



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103459589 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 18

(21) 申请号 201280015214. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 02. 06

C12N 5/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/02 (2006. 01)

61/439, 675 2011. 02. 04 US

C07G 99/00 (2009. 01)

C07D 311/62 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 09. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2012/024008 2012. 02. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02012/106723 EN 2012. 08. 09

(71) 申请人 戴安娜植物科学有限公司

地址 法国雷恩

(72) 发明人 尹圣镛 索尼娅·拉尔

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

权利要求书5页 说明书15页 附图5页

(54) 发明名称

通过欧洲越橘细胞培养物制备多酚

(57) 摘要

本发明公开了被构造为在液体培养基的悬浮培养物中生长的欧洲越橘 (*Vaccinium myrtillus*) 的细胞培养物。所述细胞源自一个或多个欧洲越橘植物部分, 例如可食用的植物部分 (如, 叶部分或浆果部分) 或茎部分。所述细胞适于在相对短的一段时间 (如, 约 7 天) 内生长至高密度。此外, 所述细胞适于产生高浓度的多酚和 / 或原花青素, 并且基本上不含花青素。本发明还公开了用于从生长在悬浮培养物中的欧洲越橘细胞制备多酚和 / 或原花青素的方法。

1. 一种细胞培养物,其包含:

在悬浮细胞培养物中的多个易碎欧洲越橘 (*Vaccinium myrtillus*) 细胞,所述细胞源自下列中的一者或多者:

幼苗的子叶下轴、子叶、叶段、茎段或根段;或

成熟植株的浆果、包括节点或节间的茎段、或叶段,

其中所述多个欧洲越橘细胞被挑选为能够在 7 天生长内获得至少 55% 的收集细胞体积,并且

其中所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 5% 由原花青素构成。

2. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述浆果包括浆果皮。

3. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10%、15% 或 20% 由多酚构成。

4. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量的至少 7.5% 由原花青素构成。

5. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量的至少 10% 由原花青素构成。

6. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量的至少 15% 由原花青素构成。

7. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量包含少于 0.5% 花青素。

8. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量包含少于 0.1% 花青素。

9. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量包含少于 0.01% 花青素。

10. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量包含少于 0.001% 花青素。

11. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述悬浮细胞培养物中的所述细胞源自欧洲越橘的细胞愈伤组织。

12. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述悬浮细胞培养物包括细胞的颗粒悬浮液。

13. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述悬浮细胞培养物包括细胞的微细粒悬浮液。

14. 根据权利要求 1 所述的细胞培养物,其中所述悬浮细胞培养物中的所述多个易碎欧洲越橘细胞源自可食用植物部分。

15. 根据权利要求 14 所述的细胞培养物,其中所述可食用植物部分为叶部分或浆果部分中的一者或多者。

16. 一种细胞培养物,其包含:

在悬浮细胞培养物中的多个易碎欧洲越橘细胞,所述细胞源自可食用植物部分,

其中所述多个欧洲越橘细胞被挑选为能够在 7 天生长内获得至少 55% 的收集细胞体积,并且

其中所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10%、15% 或 20% 由多酚构成,并且所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 5% 由原花青素构成。

17. 根据权利要求 16 所述的细胞培养物,其中所述可食用植物部分为叶或浆果中的一者或多者。

18. 根据权利要求 16 所述的细胞培养物,其中所述浆果包括浆果皮。

19. 一种细胞培养物,其包含:

在悬浮细胞培养物中的多个易碎欧洲越橘细胞,所述细胞源自浆果的至少一部分,

其中所述多个欧洲越橘细胞被挑选为能够在 7 天生长内获得至少 55% 的收集细胞体积,并且

其中所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10%、15% 或 20% 由多酚构成,并且所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 5% 由原花青素构成。

20. 根据权利要求 19 所述的细胞培养物,其中所述浆果部分包括浆果皮。

21. 一种制备欧洲越橘细胞的细胞培养物的方法,所述方法包括:

制备源自下列中的一者或多者的欧洲越橘细胞的细胞愈伤组织:

幼苗的子叶下轴、子叶、叶段、茎段或根段;或

成熟植株的浆果、包括节点或节间的茎段、或叶段;

将源自所述愈伤组织的一个或多个细胞引入液体培养基内;

搅拌所述液体培养基中的所述一个或多个细胞;

用新鲜的液体培养基替换所述液体培养基或将所述细胞转移至新鲜液体培养基,以形成欧洲越橘的悬浮细胞培养物;

使欧洲越橘的所述悬浮细胞培养物生长到至少 55% 的收集细胞体积;以及

挑选这样的悬浮细胞培养物,其中所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10%、15%、20% 由多酚构成,且所述细胞干质量的至少 5% 由原花青素构成。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述欧洲越橘细胞源自可食用植物部分。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述可食用植物部分为叶或浆果中的一者或多者。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述浆果包括浆果皮。

25. 根据权利要求 20 所述的方法,还包括使欧洲越橘的所述悬浮细胞培养物在 7 天时间或更短时间内生长到至少 55% 的收集细胞体积。

26. 根据权利要求 21 所述的方法,还包括使欧洲越橘的所述悬浮细胞培养物在 7 天时间或更短时间内生长到至少 60% 的收集细胞体积。

27. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述多个欧洲越橘细胞的所述干质量的约 10% 由原花青素构成。

28. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述多个欧洲越橘细胞包含少于约 0.1% 花青素。

29. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述多个欧洲越橘细胞基本上不含花青素。

30. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述生长在黑暗状态中进行。

31. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述生长在环境温度条件下进行。

32. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述生长在 23°C +/-5°C 进行。

33. 根据权利要求 21 所述的方法,还包括形成细胞的颗粒悬浮液。
34. 根据权利要求 21 所述的方法,还包括形成细胞的微细粒悬浮液。
35. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述液体培养基选自 VM1799、VM1831、VM1933 和 DC1151。
36. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述搅拌通过旋转式摇床进行。
37. 根据权利要求 21 所述的方法,其中每周加入所述新鲜液体培养基或将所述细胞转移至所述新鲜液体培养基。
38. 根据权利要求 21 所述的方法,还包括测量所述悬浮培养物中的所述细胞消耗碳水化合物的速率。
39. 根据权利要求 38 所述的方法,其中通过折射率 (RI) 测量消耗碳水化合物的所述速率。
40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中当所述 RI 小于或等于所述新鲜培养基的初始 RI 的二分之一时,向悬浮培养中的所述细胞加入额外的新鲜培养基。
41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中在继代培养之后的第 6 天测量 RI 和细胞质量,并且进行液体培养基更换。
42. 一种增加欧洲越橘细胞在悬浮细胞培养物中的生长的方法,所述方法包括:
提供欧洲越橘细胞的悬浮细胞培养物;
在悬浮培养中在液体培养基中培养所述细胞;以及
挑选具有大于 45% 的收集细胞体积 (PCV) 的悬浮细胞培养物。
43. 根据权利要求 42 所述的方法,还包括挑选具有响应于所述液体培养基中糖浓度的提高而增加的多酚和 / 或原花青素积聚的悬浮细胞培养物。
44. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述液体培养基中的所述糖浓度包括大约 30-60g/L 蔗糖。
45. 根据权利要求 43 所述的方法,其中原花青素在悬浮培养物中的所述细胞内的积聚从 20g/L 蔗糖下的 1-2g/L PCV 增至 30g/L 蔗糖下的 3-7g/LPCV,并且其中多酚在悬浮培养物中的所述细胞内的积聚从 20g/L 蔗糖下的 2-4g/L PCV 增至 60g/L 蔗糖下的 5-10g/L PCV。
46. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述培养为约 7 天。
47. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述提供的细胞最初具有 15%PCV 至 25%PCV 的起始细胞密度。
48. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述提供的细胞最初具有 25%PCV 或更大的起始细胞密度。
49. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述提供的细胞最初具有 20%PCV 或更大的起始细胞密度。
50. 根据权利要求 42 所述的方法,还包括挑选具有大于 50%PCV 的悬浮细胞培养物。
51. 根据权利要求 42 所述的方法,还包括挑选具有大于 55%PCV 的悬浮细胞培养物。
52. 根据权利要求 42 所述的方法,还包括挑选具有大于 60%PCV 的悬浮细胞培养物。
53. 根据权利要求 42 所述的方法,还包括弃去超过 7 天才能达到 45%PCV 的培养物。
54. 一种提高培养物中的欧洲越橘细胞的多酚产量的方法,所述方法包括:
挑选多个适于以悬浮培养的方式生长的欧洲越橘细胞,所述欧洲越橘细胞源自下列中

的一者或多者：

幼苗的子叶下轴、子叶、叶段、茎段或根段；或

成熟植株的浆果、包括节点或节间的茎段、或叶段；

在存在足量糖的情况下以悬浮培养的方式培养所述欧洲越橘细胞以提高多酚产量。

55. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述欧洲越橘细胞的干质量的至少 10%、15% 或 20% 由多酚构成。

56. 根据权利要求 54 所述的方法，还包括在具有大于 20g/L 糖的液体培养基中以悬浮培养的方式培养所述细胞。

57. 根据权利要求 54 所述的方法，还包括在具有 20g/L 至 30g/L 糖的液体培养基中以悬浮培养的方式培养所述细胞。

58. 根据权利要求 54 所述的方法，还包括在具有大于 30g/L 糖的液体培养基中以悬浮培养的方式培养所述细胞。

59. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述糖为蔗糖。

60. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述糖为葡萄糖。

61. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述糖以足以使多酚产量增至超过 3g/L 收集细胞体积 (PCV) 的量存在。

62. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述糖以足以使多酚产量增至至少 7g/L 收集细胞体积 (PCV) 的量存在。

63. 根据权利要求 54 所述的方法，其中所述多酚为原花青素。

64. 根据权利要求 54 所述的方法，还包括在黑暗状态中培养所述细胞。

65. 一种从培养物中的欧洲越橘细胞提取多酚的方法，所述方法包括：

挑选多个适于以悬浮培养的方式生长的欧洲越橘细胞，所述细胞源自下列中的一者或多者：

幼苗的子叶下轴、子叶、叶段、茎段或根段；或

成熟植株的浆果、包括节点或节间的茎段、或叶段；以及

使用溶剂从所述细胞中提取多酚，

其中所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10%、15% 或 20% 由多酚构成，并且所述多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 5% 由原花青素构成。

66. 根据权利要求 65 所述的方法，其中所述细胞为愈伤组织细胞。

67. 根据权利要求 65 所述的方法，其中所述溶剂包括丙酮。

68. 根据权利要求 65 所述的方法，其中所述溶剂包括乙酸。

69. 根据权利要求 68 所述的方法，其中所述溶剂包括 70% 丙酮 (v/v) 和 0.5% 乙酸 (v/v)。

70. 根据权利要求 69 所述的方法，其中所述溶剂还包括水。

71. 根据权利要求 65 所述的方法，包括：

在细胞匀化器中将所述细胞与所述溶剂合并；

在存在所述溶剂的情况下在所述匀化器中将所述细胞匀化，以便从所述细胞中提取所述多酚。

72. 根据权利要求 71 所述的方法，其中所述匀化器为球磨机。

73. 根据权利要求 71 所述的方法,还包括:
将所述匀化的细胞离心以制备上清液部分和沉淀部分;以及
从所述上清液获得所述提取的多酚。
74. 根据权利要求 65 所述的方法,其中从所述细胞提取的所述多酚包括原花青素。
75. 根据权利要求 65 所述的方法,其中从所述细胞提取的所述多酚基本上不含花青素。

通过欧洲越橘细胞培养物制备多酚

背景技术

[0001] 来自欧洲越橘(*Vaccinium myrtillus*) (更一般来说,称为越橘)果实的提取物长期以来用于治疗目的。在欧洲,数百年来一直使用它治疗腹泻和痢疾,以及肺部、肝脏和胃的疾病。此外,据信英国的战斗机飞行员在二战中食用越橘果酱来帮助提高其夜视力。最近以来,来自欧洲越橘植物的果实的提取物已被证实具有潜在的抗癌活性。欧洲越橘作为饮食补充剂和治疗剂两者的临床疗效归因于越橘中存在含量丰富的类黄酮和花青素。这些抗氧化化合物清除体内称为自由基的破坏性粒子,从而有助于抑制或扭转对细胞的损坏。已证实抗氧化剂可帮助抑制多种长期疾病,例如心脏疾病、癌症和黄斑变性。欧洲越橘果实还包含单宁酸,已知单宁酸可同时充当抗炎剂和收敛剂。

[0002] 多酚广泛分布于植物、水果和蔬菜中,并因其在人和动物健康中的生理功能(包括抗氧化活性、抗诱变活性和癌症预防活性)而受到了相当多的重视(Salvia et al., J. Agric. Food Chem. 39:1549-1552, 1991 (Salvia 等人,《农业和食品化学杂志》,第 39 卷,第 1549-1552 页,1991 年);Bomser et al., Cancer Lett., 135:151-157, 1999 (Bomser 等人,《癌症快报》,第 135 卷,第 151-157 页,1999 年);Zhao et al., Carcinogenesis, 20:1737-1745, 1999 (Zhao 等人,《致癌作用》,第 20 卷,第 1737-1745 页,1999 年))。流行病学研究已暗示多酚中的类黄酮可能会降低心脏疾病的风险(Hertog et al., Lancet 342:1007-1011, 1993 (Hertog 等人,《柳叶刀》,第 342 卷,第 1007-1011 页,1993 年))。另外,已显示膳食黄烷-3-醇和/或原花青素在实验动物中降低了动脉粥样硬化症和冠心病的发病率(Tijburg et al., Atherosclerosis, 135:37-47, 1997 (Tijburg 等人,《动脉粥样硬化》,第 135 卷,第 37-47 页,1997 年);Yamakoshi et al., Atherosclerosis, 142:139-149, 1999 (Yamakoshi 等人,《动脉粥样硬化》,第 142 卷,第 139-149 页,1999 年))。负责这些效果的机制之一涉及它们对于低密度脂蛋白(LDL)氧化的抑制(Steinberg, Circulation, 85:2337-2344, 1992 (Steinberg,《循环》,第 85 卷,第 2337-2344 页,1992 年))。

[0003] 越橘(*Vaccinium*)属的浆果已显示出在各种体外模型中具有自由基清除能力,所述体外模型使用氧自由基吸收能力(ORAC)、三价铁还原抗氧化能力(FRAP)、总氧化剂清除能力(TOSC)和抗 2,2-二苯基-1-苦肟基(DPPH)自由基的自由基清除能力以及在抑制亚油酸甲酯、脂质体和人类低密度脂蛋白(LDL)氧化方面的抗氧化能力的测定法(Maata-Riihinen 等人)。培植的蔓越橘(大果越橘(*V. macrocarpon* Ait.))和野生的红豆越橘包含 A 型和 B 型原花青素两者(Gu 等人、Morimoto 等人、Foo 等人),而在野生的(狭叶越橘(*V. angustifolium* Ait.))和培植的蓝莓(北高丛越橘(*V. corymbosum* L.)、兔眼越橘(*V. ashei* L.))中鉴别出的主要为 B 型原花青素(Foo 等人、Prior 等人、Schmidt 等人)。在野生的红豆越橘、蔓越橘、北欧越橘和笃斯越橘中检测到稀少的 A 型低分子量原花青素,并且其以高于更常见的 B 型原花青素的含量存在(Maata-Riihinen 等人)。已知的是稀少的 A 型原花青素充当细菌纤毛附着到内皮细胞层的阻碍物,从而帮助抑制尿路感染(Nowack 和 Schmidt; Foo 等人²)。它是已知存在于越橘中的常规抗炎剂,几十年以来一直用于治疗肠炎。另外,欧洲越橘叶具有 35 种不同的黄酮-3-醇、原花青素、黄酮醇及其糖苷,以及各种

酚酸共轭物(Hokannen 等人)。

[0004] 欧洲越橘难以生长,因此很少培植。因此,一般在野生植株有限的生长期(五月至九月)内采集其果实,该有限的生长期必须既潮湿又温暖。由此,浆果的供应是不可靠的,并且可获得的浆果数量有限。此外,与相关的蓝莓相比,该果实更软且更多汁,使得其必须手工收获,并且运输难度大,这就导致从欧洲越橘植株收获的新鲜果实成本高昂。另外,由于对成熟果实的要求高,所以未成熟的果实和叶子不是要收集的经济上可行的产物。这些是植株中含有最高量的原花青素的部分。根据欧洲越橘的临床疗效和培植这些植物的难度,需要开发出一种针对这些植物的细胞的持续性体外培养系统。

发明内容

[0005] 本发明涉及被构造为在液体培养基的悬浮培养物中生长的欧洲越橘的细胞培养物。所述细胞源自一个或多个欧洲越橘植物部分,例如可食用的植物部分(如,叶部分或浆果部分)或茎部分。细胞适于在相对短的一段时间(如,约 7 天)内生长至高密度。此外,细胞适于产生高浓度的多酚和 / 或原花青素,并且基本上不含花青素。还公开了用于由生长在悬浮培养物中的欧洲越橘细胞制备多酚和原花青素的方法。

[0006] 在一个实施例中,描述了细胞培养物。细胞培养物包括悬浮细胞培养物中的多个易碎欧洲越橘细胞。悬浮培养物中的细胞源自下列中的一者或多者:幼苗的子叶下轴、子叶、叶段、茎段或根段;或成熟植株的浆果、茎段(包括节点或节间)或叶段。在一个实施例中,细胞可源自可食用植物部分,例如叶部分或浆果部分。细胞被选择为能够在 7 天的生长中获得至少 55% 的收集细胞体积,其中多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10% 由多酚构成,且多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 5% 由原花青素构成。

[0007] 优选地,多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 12.5%、15%、20% 或更多由多酚构成。优选地,多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 7.5%、10%、15%、20% 或更多由原花青素构成。另外优选的是,细胞的质量基本上不含花青素。例如,优选的是多个欧洲越橘细胞的干质量包含少于 0.5%、0.1%、0.01%、0.001% 或更少的花青素。

[0008] 在另一个实施例中,描述了一种制备欧洲越橘细胞的细胞培养物的方法。该方法包括:(1) 制备源自下列中的一者或多者的欧洲越橘细胞的细胞愈伤组织:幼苗的子叶下轴、子叶、叶段、茎段或根段;或成熟植株的浆果、茎段(包括节点或节间)或叶段,(2) 将源自愈伤组织的一个或多个细胞引入液体培养基,(3) 搅拌液体培养基中的一个或多个细胞,(4) 用新鲜液体培养基替换该液体培养基或将细胞转移至新鲜液体培养基,以形成欧洲越橘的悬浮细胞培养物,(5) 使欧洲越橘的悬浮细胞培养物生长到收集细胞体积为至少 55%,以及(6) 挑选悬浮细胞培养物,其中多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10% 由多酚构成,和 / 或所述细胞的干质量的至少 5% 由原花青素构成。

[0009] 在另一个实施例中,描述了一种促进欧洲越橘细胞在悬浮细胞培养物中的生长的方法。该方法包括:(1) 提供欧洲越橘细胞的悬浮细胞培养物,(2) 在悬浮培养物的液体培养基中培养细胞,以及(3) 挑选收集细胞体积(PCV) 大于 45% 的悬浮细胞培养物。

[0010] 在一个实施例中,促进欧洲越橘细胞在悬浮细胞培养物中的生长的方法还包括挑选具有响应于液体培养基中糖浓度的增大而提高的多酚和原花青素积聚的悬浮细胞培养物。在一个实施例中,液体培养基中的糖浓度包含大约 30-60g/L 的蔗糖。在一个实施例中,

原花青素在悬浮培养物中的细胞内的积聚从 20g/L 蔗糖下的约 1-2g/L PCV 增大至 30g/L 蔗糖下的约 3-7g/L PCV。在一个实施例中,多酚在悬浮培养物中的细胞内的积聚从 20g/L 蔗糖下的约 2-4g/L PCV 增至 60g/L 蔗糖下的约 5-10g/L PCV。

[0011] 在又一个实施例中,描述了一种增加由培养物中的欧洲越橘细胞制备的多酚的方法。该方法包括:(1) 挑选多个适于在悬浮培养物中生长的欧洲越橘细胞,(2) 并且将细胞在存在足量糖的悬浮培养物中培养以增加多酚制备。

[0012] 在一个实施例中,足量的糖为具有大于 20g/L 糖、20g/L-30g/L 糖或大于 30g/L 糖的液体培养基。在一个实施例中,糖为蔗糖。在另一个实施例中,糖为葡萄糖。在一个实施例中,糖以足以使多酚制备增至超过 3g/L 收集细胞体积 (PCV) 的量存在。在另一个实施例中,糖以足以使多酚制备增至至少 7g/L 收集细胞体积 (PCV) 的量存在。

[0013] 在又一个实施例中,描述了一种从培养物中的欧洲越橘细胞提取多酚的方法。该方法包括:(1) 挑选多个适于在悬浮培养物中生长的欧洲越橘细胞,并且 (2) 使用溶剂从细胞中提取多酚,其中多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 10% 由多酚构成,且多个欧洲越橘细胞的干质量的至少 5% 由原花青素构成。

[0014] 在一个实施例中,溶剂包括丙酮、乙酸和水。在一个实施例中,溶剂包括 70% 丙酮 (v/v) 和 0.5% 乙酸 (v/v)。

[0015] 本发明的这些和其他目标以及特征通过下列说明和所附权利要求将更为完全地显现出来,或其可通过实践下文示出的权利要求而进行学习。

附图说明

[0016] 为了进一步阐明本发明的上述以及其他优点和特征,本发明主题的更具体说明将通过参考在附图中示出的其具体实施例来呈现。应当理解,这些附图仅示出本发明的示例性实施例,并且因此被认为不对其范围构成限制。本发明的主题将通过使用附图进行更具体和详细的描述和阐释,其中:

[0017] 图 1 示出了糖的消耗,其中生物质在一周内从初始的 25% 生物质增加至 50%。

[0018] 图 2 示出了在不同的摇床速度下的生长 (a)、RI (b) 和产量 (c)。将 500ml 烧瓶全部以 20%PCV 接种,并且在 6 天生长之后对 PCV、RI 和产品收得率进行测量。

[0019] 图 3 示出了荧光检测器模式下来自源于茎、子叶下轴、叶和子叶外植体的悬浮细胞的提取物的 HPLC 色谱图。标签 1 至 12 分别指原花青素的聚合度:1,单体;2,二聚体;3,三聚体;4,四聚体;5,五聚体;6,六聚体;7,七聚体;8,八聚体;9,九聚体。

[0020] 图 4 示出了荧光检测器模式下来自越橘和可可的悬浮细胞的提取物的 HPLC 色谱图。标签 1 至 12 分别指原花青素的聚合度:1,单体;2,二聚体;3,三聚体;4,四聚体;5,五聚体;6,六聚体;7,七聚体;8,八聚体;9,九聚体。该附图通过以下事实证实越橘中的峰为原花青素低聚体:2 个细胞系以相同的方式提取,并且在相同条件下运行,并且它们针对每种低聚体具有相同的保留时间。

[0021] 图 5 示出了可可 (a) 和越橘 (b) 提取物在 280nm 处的紫外吸收图案,从而证实越橘中存在原花青素且对其进行了检测。

具体实施方式

[0022] 本发明涉及被构造为在液体培养基的悬浮培养物中生长的欧洲越橘的细胞培养物。所述细胞源自一个或多个欧洲越橘植物部分,例如可食用的植物部分(如,叶部分或浆果部分)或茎部分。细胞适于在相对短的一段时间(如,约 7 天)内生长至高密度。此外,细胞适于产生高浓度的多酚和 / 或原花青素,并且基本上不含花青素。本发明的主题将通过使用以下实例进行更具体和详细的描述和阐释。

[0023] 实例

[0024] 实例 1:表面灭菌和种子萌发

[0025] 从俄勒冈州的 Horizon Herbs 公司 (Horizon Herbs, Oregon) 获得欧洲越橘种子。从俄勒冈州科瓦利斯 (Corvallis, Oregon) 的国家无性种质资源库 (National Clonal Germplasm Repository (NCGR)) 收集用于本实例以及下面的实例的欧洲越橘(爱尔兰越橘)的叶、茎段和未成熟浆果。

[0026] 将叶、茎段和未成熟浆果置于流动水中清洗 20 分钟,然后置于 75% 乙醇中清洗 1 分钟。随后将茎切成较小的片。随后将茎、叶和未成熟浆果置于 25% 次氯酸钠 (v/v) 中洗涤 15 分钟,然后置于无菌蒸馏水中清洗 5 次。

[0027] 对种子(得自俄勒冈州的 Horizon Herbs 公司 (Horizon Herbs, Oregon))进行表面灭菌,方式为:首先在 75% 乙醇中清洗 1 分钟。随后在 25% 次氯酸钠 (v/v) 中洗涤 15 分钟,然后在无菌蒸馏水中清洗 5 次。接下来使种子悬浮在 0.1% 琼脂糖中,再将其放置到 100×25mm 的培养皿上(每个平板大约 100 粒种子)。使它们在含有 7g/L 琼脂的 MS (Murashige and Skoog) 培养基 (4.43g/L) 上,在 23℃ 以及 16 小时光照和 8 小时黑暗交替的光周期下萌发 4 周。

[0028] 实例 2. 由体外生长的欧洲越橘幼苗进行愈伤组织诱导

[0029] 增殖性更强的生长和易碎愈伤组织是成功细胞系的极其重要的特性。本实例描述了经优化以引发并保持来源于体外生长的欧洲越橘幼苗的各种外植体的愈伤组织的方法和培养基条件。

[0030] 从体外生长的幼苗的子叶下轴、子叶、叶、茎段或根引发愈伤组织。将植物部分切成 5mm 的小段。除非另外指明,否则将所有培养基通过高温灭菌在 121℃ 和 15PSI (磅 / 平方英寸) 下灭菌 20 分钟。除非另外指明,否则对所有生长调节剂进行过滤灭菌并且在高温灭菌后加入。除非另外指明,否则将所有培养物保持在 25℃ 下的黑暗中。

[0031] 将外植体放置在各种愈伤组织诱导培养基(表 1)上。将平板保持在 25℃ 下的黑暗中。在将外植体放置在具有培养基 VM1445、VM1196、VM1204 和 VM1233 (VM1233 在 Madhavi et al., Plant Science, 131:95-103, 1998 (Madhavi 等人,《植物科学》,第 131 卷,第 95-103 页,1998 年)中有所描述)的平板上 2 周之后,观察到愈伤组织形成的最初迹象。愈伤组织诱导率分别为 83%、85%、85% 和 70%。然而,在培养基 VM1196 和 VM1204 (这两者均具有 24mM 硫酸铵和 8mM 硝酸钾,但具有不同的碱式盐 - 分别为无氮 MS 基础盐和改良的 B5 主盐(表 1)) 上制备的愈伤组织比在具有 1mM 硫酸铵和 24mM 硝酸钾的培养基 (VM1445) 上制备的愈伤组织更柔软。在培养基 VM1233 (Madhavi et al., Plant Science, 131:95-103, 1998 (Madhavi 等人,《植物科学》,第 131 卷,第 95-103 页,1998 年)) 上制备的愈伤组织非常致密并且不具有增殖性。Madhavi 等人示出了在该培养基上将愈伤组织继代培养三个继代培养周期(各自间隔三周),然而在该参考文献中未对该培养基上的愈伤组织的品质进行讨论。使用

Madhavi 等人的条件继代培养愈伤组织产生了与如该参考文献中所述的那些相同的初始结果,但应当注意,每进行一次继代培养,愈伤组织就变得更坚硬且更不具有增殖性。因此,使用培养基 VM1233 的愈伤组织的品质随着逐次进行继代培养而降低。从 VM1233 培养基中移除聚乙烯基吡咯烷酮(PVP;培养基 VM1204)有助于使愈伤组织变得柔软。在培养基 VM1491 和 DC1152 上,分别为 50% 和 10% 的外植体产生供应充足的愈伤组织。每 3 周将外植体和愈伤组织转移到新鲜的培养基上。一旦将愈伤组织与外植体分离,就每 2 周对增殖性很强的愈伤组织进行一次继代培养。选择快速生长的细胞系进行继代培养。连续继代培养有助于将愈伤组织的形态更改为更为理想的易碎形态。

[0032] 在具有较多硫酸铵和较少硝酸钾的培养基上持续进行继代培养导致愈伤组织因为应力而变为深褐色,且最终停止生长。这从以下事实可明显看出:具有正常浓度 Gamborg B5 (B5) 培养基但不具有硫酸铵或硝酸钾的培养基 VM1445 未显示褐变和最终死亡。由于不期望的愈伤组织发生褐变,所以在 9 周之后停止使用培养基 VM1196 和 VM1204。对多种培养基(表 1)进行试验,以便表征将支持愈伤组织可持续生长而不发生褐变和最终死亡的培养基。具有正常浓度 MS 盐的培养基 VM1516 显示出增殖性很强且可持续的生长。当将 VM1445 和 VM1516 进行比较时,VM1516 产生增殖性最强的愈伤组织并且还有助于将形态从致密更改为颗粒状并最终成为易碎的愈伤组织。培养基 VM1516 还证明可以最佳地可持续维持源自欧洲越橘幼苗的愈伤组织。VM1516 还被证实对于引来自各种欧洲越橘幼苗外植体的新愈伤组织而言是最佳的培养基,其引发成功率为 83%。

[0033] 实例 3:从收集自 NCGR 的欧洲越橘组织进行愈伤组织诱导

[0034] 本实例描述了用于从源自田间生长的欧洲越橘植株的各种外植体(源自浆果、节点、节间或叶)引发并维持愈伤组织的方法和培养基配方。

[0035] 如上所述对成熟的叶和茎以及未成熟浆果进行表面灭菌。将植物部分切成较小的 5mm 小段,然后外植到培养基 VM1516 和 VM1491 内。在无菌条件下将浆果切开,并且将外皮置于具有培养基的培养板上。在进行外植之前移除任何浆果肉。

[0036] 将培养板保持在 25°C 下的黑暗中。通常,在最初将材料外植在 VM1516 上 4 周且在 VM1491 上 6 周之后观察到愈伤组织。参照叶外植体,整体愈伤组织诱导率为 53%。在 VM1491 中以及在培养基 VM1516 中产生了来自叶外植体的愈伤组织(在 VM1491 中最初外植体的 73% 且在 VM1516 中最初外植体的 76% 产生了愈伤组织),并且在培养基 VM1672 和 TC1596 中未观察到愈伤组织。据观察,在 VM1516 中产生的愈伤组织比在 VM1491 中产生的愈伤组织更为茁壮。参照节点,那些外植体中的 47% 在 VM1516 中产生了愈伤组织。将节间置于 3 种不同的培养基 VM1516、VM1491 和 TC1596 上。在 VM1516 上,外植体的 51% 产生了愈伤组织,而在 VM1491 上仅有 20% 产生了愈伤组织,并且在 TC1596 上任何外植体均未产生愈伤组织。在来自浆果的外植体中,有 59% 在 VM1516 上产生了愈伤组织。

[0037] 每 3 周在 VM1516 上对源自欧洲越橘组织的愈伤组织进行继代培养。该愈伤组织具有很强的增殖性,并且挑选易碎的细胞系进行进一步维持。将源自这些组织的愈伤组织置于培养基 VM1516 上维持超过八个月,并且已证实增殖的一致性,且愈伤组织的品质未发生改变。

[0038] 实例 4:由源自欧洲越橘幼苗的愈伤组织产生悬浮液

[0039] 选择如实例 2 中所述产生的易碎细胞系,用于引发悬浮液。细胞悬浮液的制备方

式如下：将 1g（大约）新鲜的 2 周大欧洲越橘幼苗愈伤组织（如实例 2 中所述制备）引入 125ml 无菌锥形瓶中的 15ml 液体培养基（VM1799、VM1831 或 DC1151；表 2）内。用无菌硅（泡沫）顶盖覆盖住锥形瓶，随后置于旋转摇床中以 120 转 / 分钟（rpm）进行摇动。将悬浮液保持在 23℃ 下的黑暗中。为了形成细胞培养物，每周移除废培养基并加入新鲜培养基以进行两次继代培养。通过测量培养基的折射率（RI） Δ 值（如通过白利度（BRIX）（即，% 白利度）进行测量）得出碳水化合物的消耗速率，以此来测量细胞生长。如果 RI 小于或等于培养基初始 RI 的二分之一，则向细胞中加入新鲜培养基。如果 RI 大于二分之一，则在 2 周之后才加入新鲜培养基。每周或者每两周按需转移继代培养物。

[0040] 保留作为细胞的颗粒悬浮液或者细小悬浮液形成的培养物，而弃去不形成悬浮培养物的培养物。一旦形成了悬浮培养物（3 至 4 个继代培养周期），就每周将 25-35% 的细胞转移至装有新鲜培养基的烧瓶。在每次继代培养时记录收集细胞体积（PCV）和 RI，以测量细胞生长。

[0041] 由愈伤组织引发悬浮液后，在 6 次继代培养内获得了可持续的稳定悬浮液。

[0042] 实例 5：由源自从 NCGR 采集的欧洲越橘组织的愈伤组织产生悬浮液

[0043] 选择易碎的细胞系以引发悬浮液。细胞悬浮液的制备方式如下：将欧洲越橘愈伤组织（如实例 3 中所述由节点、节间、叶和浆果制备）引入无菌锥形瓶中的液体培养基（VM1933；表 2）内。用无菌硅（泡沫）顶盖覆盖住锥形瓶，随后置于旋转摇床中以 120 转 / 分钟（rpm）进行摇动。将悬浮液保持在 25℃ 下的黑暗中。为了形成细胞培养物，移除废培养基并且加入新鲜的 VM1933 培养基。通过测量培养基的折射率（RI） Δ 值得出碳水化合物的消耗速率，以此来测量细胞生长。如果 RI 小于或等于培养基初始 RI 的二分之一，则向细胞中加入新鲜培养基。如果 RI 大于二分之一，则在 2 周之后才加入新鲜培养基。

[0044] 实例 6：细胞生长的优化

[0045] 本实例描述用于增加悬浮物的细胞生长的方法。细胞培养物产率随细胞生长的速率和细胞生长停止时的密度而增加。为了确定最佳接种密度，用产生 15% 收集细胞体积（“PCV”）和 25%PCV 的起始细胞密度的接种量引发欧洲越橘细胞的悬浮培养物并且允许其生长 7 天。以 15%PCV 的细胞密度引发的培养物在 7 天内没有达到最大密度。在培养基 VM1831（表 1）中以 25%PCV 的细胞密度引发的培养物在 7 天内密度（即，总细胞体积）倍增，并且在 7 天内达到 45-50%PCV 的最大平均细胞密度，且一些细胞系培养物在第 7 天显示超过 55-60%PCV。挑选细胞有助于捕集在 7 天或更短时间内达到 45%PCV 或更大 PCV 的培养物（快速生长的细胞培养物）。弃去超过 7 天才能达到 45%PCV 的培养物。

[0046] 精心选择在多代中均显示出较高糖消耗和良好生长（图 1）的细胞之后，当首先用 25% 种菌接种到烧瓶中时，观察到第 7 天的最终细胞密度非常高（PCV 为约 65.8 ± 0.63 ）。这使得细胞不能在工作体积为 40ml 的 125ml 烧瓶中被适当摇动。因此，一旦通过细胞选择方法改良了细胞系，就再次需要对接种量进行优化。对倍增时间的计算表明 20%PCV 的接种将在第 7 天产生约 60% 的最终 PCV。实验数据支持这一点，并且显示最终 PCV (59.9 ± 0.77) 中存在显著的差异 ($P=0.008$) 但对产量或产率无有害影响 ($P=0.39$)。从而将接种量更改为 20%PCV。

[0047] 实例 7：通过悬浮细胞培养物的细胞选择和培养基优化对来自越橘悬浮液的多酚制备进行优化

[0048] 在优化生长之后,通过更改用于细胞选择的培养基配方和额外标准而实现多酚制备的改善。

[0049] 培养物中的碳水化合物消耗迅速,且培养物在第 7 天时达到 0-0.6 的 RI。多酚和/或原花青素在 VM1831 中产生较慢,这可能是由于糖饥饿。培养基 VM1831 具有 20g/L 的蔗糖。通过调整碳水化合物含量以使培养物保持无营养饥饿状态,从而优化液体培养基。用 30g/L 蔗糖配制新培养基 VM1933 (表 1),以避免细胞出现糖饥饿。在该培养基中,RI 下降至介于 0.8 和 1.0 之间。在 4 次继代培养内,多酚的产值从 20g/L 蔗糖下的约 2-4g/L PCV 上升至 60g/L 蔗糖下的约 5-10g/L PCV,并且可保持在较高产量水平。在 4 次继代培养内,原花青素的产值从 20g/L 蔗糖下的约 1-2g/LPCV 上升至 30g/L 蔗糖下的约 3-7g/L PCV,并且可保持在较高产量水平。

[0050] 细胞选择过程使得多酚和原花青素的产量水平能够进一步提高,在该过程中选择在每次继代培养时均产生了高于由高通量量化的平均多酚的烧瓶。

[0051] 实例 8:在来自越橘幼苗的各个部分的悬浮液中检测并确认多酚和原花青素的产量

[0052] 在本实例中,证实了已经能够从如实例 4 和 5 中所述由植物的所有部分(根、子叶下轴、浆果、子叶、茎和叶)制备的悬浮液中产生原花青素。图 3 示出了显示各种来源的色谱图。还能够确认,通过用已确认的可可原花青素色谱图(图 4)覆盖,我们所看到的为原花青素,该色谱图示出的每种低聚体的保留时间与可可色谱图中的相应物质保留时间一致,且还示出了越橘中存在的二聚体、三聚体和四聚体的额外异构体。另外,在 280nm 处运行紫外吸收显示的图案与可可类似,并且还确认了原花青素的存在(图 5)。

[0053] 实例 9:从越橘属愈伤组织培养物和悬浮培养物提取多酚

[0054] 本实例描述被开发用于从实例 1 至 5 中开发的越橘属培养物的愈伤组织和悬浮细胞中提取多酚的方法。使用 0.4ml 含有 0.5% 乙酸的 70%(v/v) 丙酮,从得自悬浮物的大约 0.4ml 新鲜细胞中提取多酚。使用如下所述的稳定高通量方法:对于要分析细胞培养物的每个烧瓶,首先记录样品的收集细胞体积(PCV),再将 0.4ml 样品转移到 96 深孔板内。用塑料转移吸管将每个孔的上清液移除并弃去。接下来,将 0.4ml 提取溶剂(70% 丙酮、29.5% 水、0.5% 乙酸)和碳化钨珠加入每个孔中,随后将板置于混磨机上,以 18Hz 将细胞研磨 4 分钟。随后将板置于离心机中,并以 6000rpm 离心 4 分钟以使细胞与提取物分离。

[0055] 实例 10:培养物中的多酚产量的初步分析

[0056] 用于进行原花青素分析反应的方法被设计成非常近似地模拟原始的 Swain 和 Hillis (J. SCI. Food Agric. 10:63, 1959 (《食品和农业科学杂志》,第 10 卷,第 63 页,1959 年))方法和 Porter 等人 (Phytochemistry, 25(1):223, 1986 (《植物化学》,第 25 卷第 1 期,第 223 页,1986 年))方法。使用丁醇-HCl 提取测定法来测量欧洲越橘悬浮细胞的提取物中的多酚。通过将 0.1ml 的含水丙酮提取物和 1.0ml 的丁醇-HCl 试剂(95:5v/v)进行结合并且将该溶液在凯杰公司 (Qiagen) 深孔块(美国加州瓦伦西亚 (Valencia, CA, USA))中于 75℃ 下加热 60 分钟,使多酚水解成(-)-表儿茶素和花青素单体。通过粉红色颜色的形成观察到花青素在水解样品中的存在。测定 520nm 处的吸光度,并使用校准曲线基于所形成的花青素的量计算原花青素含量,所述校准曲线是使用不同浓度的原花青素 B2 (购自美国加州欧文市的 CDX 有限公司 (Chromadex, Inc., Irvine, CA))产生的。更亮的粉红色表示

悬浮培养物中存在更高浓度的原花青素。基于这个方法,几个悬浮培养物的原花青素含量在 1g/L 至 10g/L 的范围内。

[0057] 越橘细胞提取物的多酚总含量使用福林-乔卡梯奥 (Folin-Ciocalteu) 测定法(Slinkard, K.; Singleton, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. American Journal of Enology and Viticulture 1977, 28:49-55 (Slinkard, K.; Singleton, V. L., “酚总量分析:自动操作和利用手工方法进行比较”,《美国酿酒学与葡萄栽培学杂志》,1977 年,第 28 卷,第 49-55 页))进行测量。取出 25 μ l 提取物并将其加入 0.975ml 的水中,以便在开始测定之前对样品进行稀释,从而对在含有 0.5% 乙酸的 70% 丙酮中的细胞培养物提取物进行多酚总含量分析。为了对多酚定量,将 20 μ l 经稀释的提取物添加到 0.790ml 水加上 50 μ l 福林-乔卡梯奥试剂中。然后通过加入 150 μ l 碳酸钠溶液终止反应。所得的溶液在 765nm 处测量,并与通过相同测定法测量的没食子酸溶液的多个稀释液的校准曲线进行比较,以测定细胞提取物中的总多酚的浓度。

[0058] 实例 11:从新鲜的越橘细胞或者经研磨的冻干细胞小规模提取多酚

[0059] 取无培养基的越橘细胞样品 (0.5ml) 或者 50mg 经研磨的越橘细胞样品,放在 96 孔块(凯杰有限公司 (Qiagen, Inc)) 中的 2.0ml 微管或者 1.2ml 管中。向每种越橘细胞样品中加入适当体积的酸性 (0-2% 的柠檬酸、乙酸或者抗坏血酸) 含水提取溶剂 (30-80% 的丙酮、乙醇、甲醇),然后放入超声发生器或者珠磨机 (BeadMill) 中以提取多酚和 / 或原花青素。将样品在 6000rpm (RCF5996) 下离心 4 分钟。使上清液滤过 0.45 μ m 膜过滤器,并在分析前用相同的含水提取溶剂稀释 10 倍(如果需要)。剩余的提取物保藏在 -20℃ 的冷冻机中以便进一步分析。

[0060] 实例 12:对越橘培养物中产生的原花青素进行分析

[0061] 使用 Waters (美国马萨诸塞州米尔福德市 (Milford, Massachusetts, USA)) Alliance HPLC 系统对越橘细胞提取物进行 LC 分析,该系统装配有 CTC Analytics PAL 自动进样器(美国北卡罗来纳州卡勃罗市的 Leap Technologies 公司 (Leap Technologies, Carrboro, NC, USA))、带 600S 控制器的 Waters626 泵和从 190-780nm 扫描的 Waters2996 光电二极管阵列检测器 (PDA)。用水 -0.1% 甲酸(溶剂 A) 和乙腈 -0.1% 甲酸(溶剂 B) 以 0.3ml/ 分钟的恒定流速进行梯度洗脱。以溶剂 B 的以下比例 (v/v) 施加线性梯度 (t (min), %B) : (0, 7), (5, 15), (20, 75), (25, 100), (35, 100), (35.1, 7) (45, 7)。色谱柱为 Ultra Aqueous C18 柱 (100 $\times$ 2.1mm 内径, 3.5 μ m) (美国宾夕法尼亚州贝尔丰特的瑞斯泰克公司 (Restek, Bellefonte, PA, USA))。于 280nm 处监测原花青素单体 (+)-儿茶素、(-)-表儿茶素和低聚原花青素(二聚体至六聚体)。使用 Waters Quattro Micro 三重四极杆质量检测器(美国马萨诸塞州米尔福德市) 获取 MS 数据,并通过 MassLynx™ 软件进行分析。从 m/z150 到 1800 扫描,进行全扫描数据采集。从美国密苏里州圣路易斯市 (St. Louis, MO) 的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO)) 购得儿茶素、表儿茶素的可靠标准品,并且制备稀释液以创建校准曲线,从而对代谢物进行检测和定量。

[0062] 通过正相 HPLC 系统进行可定量的原花青素的分析,该系统由 Waters2795 分离模块、Waters996PDA 检测器和 Waters474 扫描荧光检测器组成。使用 Develosil Diol (250 $\times$ 4.6mm 内径, 5 μ 粒度), 按改编自 Kelm et al., the improved process for analyzing for separating, and for isolating polar protic monomers and/or

oligomers. (Kelm 等人,“用于分析、分离和离析极性质子单体和 / 或低聚体的改进方法”) (美国专利 No. 0075020) 的方法,获得越橘细胞提取物中原花青素的表征和分离条件。二元流动相由溶剂 (A) 乙腈 : 乙酸 (98:2, v/v) 和溶剂 (B) 甲醇 : 水 : 乙酸 (95:3:2, v/v/v) 组成。用 0.8ml/min 流速在 30℃ 下如下进行线性梯度洗脱 : 0-35min, 100-60%A ; 35-40min, 60%A ; 40-45min, 60-100%A。通过荧光检测 (276nm 激发波长, 316nm 发射波长)、280nm 紫外检测 (图 10A) (Lazarus et al. J. Agric. Food Chem. 47(1999), 3693 (Lazarus 等人,《农业和食品化学杂志》,第 47 卷,1999 年,第 3693 页)) 和 PDA (图 10B) 监测原花青素低聚体的分离。

[0063] 分析方法的目的是检测十种不同的单独原花青素在新鲜越橘细胞或冻干细胞中的存在。可检测的原花青素有单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体和十聚体。

[0064] 通过在 Empower2 上执行内部 HPLC 方法,使用由可可豆进行内部制备的原花青素标准品对由新鲜越橘细胞、冻干越橘细胞和越橘细胞提取物制备的样品进行原花青素估算的分析。

[0065] 实例 13 : 越橘悬浮培养物的扩大培养

[0066] 使用植物细胞培养物的一个普遍问题是获得目标产物的持续产生 (Kim et al., Biotechnol Prog. 20(6) 1666, 2004 (Kim 等人,《生物技术进展》,第 20 卷第 6 期,第 1666 页,2004 年))。因此,成功的大规模植物细胞培养的一个关键是维持稳定的产率。成功进行将越橘细胞培养物的悬浮液从 125ml 烧瓶扩大培养至 250ml 烧瓶、随后至 500ml 烧瓶的过程。针对 500ml 烧瓶优化摇床的速度,以提供如在 125ml 烧瓶中那样相同种类的生长和制备次数。测试了三种不同的摇床速度 -100、110 和 120RPM。七天内的平均 PCV 为 50-55%,其针对所有处理而言增大到初始 PCV 水平 (20%) 的约 2.5 倍。然而,与 100RPM (此时 P 值为 0.005) 比较时,110RPM 下的产品收得率 (PY) 明显要高得多。虽然当摇床速度介于 110RPM 和 120RPM 之间时 PY 的差异不明显,但 120RPM 烧瓶中的颜色稍微较暗,从而导致针对 500ml 烧瓶选择 110RPM 作为优选的摇床速度。在培养中每 7 天测量生物质、培养基中糖浓度以及多酚和 / 或原花青素产率。

[0067] 验证扩大培养至 2.8L 烧瓶的可行性,此时对摇动速度 (rpm) 和摇床冲程大小进行优化。这成功地产生了如在 125ml 和 500ml 烧瓶中那样类似的生长和制备。

[0068] 表 1

[0069]

	VM1196	VM1204	VM1445	VM1222	VM1233	VM1491	VM1672
MS 盐(g/L) (Phytotech 目录号 M524) (g/L)							4.33
Gamborg B5 盐 (g/L) (Phytotech 目录号 G768)			3.1			3.1	
无氮 MS 基础盐 (g/L) (Phytotech 目录号 M531)	0.788						
改良的 B5 主盐 ¹ (ml/L) (20×) (EPS 000210-表 6)		50		50	50		
B5 微量盐(ml/L) (1000×) (EPS 0004-表 7)		1		1	1		
MS 维生素(ml/L) 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 M533)							
硫酸铵(mg/L)	3308						
硝酸钾(mg/L)	808						
Nitsch and Nitsch 1 (NN)维生素(ml/L) 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 N608)	1						1
B5 维生素(ml/L) 1000× 储备溶液 (Phytotech 目录号 G249)		1	1	1	1	1	
硫酸亚铁螯合溶液 (100×) ml/L (Phytotech 目录号 F318)	5	5	5	5	5		
蔗糖 g/L	20	20	20	20	20	20	20
琼脂 g/L	7	7	7	7	7	7	7
Phytigel g/L							
椰子汁 (Phytotech 目录号 C195)	100	100	100	100	100		
酪蛋白水解产物 g/L						2	2
聚乙烯基吡咯烷酮 PVP-10 (mg/L)					100		
1-萘乙酸 (NAA) (mg/L)	1	1	1		1		
2,4-D (mg/L)	0.1	0.1	0.1	1.0	0.1	1	1

[0070]

	VM1196	VM1204	VM1445	VM1222	VM1233	VM1491	VM1672
激动素(mg/L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1

[0071] 表 1 (续)

[0072]

	VM1443	VM1448	DC1152	VM1707	VM1516
MS 盐(g/L) (Phytotech 目录号 M524) (g/L)			4.33	4.33	4.33
Gamborg B5 盐(g/L) (Phytotech 目录号 G768)					
无氮 MS 基础盐(g/L) (Phytotech 目录号 M531)	0.788	0.788			
改良的 B5 主盐(ml/L) (20×)(EPS 000210 -表 6)					
B5 微量盐(ml/L) (1000×)(EPS 0004 -表 7)					
MS 维生素(ml/L) 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 M533)					
硫酸铵(mg/L)	1321	134			
硝酸钾(mg/L)	808	808			
NN 维生素(ml/L) 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 N608)	1	1	1	1	1
B5 维生素(ml/L) 1000× 储 备 溶 液 (Phytotech 目录号 G249)					
硫酸亚铁螯合溶液 (100×) ml/L (Phytotech 目录号 F318)	5	5		5	5
蔗糖 g/L	20	20	30	20	20
琼脂 g/L	7	7		7	7
Phytigel g/L			2.5		
椰子汁 (Phytotech 目录号 C195)	100	100			100
酪蛋白水解产物 g/L					
聚乙烯基吡咯烷酮 PVP-10 (mg/L)					
NAA (mg/L)	1	1		1	1
2,4-D (mg/L)	0.1	0.1	1.5	0.1	0.1
激动素(mg/L)	0.5	0.5		0.5	0.5

[0073] 表 1 (续)

[0074]

	VM1570	VM1571	VM1572	VM1573	VM1727
MS 盐(g/L) (Phytotech 目录号 M524) (g/L)					4.33
Gamborg B5 盐(g/L) (Phytotech 目录号 G768)	3.1	3.1	3.1	3.1	
无氮 MS 基础盐(g/L) (Phytotech 目录号 M531)					
改良的 B5 主盐(ml/L) (20×) (EPS 000210 -表 6)					
B5 微量盐(ml/L) (1000×) (EPS 0004 -表 7)					
MS 维生素(ml/L) 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 M533)					
硫酸铵(mg/L)					
硝酸钾(mg/L)					
NN 维生素(ml/L) 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 N608)					1
B5 维生素(ml/L) 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 G249)	1	1	1	1	
硫酸亚铁整合溶液(100×) ml/L (Phytotech 目录号 F318)					5
蔗糖 g/L	20	20	20	20	20
琼脂 g/L	7	7	7	7	7
Phytigel g/L					
椰子汁 (Phytotech 目录号 C195)				100	100
酪蛋白水解产物 g/L	2.0	2.0	2.0	2.0	
聚乙烯基吡咯烷酮 PVP-10 (mg/L)					
NAA (mg/L)		0.1	0.5		1
2,4-D (mg/L)	2.0	1.0	1.0	1.0	0.5
激动素(mg/L)	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5

[0075] 表 2 悬浮培养物的培养基的组成

[0076]

组分	VM1799	VM1831	VM1901	VM1933	VM3071	VM3072	VM3103
MS 盐 g/L	4.33	4.33	4.33	4.33	4.33	4.33	4.33

[0077]

(Phytotech 目录号 M524) (g/L)							
NN 维生素 ml/L 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 N608)	1	1	1	1	1	1	1
椰子汁 ml/L (Phytotech 目录号 C195)		100	100	100	100	100	100
蔗糖 g/L	30	20	20	30	30	30	30
硫酸亚铁螯合溶液 (100×) ml/L (Phytotech 目录号 F318)		5		5	5	5	5
IAA (mg/L)							
NAA (mg/L)		1.0	1.0	1.0	1.0		
IBA (mg/L)					0.1	1.0	2.0
2,4-D (mg/L)	1.5	0.1	0.1	0.1			
激动素(mg/L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

[0078] 表 2 (续)

组分	VM3014	VM3110	VM3111	DC1151
MS 盐 g/L (Phytotech 目录号 M524) (g/L)	4.33	4.33	4.33	4.3
NN 维生素 ml/L 1000×储备溶液 (Phytotech 目录号 N608)	1	1	1	1
椰子汁 ml/L (Phytotech 目录号 C195)	100	100	100	
蔗糖 g/L	30	20	20	30
硫酸亚铁螯合溶液 (100×) ml/L (Phytotech 目录号 F318)	5	5		
IAA (mg/L)		1.0	2.0	
NAA (mg/L)				
IBA (mg/L)	3.0			
2,4-D (mg/L)				1.5
激动素(mg/L)	0.5	0.5	0.5	

[0080] 在不脱离本发明精神或基本特征的前提下,本发明可以以其他具体形式体现。所述实施例被认为在所有方面均仅为示例性的,而非限制性的。因此,本发明的范围由所附权利要求而非上述说明书来指示。处于权利要求等同物的含义和范围内的所有更改将包含在其范围内。

[0081] 参考文献

[0082] 1. Maatta-Riihinen, K; Kahkonen, M; Toronnen, AR; Hainonen, IM; Catechins and Procyanidins in Berries of Vaccinium Species and Their Antioxidant Activity. J

Agric. Food Chem. 2005. 53:8485-8491 (Maatta-Riihinen, K, Kahkonen, M, Toronnen, AR, Hainonen, IM, “越橘属浆果中的儿茶素与原花青素及其抗氧化活性”,《农业和食品化学杂志》,2005 年,第 53 卷,第 8485-8491 页)。

[0083] 2. Gu, L; Kelm, MA; Hammerstone, JF; Beecher, G; Holden, J; Haytowitz, D; Prior, RL Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. J. Agric. Food Chem. 2003. 51:7513-7521 (Gu, L, Kelm, MA, Hammerstone, JF, Beecher, G, Holden, J, Haytowitz, D, Prior, RL, “使用 LC-MS/MS 和硫解降解对包含原花青素的食物及其结构表征进行筛选”,《农业和食品化学杂志》,2003 年,第 51 卷,第 7513-7521 页)。

[0084] 3. Morimoto, S; Nonaka, GI; Nishioka, I Tannins and related compounds. LX. Isolation and characterization of proanthocyanidins with a double-linked unit from *Vaccinium Vitis-idaea* L. Chem. Pharm. Bull. 1988. 36:33-38 (Morimoto, S, Nonaka, GI, Nishioka, I Tannins 及相关化合物。LX。 “用来自红豆越橘的双链单元对原花青素进行分离和表征”,《化学与药物通报》,1988 年,第 36 卷,第 33-38 页)。

[0085] 4. Foo, LY; Lu, Y; Howell, AB; Vorsa, N. A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. J. Nat. Prod. 2000. 63:1225-1228 (Foo, LY, Lu, Y, Howell, AB, Vorsa, N, “来自蔓越橘的抑制带有 P-菌毛的尿道致病性大肠杆菌的粘附性的 A 型原花青素三聚体”,《天然产物杂志》,2000 年,第 63 卷,第 1225-1228 页)。

[0086] 5. Prior, RL; Lazarus, SA; Cao, G; Muccitelli, H; Hammerstone, J F Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2001. 49:1270-1276 (Prior, RL, Lazarus, SA, Muccitelli, H, Hammerstone, JF, “使用高性能液相色谱法 / 质谱法对蓝莓和蔓越橘(越橘属)中的原花青素和花青素进行鉴定”,《农业和食品化学杂志》,2001 年,第 49 卷,第 1270-1276 页)。

[0087] 6. Schmidt, BM. ; Howell, AB. ; McEniry, B; Knight, CT; Seigler, D; Erdman, JW, Jr. ; Lila, MA. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. J. Agric. Food Chem. 2004. 52:6433-6442 (Schmidt, BM. 、Howell, AB. 、McEniry, B, Knight, CT, Seigler, D, Erdman, JW, Jr. 、Lila, MA. , “来自野生蓝莓(狭叶越橘)果实的潜在抗增殖和抗粘附组分的有效分离”,《农业和食品化学杂志》,2004 年,第 52 卷,第 6433-6442 页)。

[0088] 7. Nowack, R; Schmitt, W. Cranberry juice for prophylaxis of urinary tract infections conclusions from clinical experience and research. Phytomedicine. 2008. 15(9):653 - 67 (Nowack, R, Schmitt, W. , “来自临床实验和研究的用于预防尿道感染的越橘汁结论”,《植物医学》,2008 年,第 15 卷第 9 期,第 653-667 页)。

[0089] 8. Foo, LY; Lu, Y; Howell, AB. ; Vorsa, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. Phytochemistry 2000. 54:173 - 81 (Foo, LY, Lu, Y,

Howell, AB. 、Vorsa, N. ,“抑制体外带有 P- 菌毛的尿道致病性大肠杆菌的粘附性的越橘原花青素的结构”,《植物化学》,2000 年,第 54 卷,第 173-181 页)。

[0090] 9. Madhavi, DL; Bomser, J; Smith, MAL. Singletary K. Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* fruit and cell culture. *Plant Sci* 1998. 131:95-103 (Madhavi, DL; Bomser, J; Smith, MAL. 、Singletary K, “从欧洲越橘果实和细胞培养物中分离生物活性成分”,《植物科学》,1998 年,第 131 卷,第 95-103 页)。

[0091] 10. Hokkanenm J; Mattila, S; Jaakola, L; Pirttila, AM; Tolonen, A. Identification of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 2009. 57:9437 - 9447 (Hokkanenm J、Mattila, S、Jaakola, L、Pirttila, AM、Tolonen, A, “从红豆越橘 (*Vaccinium vitis-idaea* L.)、欧洲越橘 (*Vaccinium myrtillus* L.) 和混合越橘 (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) 叶子中鉴定酚类化合物”,《农业和食品化学杂志》,2009 年,第 57 卷,第 9437-9447 页)。

[0092] 11. Slinkard, K; Singleton, VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977, 28:49-55 (Slinkard, K、Singleton, VL, “酚总量分析:自动操作和利用手工方法进行比较”,《美国酿酒学与葡萄栽培学杂志》,1977 年,第 28 卷,第 49-55 页)。

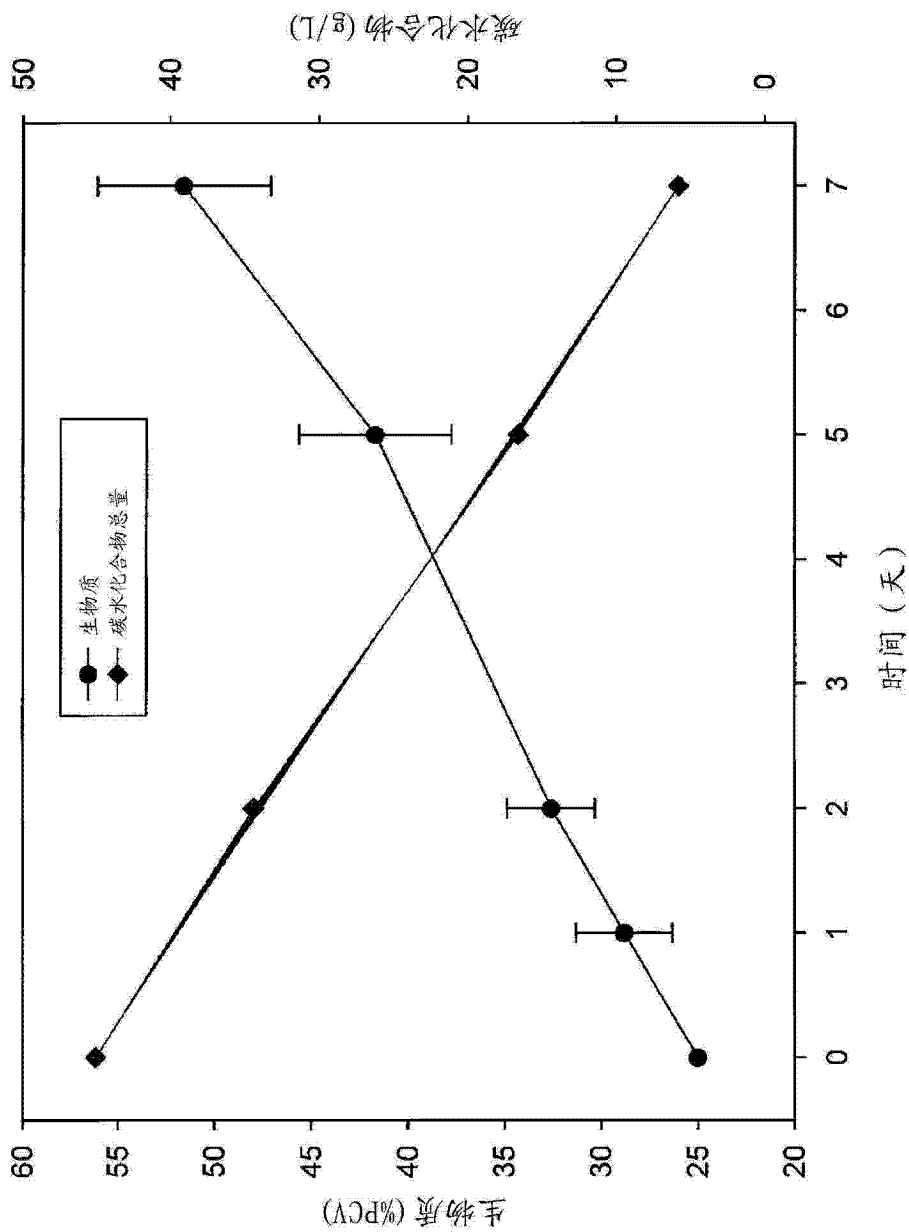


图 1

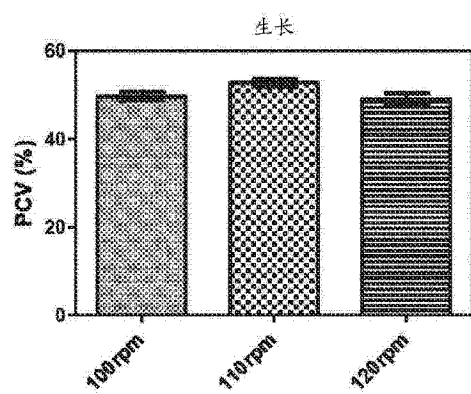


图 2a

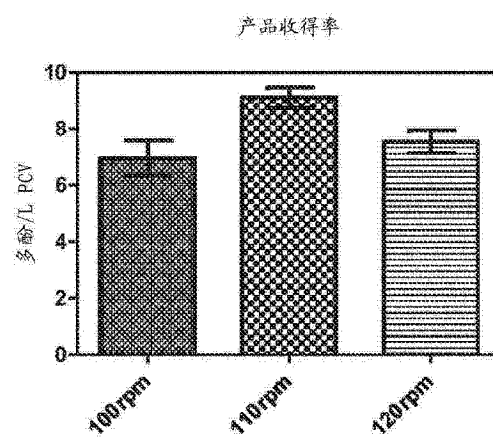


图 2b

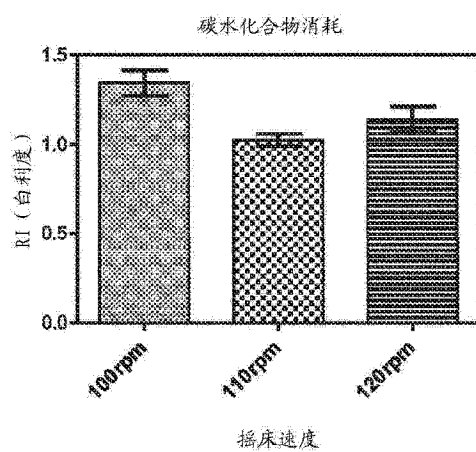


图 2c

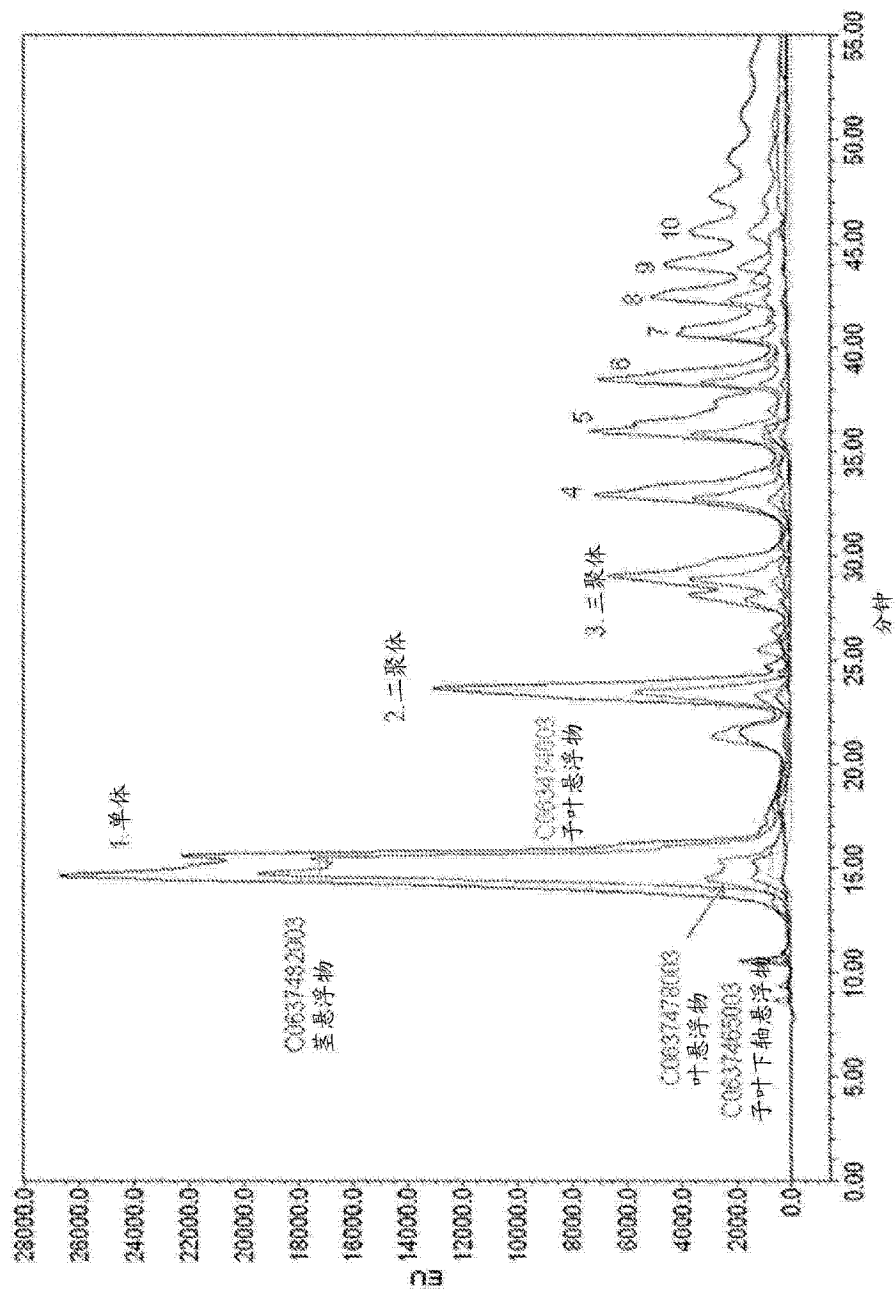


图 3

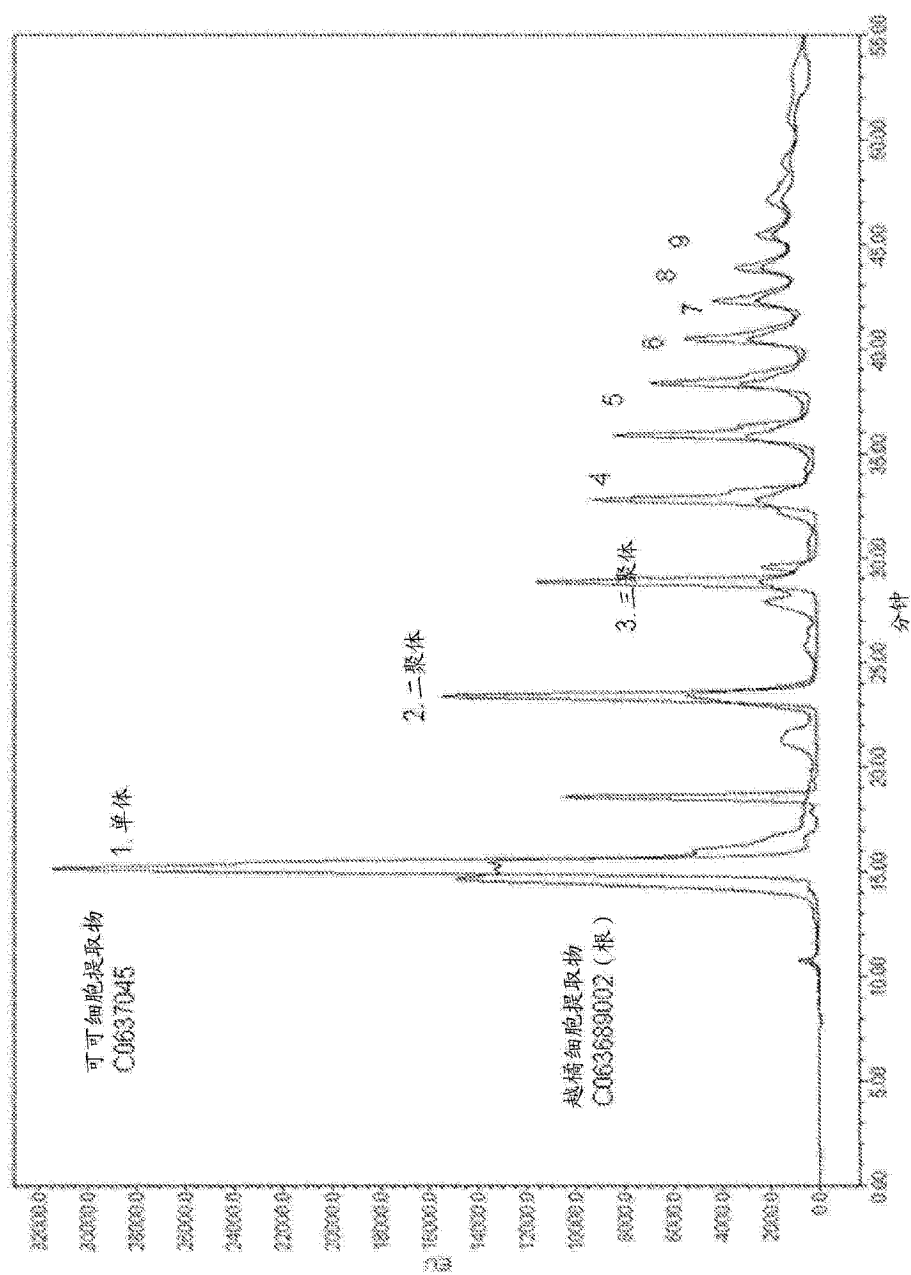


图 4

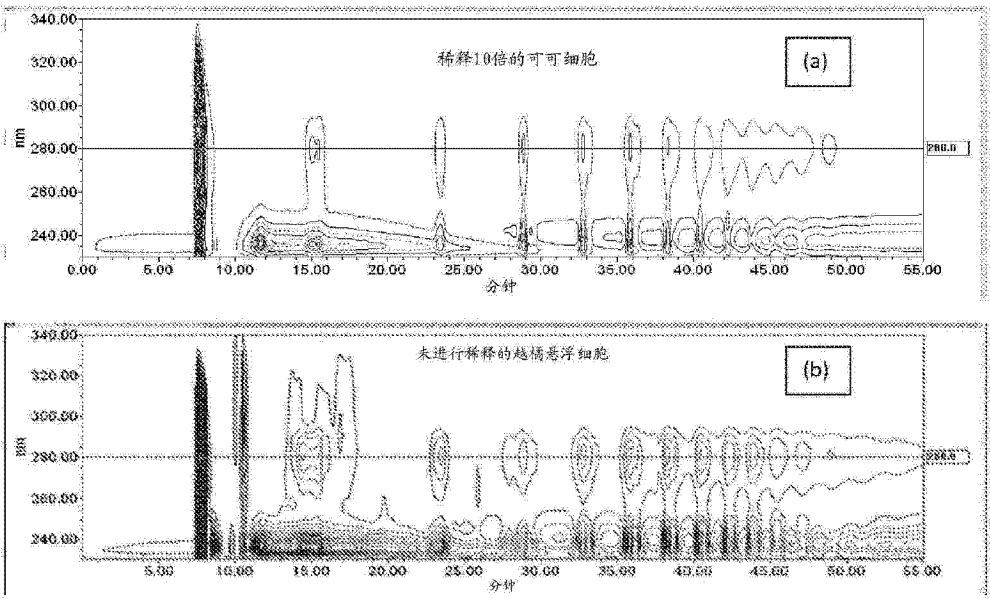


图 5