslouzil, and P. J. Weathers. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:1–10.
- Li, H. B., J. P. Lai, Y. Jiang, and F. Chen. 2002. Preparative isolation and purification of salvianolic acid B from the Chinese medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 943:235–239.

- Lin, J. F. 2005. Development of Hairy Root Transformation System and its Secondary Metabolites Production of *Salvia miltiorrhiza*. Thesis of National Chung Hsing Univ. Taichung, Taiwan. 76 pp. (in Chinese with English abstract)
- Mano, Y., S. Nobeshima, C. Matsui, and H. Ohkama. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy roots cultures of *Coptis japonica*. *Agric. Biol. Chem.* 50:2715–2722.
- Nalawade, S. M., A. P. Sagare, C. Y. Lee, C. L. Kao, and H. S. Tsay. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44:79–98.
- Park, S., J. S. Song, D. K. Lee, and C. H. Yang. 1999. Suppression of AP-1 activity by tanshinone and cancer cell growth inhibition. *Bull. Korean Chem. Soc.* 20:925–928.
- Roberts, S. C. and M. L. Shuler. 1997. Large-scale plant cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:154–159.
- Saper, R. B., S. N. Kales, J. Paquin, M. J. Burns, D. M. Eisenberg, R. B. Davis, and R. S. Phillips. 2004. Heavy metal content of ayurvedic herbal medicine products. *J. Am. Med. Assoc.* 292:2868–2873.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, vol 2. SAS Inst., Cary, NC, USA. 943 pp.
- Sharp, J. M. and P. M. Doran. 1990. Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Biotech.* 16:171–186.
- Shin, K. S., D. Chakrabarty, J. Y. Ko, S. S. Han, and K. Y. Paek. 2003. Sucrose utilization and mineral nutrient uptake during hairy root growth of red beet (*Beta vulgaris* L.) in liquid culture. *Plant Growth Regul.* 39:187–193.
- Wielanek, M. and H. Urbanek. 1999. Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropeaeolum majus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:39–45.
- Wu, Y. J., C. Y. Hong, S. J. Lin, and M. S. Shiao. 1998. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:481–486.
- Yan, Q., M. Shi, J. Ng, and J. Wu. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci.* 170:853–858.
- Yan, Q., Z. Hu, R. X. Tan, and J. Wu. 2005. Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. *J. Biotechnol.* 119:416–424.
- Zhang, C., Q. Yan, W. K. Cheuk, and J. Wu. 2004. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding. *Planta Med.* 70:147–151.
- Zhong, J. J. 2001. Biochemical engineering of the production of plantspecific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 72:1–26.

Production of Tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in Hairy Root Culture¹

Uei-Chern Chen², Hsiao-Sung Chan⁴, Choi-Yi Lee², Chin-Yi Tsao²,
Jen-Chyi Liu³, Yahn-Chir Lee³, and Chi-Ni Hsia^{2,5}

Abstract

Chen, U. C., H. S. Chan, C. Y. Lee, J. Y. Tsao, J. C. Liu, Y. C. Lee, and C. N. Hsia. 2008. Production of tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. *J. Taiwan Agric. Res.* 57:305–316.

Leaf explants of *Salvia miltiorrhiza* were inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* strain R1601 to induce formation of hairy roots. Root cultures were established and maintained in a semi-solid or a liquid B5 medium. They were used to study effect of source of inoculum, size of inoculum, type of media and incubation period on production of root biomass and tanshinones in liquid culture. Results showed that root tips were superior to other root segments as inoculum for production of root biomass and tanshinones in liquid cultures. The treatments of 10, 15 and 20 root tips/20 mL B5 medium significantly increased root growth and production of tanshinones, compared to the treatment of 5 root tips/20 mL B5 medium. Concentration of sucrose and NH_4^+ in B5 liquid cultures rapidly reduced to 9% and 10%, respectively, in 3 weeks, resulting in a decrease in biomass accumulation. This indicates that carbohydrate and nitrogen might be important limiting factors for hairy root growth of *S. miltiorrhiza*. Production of dry weight biomass in liquid B5 medium peaked at 5.8 g L⁻¹ after 6 weeks, whereas production of tanshinones peaked at 64 g L⁻¹ after 8 weeks.

Key words: Danshen, *Salvia miltiorrhiza*, Time-course study, Nitrogen source, Carbohydrate source, Secondary metabolite, Tanshinones, Hairy root culture.

-
1. Contribution No.2339 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 21, 2008.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Contract Employee, Contract Employee, and Associate Researcher, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher and Assistant Researcher, Agricultural Chemistry Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Assistant Professor, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail: chhsia@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04) 23302806.