

玫瑰茄悬浮培养细胞生长及花青素形成的研究

阮茜 郑穗平 郭勇

(华南理工大学生物工程研究所 广州 510641)

玫瑰茄(Roselle)是锦葵科木锦属一年生直立草本植物,广泛分布于全世界各热带、亚热带地区。在我国福建已有生产性栽培,在广东、广西、云南等省亦有栽培。但主要作纤维性原料出口。而玫瑰茄具有多种经济价值,其中花萼为紫红色,颜色鲜艳,已经作为提取花青苷色素的合适原料而受到重视。由于受到地域、气候等条件的限制,通过大面积栽培植物来获取产物的方法有较大的局限性,而植物细胞培养技术的发展为天然色素的生产提供了新的途径^[1]。本文研究了玫瑰茄细胞悬浮培养过程中,碳源、氮源和 pH 值对细胞生产及花青素形成的影响,为进一步研究花青素生物合成的代谢调控以及采用大规模细胞培养来生产花青素打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 培养基及培养方 法

由玫瑰茄愈伤组织诱导得红色细胞^[2,3],继代培养 12~16d 转代一次,培养基由 B5 培养基组分^[4]添加 1mg/L 的 2,4-D、0.5mg/L 的 KT 及 30g/L 的蔗糖, pH4.5 构成,在 0.1MPa 下灭菌 15min。玫瑰茄细胞在 25℃,转速 90r/min,光照 1600lx、16h/d 的摇床上进行培养,每 100ml 摇瓶中培养基装量为 30ml。

1.2 分析方 法

每次取样后,培养细胞经砂芯漏斗过滤、洗涤、称量得湿重,置于 50℃ 左右烘干至恒重,得干重。培养基中残糖采用 3,5-二硝基水杨酸法^[5]测定,铵离子及硝酸根离子的定量则分别采用苯酚-次氯酸盐反应和水杨酸反应的方法^[6]。磷的测定采用抗坏血酸还原法^[5]进行测定。花青素含量的测定:将 1g 湿细胞用 10ml 的 1% HCl 甲醇 4℃ 静置抽提 24h,3000r/min 离心,吸取上清液,测定吸光度 A_{525} ^[7]。细胞中花青素的含量 $AC = (27.208A + 0.0591)D \cdot 10/1000$;培养液中的花青素总量: $TA = AC \cdot FCC$ 。其中 A 为吸光度, D 为稀释倍数, FCC 为湿细胞浓度。所得数据均取 3 次实验的平均值。

2 结果与讨论

2.1 蔗糖对细胞生长、产物形成与营养消耗的影响

改变培养基中的蔗糖浓度(2%、3%),来研究蔗糖对细胞生长、产物形成的影响。图 1 为细胞生长、蔗糖消耗与硝酸根离子的变化及产物花青素形成的曲线。从图 1a 和图 1b 可以看出:2%的蔗糖到第 10 天已被消耗完全,此时细胞进入对数生长期末期;而 3%的蔗糖到第 12d 已被消耗完毕,细胞进入生长期末期。3%蔗糖浓度比 2%蔗糖浓度下的对数生长期要长 2d,细胞量增加更多。从图 1a 中我们还可以发现:3%的蔗糖更有利于产物花青素的形成。这可能是由于在 3%蔗糖浓度下,细胞渗透压增大,细胞体积减小,有利于花青素的形成^[8]。图 1b 显示了两种蔗糖浓度下的 NO_3^- 的动态变化。另外在研究发现细胞培养过程中, NH_4^+ 很快被消耗完(数据未写出)。

2.2 氮源对细胞生长、产物形成的影响

在添加 3%蔗糖的 B5 培养基中添加不同浓度的 NH_4^+ 和 NO_3^- ,对细胞生长及产物形成的影响,结

果见图2。结果表明:(a)条件下细胞生长状况最好,细胞较迟进入衰亡期,因而细胞量最大。其他3种情况下细胞生长基本相同。从单个细胞的花青素含量看,(d)条件下最佳(未画图),而花青素总量仍以(a)最高。

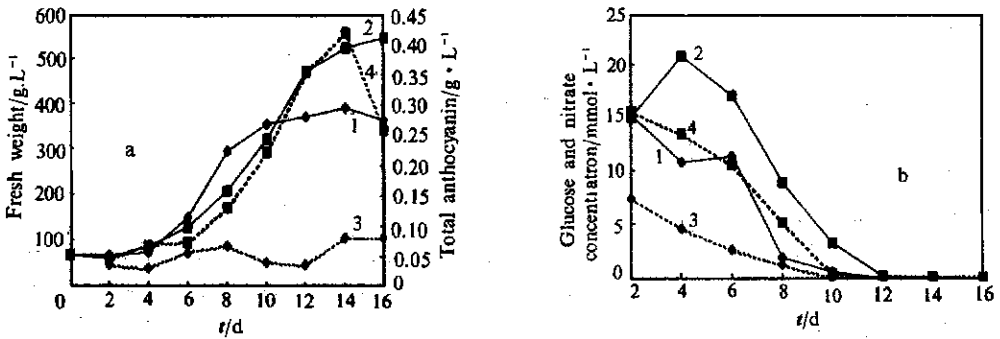


图1 蔗糖对玫瑰茄细胞生长、花青素形成(a)、葡萄糖及硝酸根离子(b)的消耗的影响

(a) 1. FW(2% suc)

2. FW(2% suc)

3. TA(2% suc)

4. TA(3% suc)

(b) 1. 2% suc

2. 3% suc

3. NO_3^- (2% suc)

4. NO_3^- (3% suc)

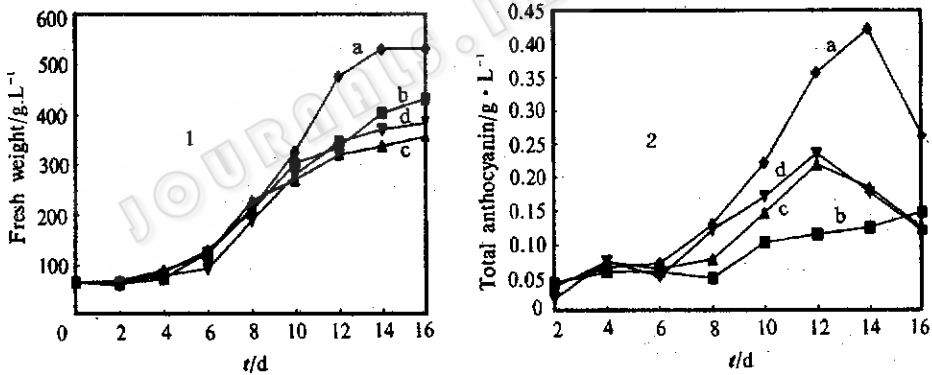


图2 氮源对玫瑰茄细胞生长与花青素形成的影响

Conc./ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: (a) NH_4^+ 2.03, NO_3^- 24.73; (b) NH_4^+ 2.03, NO_3^- 80;

(c) NH_4^+ 0, NO_3^- 12; (d) NH_4^+ 6, NO_3^- 80

2.3 pH值对细胞生长、产物形成的影响

由于花青素是随pH变化而颜色发生变化的一种色素,因而考察了pH值分别为4.5与5.8(灭菌前)的B5培养基对细胞生长与花青素形成的影响。图3可看出:pH值对细胞生长影响不大,但对花青素的形成有较显著的影响。pH4.5时的最高产量是pH5.8时的4倍。可见,较酸的环境更有利于花青素的形成。

2.4 细胞形态及产物位点的研究

花青素在细胞中的具体形成过程尚不清晰。文献[8]认为,细胞内质网上有类黄酮合成过程所需的酶类,花青素形成初期成小液滴悬浮于液泡中,液滴聚集成红色团,光照会导致花青素产量的增高及红色团的增大。从显微镜观察,玫瑰茄细胞的形态并不均一,有圆形,肾形,葫芦形,纺锤形等,且大小亦不

一致,如图4所示。多个圆形细胞结成细胞小团有利于次生代谢产物-花青素的形成。在细胞壁附近先有一些浅红色小滴形成,小滴聚集成一红色团。

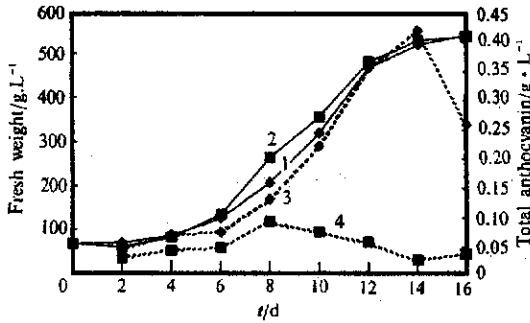


图3 pH对玫瑰茄细胞生长与花青素形成的影响
1. FW(4.5), 2. FW(5.8), 3. TA(4.5), 4. TA(5.8)

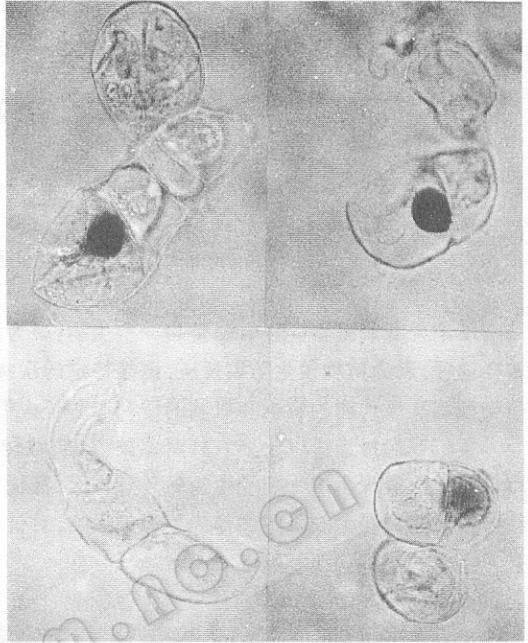


图4 玫瑰茄细胞的形态及花青素形成的位点

参 考 文 献

- [1] Guo Y, Biochemical Engineering for 2001, Springer-Verlag, Tokyo: 1992, pp.242~245.
- [2] 张玉婷, 阮茜. 华南理工大学学报(自然科学版), 1993, 21:70~73.
- [3] 蔡燕璇. 华南理工大学学报(自然科学版), 1991, 20(4):94~99.
- [4] Mantell S. H. Smith H. 植物生物工程学, 上海:上海科学技术出版社, 1986.
- [5] 张龙翔主编. 生化实验方法和技术, 北京:高等教育出版社, 1980.
- [6] Z. 马钦科著. 元素的分离和分光光度测定, 北京:化学工业出版社, 1980.
- [7] Zhong J J. Biotech and Bioeng, 1991, 38:653~658.
- [8] Robert C P, Catherine J S. Phytochemistry, 1980, 19:2571~2576.

Studies on Cell Growth and Anthocyanin Formation of Roselle Suspension Cultures

Ruan Qian Zheng Suiping Guo Yong

(Institute of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract Effects of carbohydrate, nitrogen and pH on cell growth and anthocyanin formation of roselle cells are investigated. Results show that on the condition of sucrose 3%, pH4.5, we get a better cell growth and anthocyanin production. The cell morphology and the site of anthocyanin formation is also studied.

Key words Rosells, anthocyanin, suspension culture, morphology