

氮源型態及濃度對丹參毛狀根生長與丹參酮產量之影響¹

詹効松² 羅子庭² 陳威臣³ 夏奇鈺^{3,4} 蔡新聲²

摘 要

詹効松、羅子庭、陳威臣、夏奇鈺、蔡新聲。2012。氮源型態及濃度對丹參毛狀根生長與丹參酮產量之影響。台灣農業研究 61:100-111。

利用具有快速生長特性之轉殖毛狀根做為培養材料是組織培養大量生產植物二次代謝物之新趨勢，本研究以 B5 鹽類配方作為丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 毛狀根之基礎培養基，探討 B5 培養基中兩種型態之氮源—硝酸鉀 (KNO_3) 與硫酸銨 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] 及其濃度對於丹參毛狀根生質量、丹參酮含量及其產量之影響。將 B5 鹽類配方中之硝酸鉀濃度分別調整為 0–49.5 mM，B5 配方中之其餘成分及濃度維持不變，毛狀根經 8 週培養後，顯示以 12.4–37.1 mM 硝酸鉀處理具有較高之生質量；丹參酮的含量及產量則以 37.1 mM 硝酸鉀處理最高，為對照組 B5 培養基 (24.7 mM 硝酸鉀) 的 2 倍。將 B5 鹽類配方中之硫酸銨濃度分別調整為 0–2.0 mM 進行毛狀根培養，B5 配方中之其餘成分及濃度維持不變，結果顯示毛狀根於不含硫酸銨之培養基中可獲得最高之生質量 10.25 g/L；在丹參酮的含量及產量方面，則以 0.5 mM 硫酸銨處理最高，分別為對照組 B5 培養基 (1.0 mM 硫酸銨) 的 2.8 倍及 4.1 倍。因培養結果顯示硫酸銨對毛狀根的生長具抑制作用，因此採用二階段培養方法，亦即將丹參毛狀根先於不含硫酸銨的 B5 培養基中培養 4 週後，再以饋料方式添加硫酸銨於培養液中，使其濃度為 1.0 mM 及 2.0 mM 並繼續再培養 4 週，結果顯示在培養 4 週後以饋料添加 1.0 mM 硫酸銨培養方式，相較全程 8 週培養於初始濃度為 1.0 mM 硫酸銨之 B5 培養基之對照組，在毛狀根生質量方面可提高 1.3 倍，在總丹參酮產量方面則提高 2.2 倍。以上結果顯示，氮源型態及濃度對丹參毛狀根生長與丹參酮產量有明顯之影響，提高 B5 鹽類配方中之硝酸鉀濃度、降低硫酸銨濃度、或以二階段培養方式將毛狀根於不含硫酸銨之培養基中培養，生長後期利用饋料添加硫酸銨，皆能促進毛狀根生長，並增加丹參酮的累積，是現階段較佳之培養策略。

關鍵詞：丹參、毛狀根、丹參酮、氮源、二階段培養。

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2664 號。接受日期：101 年 5 月 24 日。
 2. 朝陽大學生化科技研究所助理教授、研究生及教授。台灣 台中市。
 3. 本所生物技術組助理研究員及研究員。台灣 台中市。
 4. 通訊作者，電子郵件：hsia@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

前 言

植物是人類依賴之重要自然資源，除提供人類糧食所需之外，由植物體中產生的二次代謝物 (secondary metabolites) 更可作為食品、染料、香料與藥物之用，許多植物的二次代謝產物因成分複雜不易以化學方法合成，至今仍以從植物體中提取為主，但這些二次代謝物在植物體內的含量往往偏低，增加了原料取得的成本。以組織培養技術大規模培養植物之細胞、器官乃至於植物體的培養方式已有相當之基礎，應可作為大規模生產特定植物二次代謝物之替代方案，不但可降低原料的取得成本，更可抒解因為過度採擷造成自然資源逐漸匱乏的窘境 (Kim *et al.* 2002a)。

丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 為唇形科 (Lamiaceae) 鼠尾草屬多年生草本植物，在傳統醫學治療上主要作為活血化瘀之用，近代西方醫學之研究亦證實丹參具有抑制血小板凝集的能力 (Hur *et al.* 2005)，對於冠狀動脈有擴張作用，並可作為抗心絞痛的藥物 (Lei & Chiou 1986)。一般而言由丹參中萃取出之化學成分包含脂溶性的二萜醌類和水溶性酚酸類，其中脂溶性成分有丹參酮 I (tanshinone I)、丹參酮 IIA (tanshinone IIA)、丹參酮 IIB (tanshinone IIB)、隱丹參酮 (cryptotanshinone) 等 (Takahashi *et al.* 2002)，這些脂溶性化合物具有高度的抗氧化活性及強大的自由基清除能力 (Wang *et al.* 2003)。在丹參酮的藥理研究中，Kang *et al.* (2000) 指出，丹參酮 I 與隱丹參酮能夠抑制 interleukin-12 (IL-12) 和 interferon-gamma (IFN- γ) 的產生，具有抗發炎與減緩免疫反應產生；Yuan *et al.* (2003) 指出丹參酮 IIA 具抗腫瘤活性，對急性骨髓型血癌 (acute promyelocytic leukemia) 細胞能產生誘導分化作用，使癌細胞分化為正常細胞，此外也能誘導人類鼻咽癌細胞與人類肺腺癌細胞等多種癌細胞走

向細胞凋亡 (apoptosis)；隱丹參酮除了被認為對革蘭氏陽性菌具有抗菌能力 (Lee *et al.* 1999) 外，並可抑制基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases)，具有抗血管內膜增生和抗動脈粥狀硬化等效用，極具臨床治療應用之潛力 (Suh *et al.* 2006)。

目前利用植物組織培養技術生產植物二次代謝物，最常使用的方法有懸浮細胞培養與毛狀根培養兩種方式，其中毛狀根為藉由農桿根群菌感染植物組織後所形成具有不斷增生特性之根狀組織，相較於懸浮細胞具有生長快速、不需添加植物生長調節劑、遺傳性狀及二次代謝物生合成較為穩定等優點 (Shanks & Morgan 1999; Srivastava & Srivastava 2007)，許多植物二次代謝產物之生合成與累積亦發生於根部 (Flores *et al.* 1999)。此外利用生物性或非生物性誘引劑 (elicitor)，如銀離子 (Zhang *et al.* 2004; Ge & Wu 2005a)、酵母誘引劑 (Chen *et al.* 2001)、beat-aminobutyric acid (Ge & Wu 2005b)、滲透壓逆境 (hyperosmotic stress) (Shi *et al.* 2007)、植物生長調節劑 (Gupta *et al.* 2011)、養分饋料或培養基更新 (Zhang *et al.* 2004) 等方式均證實可以增加丹參毛狀根生質量與丹參酮含量，再配合生物反應器的使用 (Kim *et al.* 2002a, 2002b)，使得毛狀根培養成為大量生產植物二次代謝產物之利器。

植物體中氮源的利用途徑為硝酸態氮 (NO_3^-) 經硝酸氮還原酵素 (nitrate reductase) 還原成亞硝酸氮 (NO_2^-)，亞硝酸氮再由亞硝酸氮還原酵素 (nitrite reductase) 還原為銨態氮 (NH_4^+)，再以麩醯胺酸合成酵素 (glutamine synthetase) 將氨態氮合成為麩醯胺酸 (glutamine)，之後並轉變成其它胺基酸供植物體利用 (Layzell 1990)。硝酸態氮經由主動運輸過程進入植物體後，小部份經轉化成銨態氮型式進行代謝，大部份會以硝酸態氮型式進行儲存，即使高濃度時也不會對植物體有不良影響；而銨態

氮則經由氫離子交換後進入細胞，在細胞內經去質子化形成 NH_3 ，因為 NH_3 對植物毒害較大，必須先與有機酸結合形成胺基酸後再進行後續之代謝。組織培養成功的關鍵步驟之一是選擇適當的培養基，針對不同種類植物之細胞與組織所設計的培養基配方，主要亦表現在氮源種類與含量的不同，亦即藉由硝酸態氮與鉍態氮兩種型態以不同濃度及比例存在於培養基中，讓不同種類植物達到最佳之生長狀態。Lin (2005) 以 MS (Murashige & Skoog 1962)、1/2 MS、WPM (Lloyd & McCown 1980)、B5 (Gamborg *et al.* 1968) 及 N6 (Chu *et al.* 1975) 鹽類配方培養基進行丹參毛狀根培養，結果發現雖然在 WPM 培養基中可得最高之毛狀根生長質量，但丹參毛狀根在 B5 培養基中可得到最高之丹參酮類 (tanshinones) 含量，分析 MS、B5、WPM 與 N6 這 4 種培養基之總氮含量依序為 MS (60.03 mM/L)、N6 (35 mM/L)、B5 (27.03 mM/L) 及 WPM (16.10 mM/L)，其中 B5 培養基是為大豆根細胞培養而設計的，其總氮含量在 4 種鹽類配方中雖非最低，但其特點是含有較低的鉍態氮適合根部細胞或組織的生長。Chen *et al.* (2008) 的丹參毛狀根培養研究則顯示，B5 培養液中之硝酸態氮與氫態氮濃度均會隨著培養時間增長而降低，其中又以鉍態氮較硝酸態氮消耗更為快速，在毛狀根培養 3 週後即迅速減少。由此推測，培養基中提供之氮源的型態與含量的多寡，對於丹參毛狀根的生長與二次代謝產物的形成有重要的影響。

本研究以 B5 鹽類配方作為丹參毛狀根培養之基礎培養基，探討修正 B5 配方培養基中兩種形式氮源-硝酸鉀 (potassium nitrate, KNO_3) 與硫酸鉍 [ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] 的濃度對毛狀根生長與丹參酮含量與產量之影響，並進一步探討於毛狀根培養期間利用饋料添加硫酸鉍之培養方式對提高丹參毛狀根生長質量與丹參酮產量之可行性。

材料與方法

丹參毛狀根培養

丹參毛狀根由丹參瓶苗葉片培植體經由農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*, R1601) 感染所得 (Lin *et al.* 2005)。毛狀根培養之固態培養基為 B5 基本鹽類配方添加 3% 蔗糖與 0.9% Bacto agar，毛狀根於 25°C 無光照環境中進行培養，每 4 週繼代一次。液態培養之接種材料為切取於固態培養基中生長 2 週後長約 1.5 cm 之毛狀根根尖，置於裝有 20 mL 培養液的 125 mL 三角錐形瓶中，每瓶培養 5 條根尖，每處理接種 3 瓶，於 25°C 無光照環境中利用往復式震盪培養器以 70 rpm 進行震盪培養。

丹參毛狀根乾重測定與丹參酮含量分析

將收穫後之丹參毛狀根置於烘箱以 50°C 乾燥 48 小時或至恆重後測量其乾重，丹參酮檢品製備及 HPLC 分析依據 Chen *et al.* (2008) 方法進行。將乾燥毛狀根置入液態氮中研磨，將同一處理均質化後之毛狀根樣品粉末合併，秤取 0.5 g 樣品粉末以 10 mL 二氯甲烷 (dichloromethane)：甲醇 = 1：4 混合溶劑搭配超音波震盪器震盪 20 分鐘，並以 2700 rpm 離心 10 分鐘後取得萃取液，重複萃取 2 次，將濾液合併後以真空減壓濃縮機 (EYELA, 日本) 濃縮，濃縮液經甲醇定容後以 0.45 μm 濾膜過濾，以 HPLC 法分別檢測丹參酮 I (Tanshinone I, Tan I)、丹參酮 IIA (Tanshinone IIA, Tan IIA) 與隱丹參酮 (Cryptotanshinone, Crypto)，丹參酮類標準品購自九鼎生技 (台灣)。

丹參毛狀根中總丹參酮含量與產量之計算

以樣品分析得到之隱丹參酮、丹參酮 I 與丹參酮 IIA 含量 (mg/L)，計算總丹參酮含量 (mg/g)，計算方式為：

丹參酮總含量 (mg/g) = 隱丹參酮含量 (mg/g) + 丹參酮 I 含量 (mg/g) + 丹參酮 IIA 含量 (mg/g)。

丹參酮總產量 (mg/L) = 丹參毛狀根生質量 (mg/L) × 總丹參酮含量 (mg/g)。

硝酸鉀濃度對丹參毛狀根生長及丹參酮含量及產量影響試驗

以 B5 鹽類配方作為基本培養基進行毛狀根培養，將配方中之硝酸鉀濃度分別調整為 0 mM、6.2 mM、12.4 mM、24.7 mM (B5 配方濃度，對照組)、37.1 mM、49.5 mM，配方中之其餘成分及濃度皆依照 B5 配方維持不變，每種硝酸鉀濃度培養 3 瓶，培養 8 週後調查毛狀根生質量與丹參酮含量。

硫酸銨濃度對丹參毛狀根生長及丹參酮產量影響試驗

同樣以 B5 鹽類配方為基本培養基進行毛狀根培養，將 B5 配方中硫酸銨濃度分別調整為 0 mM、0.5 mM、1.0 mM (B5 配方濃度，對照組)、1.5 mM 及 2.0 mM，配方中之其餘成分與濃度皆依照 B5 配方維持不變，每種濃度硫酸銨共培養 3 瓶，培養 8 週後調查毛狀根生質量與測量丹參酮含量。

毛狀根生長中期添加硫酸銨對丹參毛狀根生長及丹參酮產量影響試驗

丹參毛狀根在不含硫酸銨的 B5 培養液中培養 4 週後，於培養液中添加硫酸銨，使培養液中之硫酸銨濃度為 1.0 mM 及 2.0 mM，再繼續培養 4 週後調查毛狀根生質量及丹參酮含量。對照組分別為持續 8 週培養於不含硫酸銨或持續 8 週培養於含有 1.0 mM 硫酸銨之 B5 培養基之丹參毛狀根。

統計分析方法

試驗採用完全隨機設計 (Completely Randomized Design, CRD)，每處理取樣 3 瓶，分別測量毛狀根之乾重，因單瓶毛狀根之乾重取樣量過少，所以三種丹參酮含量分析是將同一處理之樣品粉末合併後再進行取樣分析。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

硝酸鉀濃度對丹參毛狀根生長及丹參酮含量及產量影響試驗

丹參毛狀根培養於含有 0–49.5 mM 硝酸鉀濃度的 B5 鹽類配方培養基 8 週後，結果如表 1 與圖 1 所示。培養基中硝酸鉀濃度在 0–12.4 mM 之間時，丹參毛狀根生質量會隨著硝酸鉀濃度提高而增加，以 12.4 mM 硝酸鉀試驗組之毛狀根生質量達最高，為 8.9 g/L；毛狀根生質量於 12.4–37.1 mM 硝酸鉀試驗組間並無顯著差異；但隨著硝酸鉀濃度繼續提高，毛狀根生質量有逐漸下降之趨勢。在圖 1 中可觀察到毛狀根在不含硝酸鉀之培養液中幾乎沒有生長，而隨著硝酸鉀濃度增加，可以觀察到丹參毛狀根的形態逐漸加粗。在丹參酮含量方面，除了 0 mM 硝酸鉀試驗組具有較高之隱丹參酮 (3.24 mg/g) 外，其餘各處理皆顯示毛狀根之丹參酮含量會隨培養基中硝酸鉀濃度提高而增加，其中又以隱丹參酮之含量變化最顯著；在丹參酮產量方面，以 37.1 mM 硝酸鉀濃度試驗組可得最高總丹參酮含量及產量，分別為 6.40 mg/g 與 53.42 mg/L，為原 B5 培養基處理 (24.7 mM 硝酸鉀) 的 2.1 倍和 2 倍。

硫酸銨濃度對丹參毛狀根生長及丹參酮產量影響試驗

丹參毛狀根於含有 0–2.0 mM 硫酸銨濃度的 B5 鹽類配方培養基中培養 8 週後，結果如表 2 與圖 2 所示。丹參毛狀根生質量以不含硫酸銨之試驗組最高，為 10.25 g/L，是對照組 B5 培養基 (1.0 mM 硫酸銨) 的 1.8 倍；在硫酸銨濃度為 0–1.0 mM 之間時，丹參毛狀根生質量會隨著硫酸銨濃度提高而顯著下降，當硫酸銨濃度為 1.0–2.0 mM 之間時，三試驗組之毛

表 1. 硝酸鉀濃度對丹參毛狀根生長、丹參酮含量及丹參酮總產量之影響

Table 1. Effects of potassium nitrate concentrations on biomass, tanshinone content and total tanshinone production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*

| Potassium nitrate (mM) in B5 medium ^z | Biomass (g dw/L) | Tanshinone (mg/g) | | | | Tanshinone production (mg/L) |
|--|----------------------------|--------------------|---------|--------|-------|------------------------------|
| | | Tan I ^y | Tan IIA | Crypto | Total | |
| 0.0 | 0.20 ± 0.06 d ^x | 0.00 | 0.00 | 3.24 | 3.24 | 0.65 |
| 6.2 | 5.95 ± 0.20 c | 0.02 | 0.00 | 0.89 | 0.91 | 5.42 |
| 12.4 | 8.90 ± 0.30 a | 0.02 | 0.06 | 1.41 | 1.50 | 13.31 |
| 24.7 | 8.90 ± 0.30 a | 0.20 | 0.53 | 2.35 | 3.08 | 26.15 |
| 37.1 | 8.33 ± 0.33 ab | 0.68 | 1.50 | 4.21 | 6.40 | 53.42 |
| 49.5 | 7.92 ± 0.24 b | 0.25 | 0.79 | 3.88 | 4.92 | 38.87 |

^z B5 medium was used as basal medium except concentrations of potassium nitrate were amended. Cultures were incubated at modified B5 medium for 8 weeks and tested for biomass, tanshinone and tanshinone production.

^y Tan I: tanshinone I; Tan IIA: tanshinone IIA; Crypto: Cryptotanshinone.

^x Mean ± standard error ($n = 3$). Means followed by the same letter(s) within each column are not significantly different at 5% level according to Least Significant Difference Test.

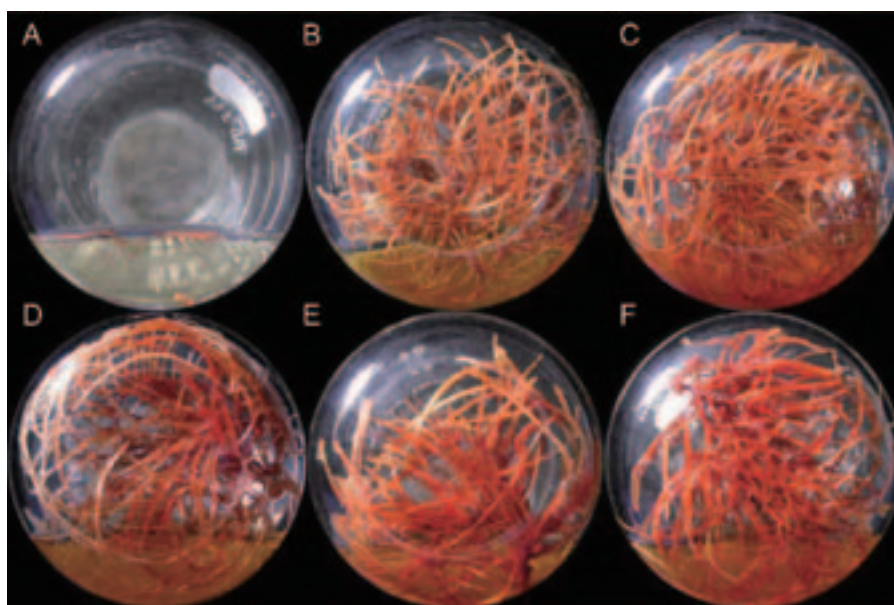


圖 1. 丹參毛狀根於不同濃度硝酸鉀之 B5 配方培養基中培養 8 週後之生長情形。

Fig. 1. Hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* cultured for 8 weeks in the modified B5 basal medium containing various concentrations of potassium nitrate (A–F). Concentration of potassium nitrate in the medium: (A) 0 mM; (B) 6.2 mM; (C) 12.4 mM; (D) 24.7 mM; (E) 37.1 mM; (F) 49.5 mM.

狀根生質量並無顯著性差異。在丹參酮含量方面，當硫酸銨濃度為 0.5 mM 時，丹參酮含量達到最高，為 7.24 mg/g，其中丹參酮 I、丹參酮 IIA 及隱丹參酮三種丹參酮之含量分別為對

照組的 2.36 倍、1.68 倍與 1.43 倍，總丹參酮產量 60.94 mg/L 為對照組的 4.1 倍。圖 2 中可觀察到硫酸銨對於毛狀根生長與丹參酮累積的影響，在硫酸銨濃度為 0 mM 的試驗組中，毛

表 2. 硫酸銨濃度對丹參毛狀根生長、丹參酮含量及丹參酮總產量之影響

Table 2. Effects of concentration of ammonium sulfate on biomass, tanshinone content and total tanshinone production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*

| Ammonium sulfate (mM) in B5 medium ^z | Biomass (g dw/L) | Tanshinone (mg/g) | | | | Tanshinone production (mg/L) |
|---|-----------------------------|--------------------|---------|--------|-------|------------------------------|
| | | Tan I ^y | Tan IIA | Crypto | Total | |
| 0.0 | 10.25 ± 0.62 a ^x | 0.14 | 0.16 | 0.03 | 0.33 | 3.33 |
| 0.5 | 8.42 ± 0.33 b | 3.54 | 1.01 | 2.69 | 7.24 | 60.94 |
| 1.0 | 5.67 ± 0.35 c | 0.15 | 0.60 | 1.88 | 2.63 | 14.89 |
| 1.5 | 6.35 ± 0.19 c | 0.40 | 0.58 | 1.48 | 2.46 | 15.59 |
| 2.0 | 6.20 ± 0.12 c | 0.59 | 0.60 | 1.51 | 2.70 | 16.75 |

^z B5 medium was used as basal medium except concentrations of ammonium sulfate were amended. Cultures were incubated at modified B5 medium for 8 weeks and tested for biomass, tanshinone and tanshinone production.

^y Tan I: tanshinone I; Tan IIA: tanshinone IIA; Crypto: Cryptotanshinone.

^x Mean ± standard error ($n = 3$). Means followed by the same letter(s) within each column are not significantly different at 5% level according to Least Significant Difference Test.

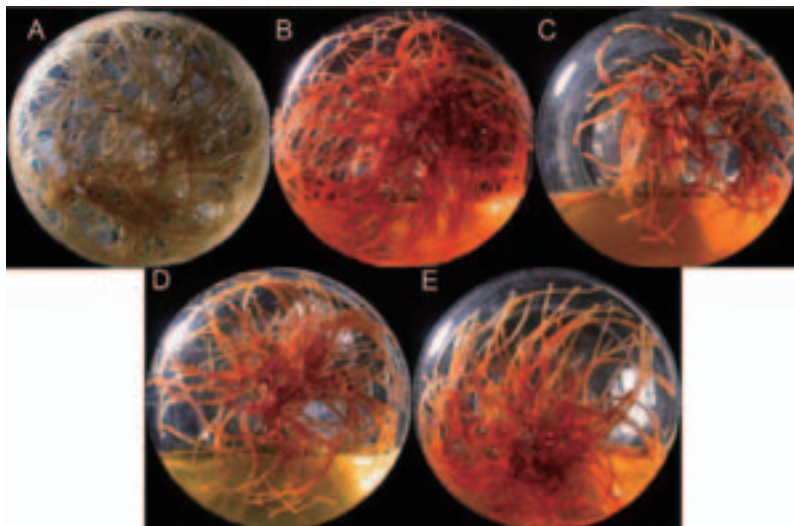


圖 2. 丹參毛狀根於不同濃度硫酸銨之 B5 配方培養基中培養 8 週後之生長情形。

Fig. 2. Hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* cultured for 8 weeks in B5 medium containing various concentrations of ammonium sulfate (A–E). Concentration of ammonium sulfate in the medium: (A) 0 mM; (B) 0.5 mM; (C) 1.0 mM; (D) 1.5 mM; (E) 2.0 mM.

狀根生長旺盛，但毛狀根呈現淡褐色；在添加 0.5–2.0 mM 硫酸銨之試驗組中，毛狀根因累積丹參酮而呈現較深之紅色。

毛狀根生長中期添加硫酸銨對丹參毛狀根生長及丹參酮產量影響試驗

利用不含硫酸銨的 B5 培養基進行丹參毛狀根第一階段培養，在培養 4 週後添加硫酸銨使培

養液中之硫酸銨濃度分別為 1.0 mM 及 2.0 mM，繼續第二階段 4 週的培養，藉由硫酸銨於培養基中出現的時間差，觀察其對丹參毛狀根生長與丹參酮累積的影響，總共 8 週培養後結果如表 3 與圖 3 所示。持續培養於完全不含硫酸銨之對照組具有最高之毛狀根生長質量 11.2 g DW/L，但三種丹參酮含量皆低，總丹參酮含量僅達

表 3. 利用培養期間添加硫酸銨對丹參毛狀根生質量、丹參酮含量與總丹參酮產量的影響

Table 3. Effect of amendment of ammonium sulfate in B5 basal medium at week-4 on biomass, tanshinone content and total tanshinone production of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*

| Ammonium sulfate (mM) added in culture ^z | | Biomass (g dw/L) | Tanshinone (mg/g) | | | | Tanshinone production (mg/L) |
|---|--------------------|----------------------------|--------------------|---------|--------|-------|------------------------------|
| Initial culture | 4-week-old culture | | Tan I ^y | Tan IIA | Crypto | Total | |
| 0.0 | 0.0 | 11.2 ± 0.50 a ^x | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.05 | 0.57 |
| 1.0 | 0.0 | 7.42 ± 0.26 b | 0.79 | 1.06 | 2.14 | 3.99 | 29.59 |
| 0.0 | 1.0 | 9.58 ± 0.03 c | 3.18 | 1.72 | 1.85 | 6.76 | 64.70 |
| 0.0 | 2.0 | 8.82 ± 0.56 c | 2.66 | 1.62 | 0.66 | 4.94 | 43.53 |

^z Initial and additional ammonium sulfate concentrations added at week-1 and week-4 in the modified B5 medium. Cultures were incubated at modified B5 medium for total 8 weeks and tested for biomass, tanshinone and tanshinone production.

^y Tan I: tanshinone I; Tan IIA: tanshinone IIA; Crypto: Cryptotanshinone.

^x Mean ± standard error ($n = 3$). Means followed by the same letter(s) within each column are not significantly different at 5% level according to Least Significant Difference Test.

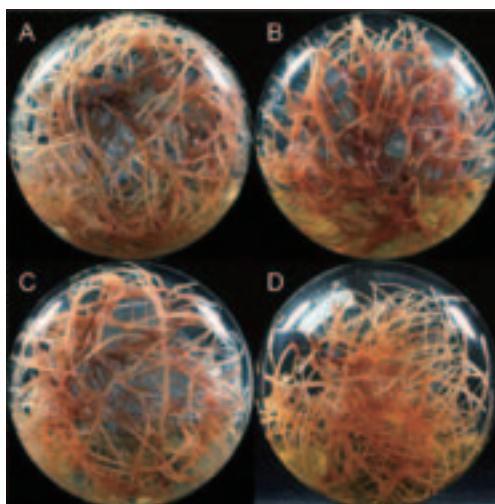


圖 3. 丹參毛狀根培養在不同濃度硫酸銨之 B5 培養基中生長 8 週之情形。培養基中硫酸銨濃度分別為 (A) 0 mM 及 (B) 1.0 mM NH_4NO_3 ，以及毛狀根於不含硫酸銨之培養基中培養 4 週後再添加 (C) 1.0 mM 及 (D) 2.0 mM 硫酸銨。

Fig. 3. Eight-week-old hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* grown in B5 basal medium with (C–D) or without (A–B) amendment of NH_4NO_3 . Time and concentration of amendment of ammonium sulfate: (A) 0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (B) 1.0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at week-1; (C) 1.0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (D) 2.0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at week-4.

0.57 mg/L；培養 4 週後添加 1.0 mM 硫酸銨之毛狀根的生長與不含硫酸銨之對照組相較顯示生長受到抑制，但其丹參酮含量與產量顯著增加，分別為不含硫酸銨對照組之 133.4 倍及 113.5 倍；與培養初始即含有 1.0 mM 硫酸銨之 B5 配方培養基之對照組相較，發現培養 4 週後

再添加 1.0 mM 硫酸銨有助於毛狀根生質量與丹參酮含量的增加，生質量可以提高 1.29 倍，總丹參酮含量為 6.76 mg/g，提高 1.69 倍，丹參酮產量方面為 64.70 mg/L，提高 2.18 倍。將第二階段添加之硫酸銨濃度提高到 2.0 mM，毛狀根生質量與添加 1.0 mM 處理相較，影響並不

明顯，但總丹參酮的含量會減少，但仍較 8 週持續培養於添加 1.0 mM 硫酸銨之對照組增加 1.47 倍。

討 論

利用組織培養方式生產植物二次代謝物除了要顧及培植體的生長外，最重要的是要提高二次代謝物的產量，培養條件中作為營養供應的培養基扮演了重要的角色，尤其當培植體生質量增加與二次代謝物含量累積所需條件不一致時，如何透過對培養系統的瞭解而加以調整，研擬出一套具體可行之培養策略，是整體二次代謝物生產能否提升的關鍵。綜觀毛狀根培養所用之培養基，皆含有硝酸態氮與銨態氮兩種主要型態之氮源，前人之研究顯示硝酸態氮與銨態氮的濃度及其比例除了影響毛狀根的生長外，對於毛狀根內所含二次代謝物的產量亦有很大的影響 (Lin 2005; Chen *et al.* 2008; Cui & Murthy 2010)。Bensaddek *et al.* (2001) 在顛茄毛狀根培養的結果中顯示，硝酸鹽濃度 15.80 mM 增至 39.5 mM，不利於生物鹼含量與產量的增加，但有利於毛狀根生質量的增加；但在本研究丹參毛狀根的培養結果中則顯示，將培養基中硝酸鉀濃度從對照組 B5 配方培養基之 24.7 mM 提高至 37.1 mM，有助於總丹參酮含量與產量的提高，且毛狀根生質量的減少並不明顯，計算丹參酮 I、丹參酮 IIA 及隱丹參酮三種丹參酮含量則分別為對照組的 11 倍、2.8 倍與 1.8 倍，總丹參酮產量為對照組的 2.0 倍，其中硝酸鹽對於丹參酮 I 促進之效果最為明顯。在本研究中亦顯示，毛狀根在不含硝酸鉀培養基中無法正常生長，此點與 Lourenço *et al.* (2002) 發現紫星薊毛狀根在不含硝酸鉀培養基中幾乎沒有生長之結果相似，推測適量硝酸鹽的存在為毛狀根生長所必需。此外，Bensaddek *et al.* (2001) 在顛茄毛狀根的培養以及 Lourenço *et al.* (2002) 在紫星薊毛狀

根培養的結果皆顯示，不含銨鹽的培養基有利於毛狀根生質量的增加；在本研究中丹參毛狀根培養於完全不含硫酸銨的培養基中，亦證實可得到最高之毛狀根生質量，推測銨鹽並非丹參毛狀根生長所必需，唯培養在不含硫酸銨中之丹參毛狀根其丹參酮的含量偏低，顯示硫酸銨有助於丹參酮的累積，添加少量 (0.5 mM) 之硫酸銨在丹參酮 I、丹參酮 IIA 及隱丹參酮三種丹參酮含量表現上較對照組 (1.0 mM 硫酸銨) 可提高 23.6 倍、1.7 倍與 1.4 倍，總丹參酮產量則為對照組的 4.1 倍，其中硫酸銨對於丹參酮 I 促進之效果最為明顯，此點與硝酸鉀對於丹參酮 I 促進效果最佳相同。Hilton & Wilson (1995) 發現一些藥用植物毛狀根在指數生長期的第 1 天，銨態氮源即被快速用盡，在丹參毛狀根的前人研究中亦指出，銨態氮源在培養 3 週後迅速下降 (Chen *et al.* 2008)，顯示銨態氮源對於植物細胞而言是較容易吸收轉化 (同化) 之氮源，推測這也是為什麼低濃度銨鹽即可對植物細胞產生毒害的原因之一。從本研究之結果來看，銨鹽濃度對毛狀根生長及丹參酮之累積有相異之影響 (不含銨鹽可提高毛狀根之生質量，但不利丹參酮之累積)，因此硫酸銨濃度對丹參毛狀根生長及丹參酮產量之最佳濃度範圍 (0–1.0 mM 硫酸銨) 必須精確的加以界定；對於硝酸態氮源與銨態氮源之間是否具有交感作用，亦必須設計進一步之試驗才能加以釐清。

在本研究中發現移除培養基中之銨態氮源-硫酸銨，可明顯增加毛狀根生質量，但有丹參酮不累積之缺點，針對此一現象，假設在毛狀根已完成生長之階段再添加銨態氮於培養基中，推測毛狀根之生長不會受到抑制，但卻有助於丹參酮的累積，應該是較為適當之培養策略。源於上述之假設，本研究設計配合丹參毛狀根生長於培養 4 週後，以饋料添加的方式補充硫酸銨，探討在生長中後期適時調整硫酸

銨濃度含量對提高丹參酮產量之可行性。試驗結果顯示，雖然二階段饋料添加硫酸銨處理之丹參毛狀根相較於全程 8 週培養於完全不含硫酸銨之丹參毛狀根生質量仍較低，但其生質量卻明顯高於持續培養於原始濃度為 1.0 mM 硫酸銨之 B5 培養基對照組；尤其在丹參酮含量及產量表現方面，以饋料添加方式補充硫酸銨之處理明顯高於培養於不含硫酸銨以及培養於初始濃度為 1.0 mM 硫酸銨之對照組，顯示於培養中期後以饋料添加硫酸銨的培養方式，不但能減少硫酸銨影響毛狀根生長的缺點，並且能改進丹參毛狀根培養在不含硫酸銨培養基中丹參酮不累積的缺點，未來將針對提高丹參酮的產量，進一步研究二階段饋料添加硫酸銨的最適時間與最適濃度的影響。

以組織培養方式生產植物二次代謝物相較於以生產種苗為目標之培養方式複雜，因為培養系統的好壞不能單純以培植體生質量或其二次代謝物的含量高低來判斷，尤其當提高生質量與提高二次代謝物含量所需培養條件不一致時，最終必須以二次代謝物的總產量為目標來調整生產策略。本研究在丹參毛狀根生產丹參酮的培養系統中，發現氮源型態及濃度對丹參毛狀根生長與丹參酮產量有明顯之影響，其中培養基中之銨鹽對毛狀根生質產量及丹參酮產量有不同之影響，除試圖找出銨鹽之最適濃度範圍外，更發展出利用二階段饋料添加硫酸銨之方法，除可提高丹參毛狀根生質量外，並能得到較高的丹參酮產量，此一培養策略可以作為其他以組織培養生產植物二次代謝物培養系統改進之參考。

誌 謝

本研究經費為農業生物技術國家型計畫所提供，計畫編號 96-2317-B-055-008、97-2317-B-055-009 特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Bensaddek, L., F. Gillet, J. E. N. Saucedo, and F. Marc-Andre. 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy root. *J. Biotechnol.* 85:35–40.
- 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.
- Chen, U. C., H. S. Chan, C. Y. Lee, C. 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.* 57:305–326. (in Chinese with English abstract)
- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, K. C. Hsu, K. C. Yin., C. Y. Chu, and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen source. *Sci. Sinica* 18:659–668.
- Cui, X. H., H. N. Murthy, C. H. Wu, and K. Y. Peak. 2010. Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 46:437–444.
- Flores, H. E., J. M. Vivanco, and V. M. Loyola-Vargas. 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* 4:220–226.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell. Res.* 50:151–158.
- Ge, X. and J. Wu. 2005a. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag^+ and yeast elicitor. *Plant Sci.* 168:487–491.
- Ge, X. and J. Wu. 2005b. Induction and potentiation of diterpenoid tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by β -aminobutyric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:183–188.
- Gupta, S. K., R. B. Liu, S. Y. Liaw, H. S. Chan, and H. S. Tsay. 2011. Enhanced tanshinone production in hairy roots of “*Salvia miltiorrhiza* Bunge” under the influence of plant growth regulators in liquid culture. *Bot. Stud.* 52:435–443.
- Hilton, M. G. and P. D. G. Wilson. 1995. Growth and uptake of sucrose and mineral ions by transformed

- root cultures of *Datura stramonium*, *Datura candida* × *aurea*, *Datura wrightii*, *Hyoscyamus muticus* and *Atropa belladonna*. *Planta Med.* 61: 345–350.
- Hur, J. M., J. S. Shim, H. J. Jung, and H. J. Kwon. 2005. Cryptotanshinone but not tanshinone IIA inhibits angiogenesis *in vitro*. *Exp. Mol. Med.* 37:133–137.
- Kang, B. Y., S. W. Chung, S. H. Kim, S. Y. Ryu, and T. S. Kim. 2000. Inhibition of interleukin-12 and interferon- γ production in immune cells by tanshinone from *Salvia miltiorrhiza*. *Immunopharmacology* 49:355–361.
- Kim, Y. J., B. E. Wyslouzil, and P. J. Weathers. 2002a. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:1–10.
- Kim, Y. J., P. J. Weathers, and B. E. Wyslouzil. 2002b. The growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid and gas phase reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 80:454–464.
- Layzell, D. B. 1990. N_2 fixation, NO_3^- reduction and NH_4^+ assimilation. p.389–406. *in*: *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Dennis D. T. and D. H. Turpin, eds.) Longman Scientific and Technical. Harlow. 529 pp.
- Lin, J. F. 2005. Development of Hairy Root Transformation System and Its Secondary Metabolites Production of *Salvia miltiorrhiza*. Master Thesis, Department of Agronomy, National Chung Hsing University. Taichung. 76 pp. (in Chinese with English abstract)
- Lee, D. S., S. H. Lee, J. G. Noh, and S. D. Hong. 1999. Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I from a medicinal herb, *Salvia miltiorrhiza*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:2236–2239.
- Lei, X. L. and G. C. Y. Chiou. 1986. Studies on cardiovascular actions of *Salvia miltiorrhiza*. *Am. J. Chin. Med.* 14:26–32.
- Lloyd, G. and B. McCrown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421–427.
- Lourenço, P. M. L., S. de Castro, T. M. Martins, A. Clemente, and A. Domingos. 2002. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme Microb. Technol.* 31:242–249.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:437–497.
- Shanks, J. V. and J. Morgan. 1999. Plant “hairy root” culture. *Curr. Opin. Biotech.* 10:151–155.
- Srivastava, S. and A. K. Srivastava. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27:29–43.
- Suh, S. J., U. H. Jin, H. J. Choi, H. W. Chang, J. K. Son, S. H. Lee, S. J. Jeon, K. H. Son, Y. C. Chang, Y. C. Lee, and C. H. Kim. 2006. Cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge has an inhibitory effect on TNF- α -induced matrix metalloproteinase-9 production and HASMC migration via down-regulated NF- κ B and AP-1. *Biochem. Pharmacol.* 72:1680–1689.
- Shi, M., K. W. Kwok, and J. Y. Wu. 2007. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 46:191–196.
- Takahashi, K., X. Ouyang, K. Komatsu, N. Nakamura, M. Hattori, A. Baba, and J. Azuma. 2002. Sodium tanshinone IIA sulfonate derived from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) attenuates hypertrophy induced by angiotensin II in cultured neonatal rat cardiac cells. *Biochem. Pharmacol.* 64:745–749.
- Wang, A. M., S. H. Sha, W. Lesniak, and J. Schacht. 2003. Tanshinone (*Salviae miltiorrhizae* extract) preparations attenuate aminoglycoside-induced free radical formation *in vitro* and ototoxicity *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1836–1841.
- Yuan, S. L., X. J. Wang, and Y. Q. Wei. 2003. Anticancer effect of tanshinone and its mechanisms. *Chin. J. Cancer* 22:1363–1366.
- 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.

Effect of Nitrogen Source on Biomass and Tanshinone Production of *Salvia miltiorrhiza* in Hairy Root Culture¹

Hsiao-Sung Chan², Tzu-Ting Lo², Uei-Chern Chen³, Chi-Ni Hsia^{3,4}, and

Hsin-Sheng Tsay²

Abstract

Chan, H. S., T. T. Lo, U. C. Chen, C. N. Hsia, and H. S. Tsay. 2012. Effect of nitrogen source on biomass and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:100–111.

There is a new tendency to produce secondary metabolites of plants in tissue culture, using fast growing hairy roots. The objective of this study was to investigate effect of potassium nitrate (KNO₃) and ammonium sulfate [(NH₄)₂SO₄] in the culture medium on growth of hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and production of tanshinone. Roots of *S. miltiorrhiza* were grown in a modified B5 medium at 70 rpm on a shaker under darkness for eight weeks and data were collected. Results showed that growth of hairy roots varied with concentrations of KNO₃ in the medium and the optimum concentration of KNO₃ was 12.4 mM, which resulted in maximum production of root biomass (8.90 g dw/L). However, the highest tanshinone content was obtained in the culture containing 37.1 mM KNO₃, representing a 2-fold increase in tanshinone production, compared to the control concentration of 24.7 mM KNO₃ in the B5 medium. When hairy roots were cultured in the B5 basal medium containing different concentrations of (NH₄)₂SO₄ from 0 to 2.5 mM, the maximum production of root biomass (10.25 g dw/L) was the B5 medium without (NH₄)₂SO₄. Although growth of hairy roots was inhibited by (NH₄)₂SO₄ at all the concentrations (0.5–2.5 mM) tested, an increase in tanshinone contents was observed in the treatment of (NH₄)₂SO₄ at lower concentration of 0.5 mM. The tanshinone production in the treatment of 0.5 mM (NH₄)₂SO₄ was 4.1-fold higher than the treatment of 1.0 mM (NH₄)₂SO₄ representing the control concentration of (NH₄)₂SO₄ in the B5 medium. Since root growth was found inhibited by (NH₄)₂SO₄ in the B5 medium, in subsequent experiment hairy roots were grown in the B5 medium without (NH₄)₂SO₄ for 4 weeks before adding 1.0 mM or 2.0 mM (NH₄)₂SO₄ for another 4 weeks culturing. This two-stage model [weeks 1–4 without (NH₄)₂SO₄ and weeks 5–8 with 1.0 mM (NH₄)₂SO₄] increased root biomass of *S. miltiorrhiza* by 1.3 fold and tanshinone production by 2.2 fold, compared to the control treatment of 1.0 mM (NH₄)₂SO₄ in the B5 medium for the entire culturing period of 8 weeks. In conclusion, biomass and tanshinone production in hairy root culture of *S. miltiorrhiza* were

-
1. Contribution No. 2664 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: May 24, 2012.
 2. Respectively, Assistant Professor, Graduate Student, and Professor, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Researcher and Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.

affected significantly by nitrogen sources in the B5 medium. Increasing concentration of KNO_3 , reducing concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the B5 medium or using the two-stage model of application of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is useful in enhancing biomass as well as tanshinone production in hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*, Hairy root, Tanshinone, Nitrogen sources, Two-stage feeding model.