

主要营养成分对悬浮培养玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响^{*}

郑穗平 郭勇

(华南理工大学生物工程研究所, 广州 510641)

摘要 本文研究了培养基中碳源和氮源变化对悬浮培养玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响。在8种不同的碳源中, 麦芽糖有利于花青素的积累, 而蔗糖和葡萄糖适合细胞生长, 并有较高的花青素产率。在1%~10%蔗糖浓度范围内, 4%浓度下细胞生长和花青素产率最高, 而6%浓度下细胞花青素含量最高, 高渗环境较有利于细胞花青素的积累。13.5 mM的氮源总量已足够维持玫瑰茄细胞生长和花青素合成, 氮源总量增加对细胞代谢有抑制作用。 NH_4^+ 对细胞有显著抑制作用。总量13.5 mM, NO_3^- 与 NH_4^+ 比例25:2和23:4时细胞生长和花青素合成最佳。

关键词 营养成分; 玫瑰茄; 悬浮培养; 花青素

Effects of staple nutrient on cell growth and anthocyanin production in suspension culture of *Hibiscus sabdariffa* L.

Zheng Suiping Guo Yong

(Bioengineering Institute, South-China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract Effects of different carbon and nitrogen source on cell growth and anthocyanin production in suspension culture of *Hibiscus sabdariffa* L. were studied. In eight kinds of carbon sources, maltose was more effective toward formalising anthocyanin content, but cell biomass and total anthocyanin production yield were highest in the medium with sucrose and glucose. In the range of 1%~10% sucrose concentration, highest biomass and total anthocyanin yield were obtained in medium with 4% sucrose concentration, while highest anthocyanin content was achieved in the medium with 6% sucrose concentration. High osmotic potential was effective for accumulation of anthocyanin. Different total nitrogen concentration and NO_3^- to NH_4^+ ratio showed strong influence on cell growth and anthocyanin production. Total nitrogen concentration of 13.5 mM was enough for cell

1997-07-14 收稿

第一作者简介: 郑穗平, 男, 1963年出生, 华南理工大学, 博士生, 主要从事发酵工程, 研究植物细胞培养技术。

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

*国家自然科学基金资助项目

growth and anthocyanin production, while increase of the total nitrogen concentration inhibited the cell metabolism. NH_4^+ was a strong inhibitor. Under the following condition of the ratio of NO_3^- to NH_4^+ (25 : 2, 23 : 4) and total nitrogen concentration 13.5 mM, resulted good cell growth and anthocyanin production

Key words Nutrient; *Hibiscus sabdariffa* L.; suspension culture; anthocyanin

近年来随着世界各国对合成色素使用的广泛限制, 天然色素的生产、使用逐渐受到人们的重视。植物作为一个次生代谢产物的宝库, 包括各种风味物质、天然色素、药物等等, 一直是天然色素生产的重要原料。但是考虑到从植株原料直接提取色素的种种局限, 如需大规模栽种植物、植物产量易受外界恶劣环境影响、目的产物含量低等等, 从八十年代开始, 植物细胞大规模培养生产次级代谢物的技术逐渐发展起来^[1, 2]。我们应用这种技术, 利用筛选出来的优良玫瑰茄细胞株生产花青素, 一种重要的天然色素。

玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa* L.), 又名山茄, Roselle 等, 是锦葵科木槿属一年生草本植物, 主要分布于世界热带、亚热带地区。玫瑰茄于本世纪初引入我国, 目前在福建、云南、两广等地区有栽培。玫瑰茄的成熟花萼呈紫红色, 色素为花青素类, 是一种很好的色素生产原料。Esselen 和 Sammy^[3, 4]首先研究了玫瑰茄色素实际应用的可能性。随后玫瑰茄逐渐作为花青素类色素合适的生产原料而受到更多的重视。在国内, 福建省亚热带植物研究所等单位开展了从玫瑰茄植物原料中提取红色素的研究^[5, 6, 7]。而我们则成功应用玫瑰茄细胞液体培养技术, 以进一步提高原料中花青素的含量, 从而改进从植株中直接提取的制备方法。

玫瑰茄细胞培养系统的建立以及一些理化因子的影响已有另文报道^[8, 9]。本文则主要研究了摇瓶状态下, 培养基中主要的营养成分对玫瑰茄细胞悬浮培养过程中细胞生长、花青素形成的影响, 包括碳源的种类、浓度, 氮源的比例及浓度等。通过本研究建立维持玫瑰茄细胞高花青素产率的营养环境, 为该技术由摇瓶阶段转向反应器培养阶段提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

材料为福建产玫瑰茄的花萼愈伤组织, 经本实验室从 1992 年起筛选得到的高产花青素细胞株^[8]。

1.2 培养方法

选用 Gamborg B5 培养基组分^[10], 其中添加 1 mg/L 的 2, 4-D、0.5 mg/L 的 KT 和 30 g/L 的蔗糖, pH 为 5.8 (灭菌前), 0.1 MPa 下灭菌 15 min。玫瑰茄细胞的液体悬浮培养在 #O25 °C, 转速 130 r/min, 光照 1 600 lx、16 h/d 的摇床上进行。接种量为 40 g/L 湿细胞 (约为 1.35 g dw/L)。实验选用 250 mL 摇瓶, 培养基装量为 50 mL, 培养 14 d 后收获。各批实验独立进行, 实验结果均为 3 次的平均值。

1.3 分析方法

1.3.1 细胞生长的测定 悬浮培养的玫瑰茄细胞收获后, 经砂芯漏斗抽滤、洗涤得湿细胞, 于 60 °C 烘干至恒重, 以细胞干重含量 (g dw/L) 作为其生长的指标。收获时细胞干重除以接种时细胞干重得到收获时细胞量增长倍数。

1.3.2 花青素的含量测定^[9] 将 1 g 湿细胞用 10 mL 1% HCl 甲醇 4 °C 静置抽提 24 h, 过滤得清液, 于波长 525 nm 处比色。根据标准曲线计算, 并以飞燕草素-3-葡萄糖苷表示细胞中花

青素含量 (mg/g dW)。

1.3.3 培养液中主要营养成分的测定^[9] 可溶性糖用蒽酮法测定。硝酸根和铵根离子分别用水杨酸—浓硫酸法和苯酚一次氯酸盐法测定。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对细胞生长和花青素合成的影响

适宜于培养植物细胞的碳源很多, 包括常用糖类(葡萄糖、蔗糖、甘油等)和非常用糖类(乳糖、半乳糖、淀粉等)。不同的培养细胞适合生长所需的碳源种类不同, 产花青素的能力也依赖于此。为研究玫瑰茄细胞对不同碳源的适应能力, 我们选择了三类共8种碳源: 单糖(葡萄糖、果糖、甘露醇), 双糖(蔗糖、麦芽糖、乳糖), 多糖(菊糖、右旋糖酐), 添加浓度均为40 g/L。8种碳源对液体悬浮培养的玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响见图1。

由图可知, 果糖作为唯一碳源对玫瑰茄细胞生长和花青素合成有抑制作用, 与 Mi-zukami # * - 4 等人的报道相反^[11]。蔗糖和葡萄糖对细胞生长是适合的, # * 4 细胞量分别增长 14.3 和 12.2 倍, 葡萄糖对玫瑰茄细胞生长也未表现出在某些植物细胞培养过程中出现的抑制效应; 葡萄糖为碳源时细胞花青素含量比用蔗糖时稍高, 原因可能是前者分子量小, 培养基中的摩尔浓度高, 使得细胞生长在较高的渗透压环境中, 高渗环境虽对细胞生长有一定负作用, 但较有利于花青素的合成^[12]。玫瑰茄细胞也能利用乳糖和麦芽糖, 但细胞量增长倍数较小; 值得注意的是利用麦芽糖为唯一碳源时细胞花青素含量达到最高

值 35.3 mg/g dW, 分别是蔗糖和葡萄糖时的 2.5 和 2.2 倍, 但由于细胞量少, 使得花青素总产率仍然较低。玫瑰茄基本上不能利用甘露醇, 右旋糖酐和菊糖, 表明细胞缺乏应用糖醇和多糖的酶系, 细胞不能生长的同时, 花青素的合成也缺乏足够的碳源支持。由此, 蔗糖和葡萄糖是最适合玫瑰茄细胞生长和花青素合成的碳源。从使用成本来考虑, 以下实验均采用蔗糖作为唯一碳源。

2.2 培养基中较佳蔗糖浓度的确定

不同种类、生长状态的植物细胞对蔗糖的需求有较大差别, 而蔗糖浓度对细胞次级代谢产物合成的影响也是显著的。花青素分子中含有糖配基, 显示出其合成与蔗糖利用的密切联系。蔗糖同时也作为培养基中渗透压的调节剂, 对细胞生长和花青素的合成起着重要的作用。本文研究了培养基中一定浓度范围 (10 ~ 100 g/L) 的蔗糖对玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响, 结果如

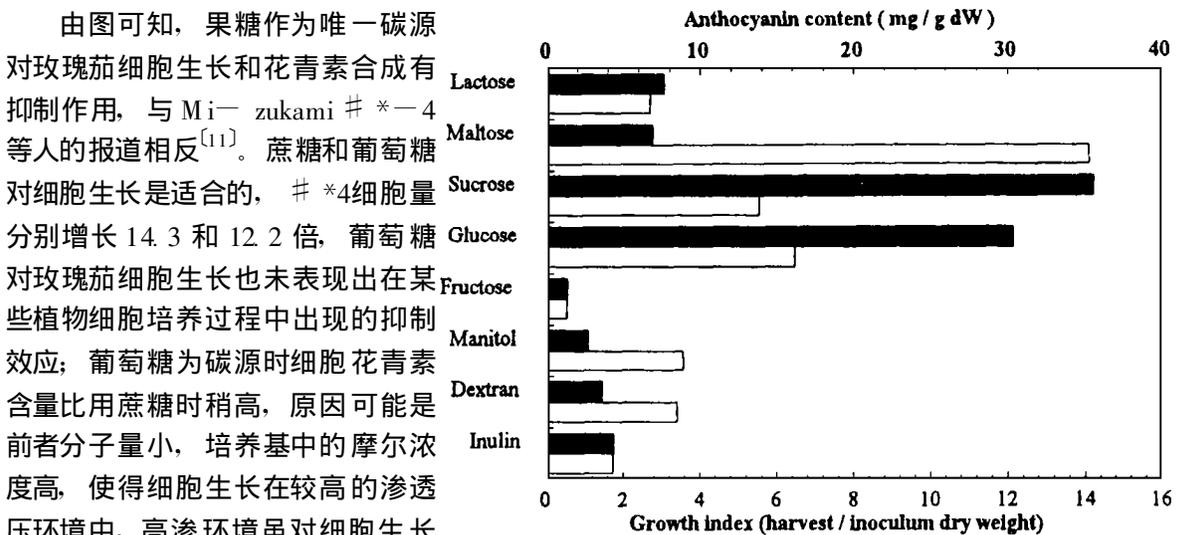


图1 不同碳源对悬浮培养过程中玫瑰茄细胞量增长(■)和花青素合成(□)的影响

Fig. 1 Effects of sugars on growth index (■) and anthocyanin production (□) in suspension culture of *Hibiscus sabdariffa* L.

图 2 所示。

由图可见, 在一定浓度范围内, 玫瑰茄细胞生长 (0%~4%) 和花青素合成 (0%~6%) 随蔗糖浓度的升高而增加, 分别在 4% 和 6% 浓度下达到最大细胞量 14.3 g dW/L。和最高细胞花青素含量 21.8 mg/g dW, 最高花青素产率也在 4% 蔗糖浓度下出现, 为 260 mg/L。这与蔗糖作为唯一碳源参与细胞初级代谢和次级代谢是有关的。蔗糖浓度超过 4% 时, 玫瑰茄细胞的生长受到抑制, 可能与高糖带来的培养基高渗透压有关。高渗对培养基中其他营养物质的吸收有抑制作用; 高渗造成细胞内含水量降低, 可能也影响细胞内某些代谢功能的正常进行。但是高渗对细胞中花青素的积累还是有利的^[12]。图中, 细胞的花青素含量在较高的蔗糖浓度下能够维持较高的水平。由于液泡在花青素胞内积累中有重要作用, 高渗导致液泡内液体外渗使培养基颜色变深, 并检测到花青素的存在, 但也可能同时解除了末端产物花青素对合成途径的抑制。有关的机理尚需更多的实验证实。培养基中蔗糖的利用率随着蔗糖浓度的升高而降低。

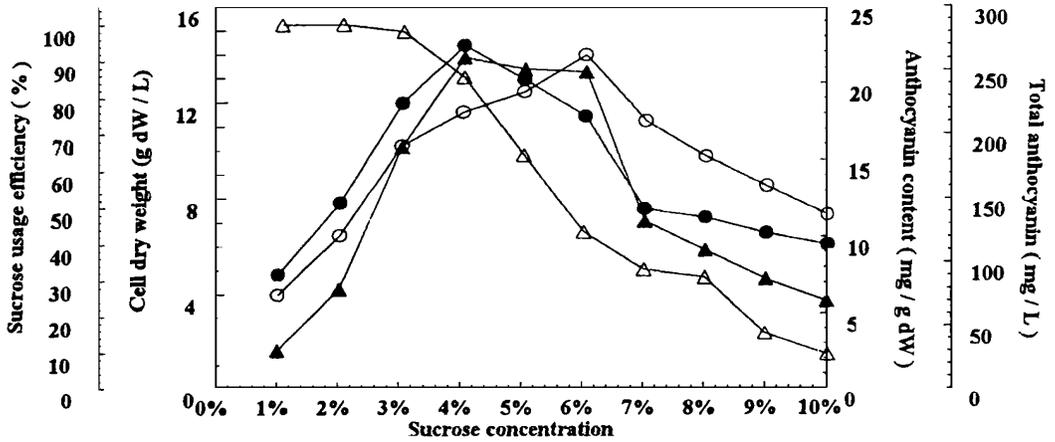


图 2 不同蔗糖浓度下, 悬浮培养过程中玫瑰茄细胞生长 (●)、花青素含量 (○)、花青素产率 (▲) 和蔗糖利用率 (△) 的影响

Fig 2 Effects of different sucrose concentration on cell growth (●), anthocyanin content (○), total anthocyanin (▲) and sucrose usage efficiency (△) in suspension culture of *Hibiscus sabdariffa* L.

实验表明玫瑰茄细胞和花青素合成所需的最佳蔗糖浓度是不同的。由于花青素的产率同时与细胞量和细胞中花青素含量有关, 故此 4% 的蔗糖浓度是较佳的选择。实验同时也为我们提供一条思路, 即通过二段式培养工艺, 分别在细胞生长期和花青素合成期提供各自最佳的营养条件, 最终达到提高花青素产率的目的。有关二段式培养工艺的建立, 以及营养变化时机的确定等工作已在研究中。

2.3 硝酸根和铵根离子比例与氮源总量对细胞生长和花青素合成的影响

氮源对植物细胞的生长是不可缺少的。氮源组成和总量的变化对细胞的生长和次级代谢的进行有不同作用。B5 培养基中的氮源为硝酸盐 (25 mM) 和铵盐 (2 mM)。本文研究硝酸根和铵根离子的不同比例以及氮源总量对玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响。

B5 培养基的基本氮源总量为 27 mM, NO_3^- 与 NH_4^+ 的比例 25 : 2。在研究氮源总量对细胞生

长和花青素合成影响的实验中采用 1/2, 1, 2 和 4 倍 B5 基本浓度; 在维持每种氮源总量下 NO_3^- 与 NH_4^+ 的比例分别调整为 27 : 0, 25 : 2, 23 : 4, 19 : 8, 11 : 16, 3 : 24 和 0 : 27, 以研究 NO_3^- 与 NH_4^+ 的比例对细胞生长和花青素合成的影响。实验中蔗糖浓度为 4%。实验结果如表 1 所示。

实验结果表明在 1/2 基本氮源浓度下, 25 : 2、23 : 4、19 : 8 三种比例的培养基比较有利于细胞生长和花青素合成, 最高细胞量为 17.64 g dW/L (25 : 2), 最高花青素含量为 25.7 mg/g dW (23 : 4)。由此可见 NO_3^- 离子和 NH_4^+ 离子的比例对玫瑰茄细胞生长和花青素合成有重要的作用。 NO_3^- 离子对细胞生长是必需的, 但对花青素合成有一定抑制作用; NH_4^+ 离子对细胞生长有较强的抑制作用, 但在一定范围内提高 NH_4^+ 离子的浓度 (NO_3^- 离子浓度相应降低) 会促进细胞内花青素的积累。对应每一种比例, 1/2 基本氮源浓度 (13.5 mM) 都已足够维持玫瑰茄细胞生长和花青素合成的需要。除了在以 NO_3^- 离子为唯一氮源的培养基中之外, 提高氮源总量相应提高了 NH_4^+ 离子的浓度, 对细胞生长有明显抑制作用, 花青素含量也降低。在以 NH_4^+ 离子为唯一氮源的培养基中, 玫瑰茄细胞基本上不能生长, 甚至死亡。在其他植物种类如 *Aralia cordata*, *Euphorbia millii* 等的培养过程中也有类似报道^[13]。

表 1 不同 NO_3^- 与 NH_4^+ 的比例与氮源总量对悬浮培养玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响

Table 1 Effects of total nitrogen concentration and NO_3^- to NH_4^+ ratio on growth and anthocyanin production in suspension cultures of *Hibiscus sabdariffa* L.

氮源比例 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$		氮源总量 (倍基本浓度)			
		1/2 (13.5 mM)	1 (27 mM)	2 (54 mM)	4 (108 mM)
27 : 0	a	7.76	12.09	12.35	8.44
	b	9.5	10.3	10.4	8.1
25 : 2	a	17.64	14.09	9.09	7.52
	b	19.5	17.8	15.3	7.5
23 : 4	a	12.82	9.98	8.50	6.24
	b	25.7	14.2	11.7	6.4
19 : 8	a	11.04	8.76	6.22	4.33
	b	16.3	12.4	9.3	3.1
11 : 16	a	8.35	5.6	4.84	3.02
	b	10.2	7.62	3.8	2.4
3 : 24	a	5.32	4.08	2.58	2.11
	b	5.1	3.3	1.4	0.8
0 : 27	a	2.52	3.12	1.88	1.06
	b	2.5	1.4	0.8	0.5

a: 细胞量 (g dW/L), b: 花青素含量 (mg/g dW)

参考文献

- 1 Reinfriede Ilker. *Food Technology*, 1987, **41**: 70~72
- 2 Anonymous. *Food Technology*, 1986, **40**: 122~129
- 3 Esselen W B, G M Sammy. *Food Prod. Dev.*, 1973, **7** (1): 80~82
- 4 Esselen W B, G M Sammy. *Food Prod. Dev.*, 1975, **9** (8): 37~40
- 5 曾华庭, 徐雄. 亚热带植物通讯, 1983, **1**: 30~34
- 6 曾华庭, 董焰生, 杨聚成. 食品与发酵工业, 1984, **5**: 27~32
- 7 曾华庭, 董焰生, 杨聚成. 食品与发酵工业, 1984, **6**: 31~34
- 8 张玉婷, 阮茜. 华南理工大学学报 (自然科学版), 1993, **21**: 70~73
- 9 阮茜, 郑穗平, 郭勇. 第七届全国生物化工学术会议论文集. 北京: 化学工业出版社, 1996. 588~591
- 10 O L Gamborg, R A Miller, K Ojima. *Exp. Cell. Res.*, 1968, **50**: 151~158
- 11 Mizukami H, Nakamura M, Tomita K, et al. *Plant Tissue Culture Letters*, 1991, **8**: 14
- 12 Chi Ba Do, Francois Comier. *Plant Cell Reports*, 1990, **9**: 143~146
- 13 Kazuo sakamoto, Kumiko Iida, Kimiko sawamura, et al. *Phytochemistry*, 1993, **33**: 357~360