

蔗糖及一些渗透剂对紫草培养细胞 中红色素释放的效应

许贻荣 钟建江 吉田敏臣

(发酵工程系) (华东理工大学) (日本大阪大学)

摘要 紫草(*Perilla frutescens*)悬浮培养细胞在胞内产生并积蓄花青苷(红色素)。通过实验发现用一些渗透剂如甲苯、氯仿、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、二甲亚砜(dimethylsulfoxide)、醋酸和乙醇等处理培养细胞,可使细胞内的红色素释放出来。培养的紫草细胞一般在含3%蔗糖浓度的LS培养基中生长,当提高蔗糖浓度至4.0%~4.5%时,细胞生长量及色素的产量均有增加。实验结果表明,蔗糖浓度的提高不仅可以增加碳源,而且更重要的原因还可能是蔗糖渗透压的影响,在高糖浓度也即高渗透压下,细胞红色素的渗透性有所增加。

关键词 紫草;渗透性;红色素

0 引 言

从生物工艺学的角度来看,细胞如具有自动分泌所需产物的能力则对工业化的培养、发酵过程极为有利^[1]。紫草细胞在胞内生成并积蓄红色素(花青苷)。当细胞的渗透性得以改善则细胞能够释放红色素。人们曾实验过一些渗透剂对植物培养细胞次级产物释放的效应^[1,3]。但这些化合物通常对细胞的生长具有很强的毒害作用^[1]。适宜的渗透剂应当具有改进细胞渗透性的特性同时对细胞的生长又不具有副作用。这对于用固定化方式的植物细胞培养生产次级代谢产物尤为重要。另外关于各种渗透剂对植物细胞的影响的研究还有助于了解细胞的生理特性。各种渗透剂对微生物细胞渗透性的影响已经研究得较为透彻,在实际应用中发挥了巨大的作用。但是,对于植物细胞渗透性的影响因素还不如微生物细胞那样全面而深入。

本研究考察了一些渗透剂对紫草细胞释放红色素的效应,重点考察了在高浓度蔗糖的情况下对红色素释放、细胞生长及细胞形态的影响。

1 材料与方 法

植物细胞材料、培养基、培养方式及条件、采样、细胞量(湿重及干重)的测定、残糖含量及花青苷含量的测定方法按[2].

渗透性 本实验所采用的渗透剂有二甲亚砷(DMSO)、甲苯、氯仿、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、醋酸、乙醇、蔗糖等。(和光试剂)用于渗透性研究实验中的植物细胞均处于对数期的早期,即相当于接种后的第七天。通过过滤收集细胞,细胞再悬浮于培养基中,然后加入渗透剂,在摇床上震荡一定时间,细胞再用培养基洗涤一次后重新培养。细胞密度和渗透剂的浓度根据需要而改变。

上清液中蛋白质含量的分析 培养细胞悬浮液中的蛋白质含量用蛋白质测定试剂(购自Sigma公司)测定,其测定方法按该公司推荐的方法。

电导 细胞的渗透性状况如何可用其电导性来衡量,本实验中采用细胞质量仪测定(日本神户钢铁公司出品的Cell Mass Meter)。

花青苷的定性分析 细胞经渗透剂处理后所释放的产物的鉴定采用UV-VIS Recording Spectrophotometer (UV-2200, Shimadzu Co.),根据图谱中的吸收峰所对应的波长确定被释放的产物确是花青苷。

2 结 果

2.1 定性分析经渗透剂处理后紫草细胞内所释放的色素

所用的渗透剂有:甲苯、氯仿、聚乙二醇辛基苯基醚、吐温20、二甲亚砷、醋酸、乙醇和蔗糖。经过渗透剂处理后,从细胞悬浮液的颜色就可断定红色素的存在,而未经渗透剂处理的则不显红色。用UV-VIS Recording Spectrophotometer测定了上清液的吸收峰在525nm处,正好对应于花青苷的特征吸收波长。光谱扫描图如图1所示。

我们注意到当培养基中蔗糖浓度为3%时,红色素几乎不释放到细胞外;但如果培养基中初糖浓度在4%~5.5%范围时,或者初糖为3%,而在对数期间内补加糖到4.0%~5.5%时,红色素就会释放到细胞外,在一定范围内而且糖的浓度越高,则释放的红色素越多(数据未列出)。而糖浓度越高,细胞再次悬浮培养时,死亡得也越快。

通过一系列的实验,我们发现影响细胞内色素释放到胞外的因素有很多,如:渗透剂的种类及其浓度,细胞的培养时间(即细胞本身的生理状态),渗透剂与细胞的密度之比值。在一定条件下(如细胞密度和处理时间及混合程度相同时),细胞所释放的红色素的量随渗透

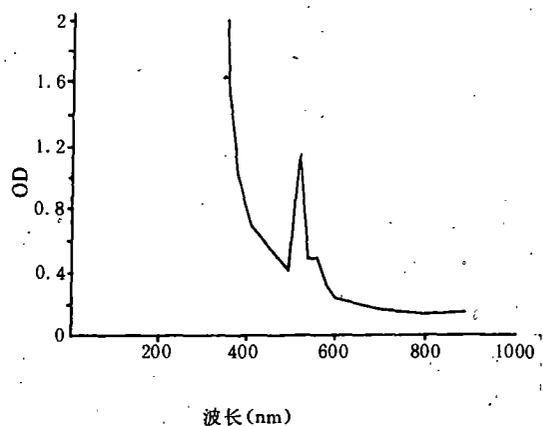


图1 在4.5%蔗糖浓度时,细胞悬浮培养液上清液吸收图谱

剂的浓度增加而增加,如图 2 和图 3 所示。在实验的渗透剂中,发现二甲亚砜(DMSO)是最

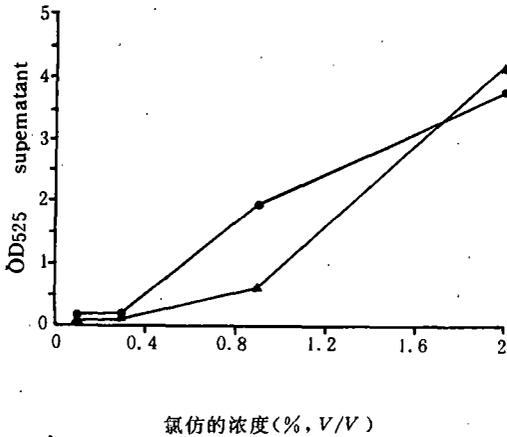


图 2 不同浓度的氯仿处理后色素释放的情况

—▲— OD-S 5min C —●— OD-S 1h C

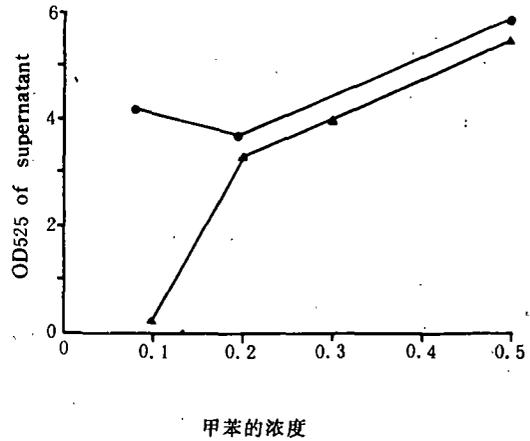


图 3 不同浓度的甲苯处理后色素释放的情况

温和的试剂,而甲苯则是毒性最大的试剂,经过渗透剂处理的细胞再次培养则很难存活。对于紫草培养细胞,在所实验的渗透剂中,很难找到一种合适的试剂。

2.2 初糖浓度对红色素释放、产生及细胞生长的影响

蔗糖作为培养基中的碳源。当初糖浓度为 3% 时,除非细胞培养时间太长,一般情况下,胞内的红色素不会自动分泌到胞外。在初糖浓度为 4.0%~4.5% 范围内,红色素则会释放出来,而且释放的量随初糖浓度而增加。但初糖浓度达 5.0%~5.5% 时,所释放的红色素量反而下降,最终细胞密度也较小。有关结果如图 4A~D 所示。值得注意的是初糖为 3% 的细胞可以作为种子接种继续培养,但初糖为 4.5% 的细胞虽然对数生长期的时间有所延长,

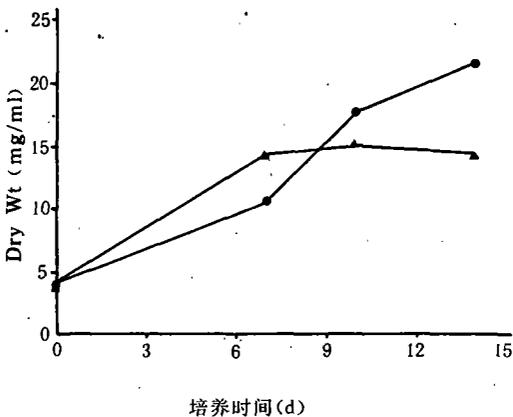


图 4-A 在不同的蔗糖浓度下,细胞的生长曲线

—▲— dr(3%) —●— dr(4.5%)

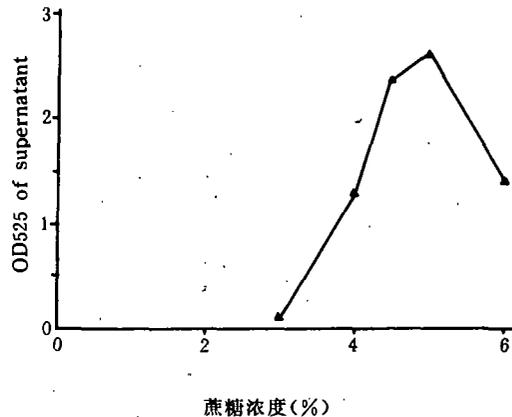


图 4-B 蔗糖浓度对色素释放的影响

—▲— od

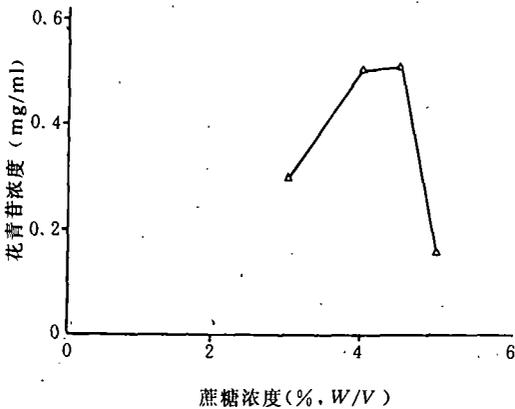


图4-C 蔗糖浓度对花青苷浓度的对应关系

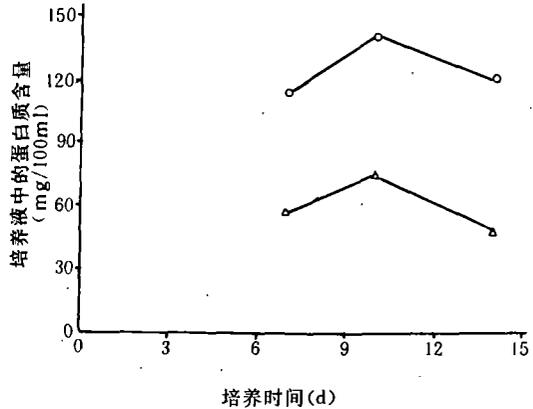


图4-D 不同蔗糖浓度下,细胞释放蛋白质的情况
—▲— P(3%) —●— P(4.5%)

但却不适宜作为种子接种。这说明较高的蔗糖浓度对细胞也产生了不良的作用。而且这种作用应是物理作用所导致的。关于这个问题,将继续用实验数据证明。当培养基中蔗糖浓度较高时,除了色素分泌出来,还有胞内的蛋白质成分泄漏出来。如图4-D所示。这说明细胞的渗透性增加。而蛋白质成分可能是维持细胞正常生理功能所必不可少的,从另一个角度说明较高的蔗糖浓度会破坏细胞。

2.3 补加糖对色素释放以及细胞生长的影响

在细胞生长的对数期或者平衡期补加1%或1.5%的蔗糖,所释放出的红色素有明显的增加。以初糖为3%、4%和4.5%的作为对照,可以看出,当在接种后第4d(对数期之前)补糖至4%或4.5%时,所释放的色素明显增加。而在接种后第9d(对数后期)补糖,所释放的红色素比对照都要高,但比接种后第4d补糖的要低,结果如图5所示。原因可能是补糖后,渗透压突然增加,对细胞的生理活动施加了不利影响,使胞内色素释放到胞外。对于这一现象的解释,看来还需要更多的实验。

2.4 4.5%初糖情况下不同生长阶段色素释放的变化

在这组实验中,还特地增加了初糖为3%的作为对照。结果表明:在接种后第10d,无论初糖是3%还是4.5%,所释放的色素都最高,但在后期,在上清液中的色素含量都下降。我们知道,初糖为3%的培养细胞可以作为种子接种,以前认为一般不会自动释放色素,但这组实验显然说明上清液中有红色素存在,而且红色素的量随培养时间而变化。这种现象目前也很难解释清楚。见图6。

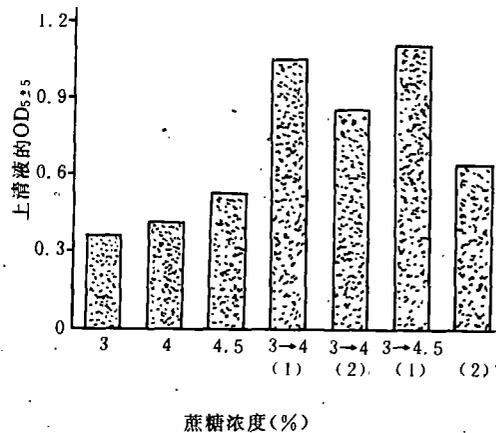


图5 补加蔗糖对色素释放的影响
(1) 接种后第4d补加蔗糖
(2) 接种后第9d补加蔗糖
3-4表示从3%增加到4%,其余类推

2.5 在高糖浓度下培养细胞的形态变化

由于高糖浓度而产生的高渗透压,细胞的形态发生了很大的变化。糖浓度越高,则细胞体积缩小,湿重与干重之比减少,结果见图7。

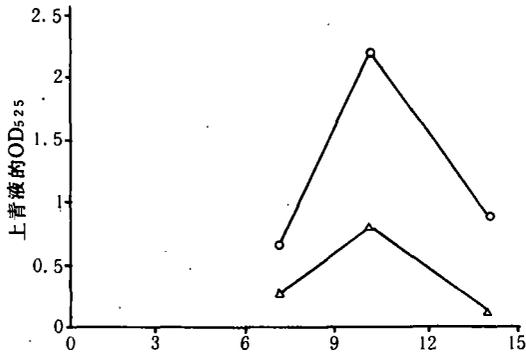


图6 在不同培养时间释放的色素

—▲— OD-S (3%)
—●— OD-S (4.5%)

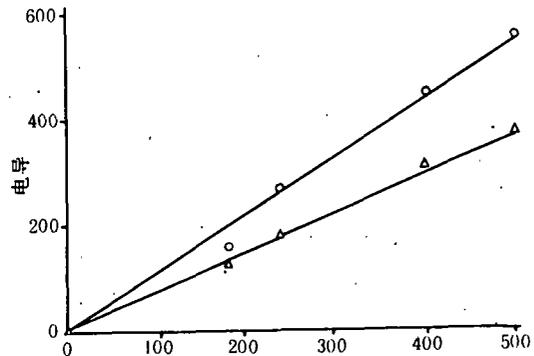


图7 蔗糖浓度对湿重与干重之比的影响

2.6 培养细胞的电导

各种细胞密度下的电导(用细胞体积分数%表示)值的测定采用神戸钢铁公司所制造的Cell Mass Meter. 电导值的数据表明了细胞膜的差别,结果表明在较高的蔗糖浓度下,由于较高的渗透压,细胞膜受到破坏,因而细胞的渗透性增加。释放的色素据另外的实验也是增加的,有关结果见图8。

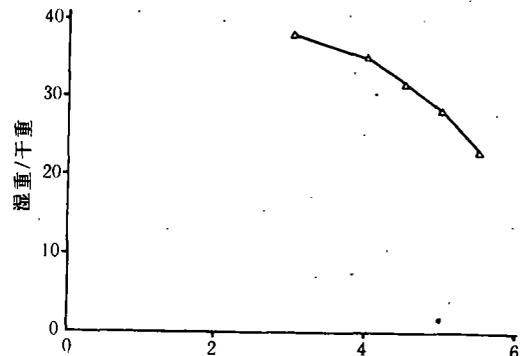


图8 细胞密度和细胞悬浮液的关系

—▲— ca 3% —●— ca 4.5%

3 讨 论

植物细胞分泌代谢产物的机理有主动输送和被动输送。主动输送又有不同的内因。如Atlanta曾报导过T. minus细胞分泌小檗碱的主动输送机理是与温度相关的,需要活化能52kJ/mol^[3]。

在正常的条件下,胞内的红色素很少分泌到培养基中。但在一些严厉的环境中,红色素及其它的一些成分会分泌出来,同时,也观察到细胞的存活性较差。因此可以认为红色素的释放是由于细胞的结构受到损害而引起的。各种不同的渗透剂对细胞的破坏,其机理也不相同,有必要进一步探讨。

由于蔗糖作为培养基中的碳源,在生理上对细胞本无影响,但过高的浓度会影响其色素的释放及细胞的存活性,这主要是渗透压的作用。在蔗糖浓度为4.0%~4.5%范围内,大多

数细胞在整个培养期间内可存活,但用于接种则不能继续生存下去,这对于连续培养是不适宜的。但是对间歇式培养则可能有利。因为蔗糖浓度在4.0%~4.5%范围内不仅释放色素较多,而且总的色素含量也有所提高,结果见图4-C。

作为食品中使用的色素,我们认为如用乙醇或乙酸萃取,可以直接用于某些食品的着色,这方面宜进一步研究。

致 谢

· 本项研究课题得到联合国教科文组织生物技术短期研究基金会的资助,在日本大阪大学生物工学国际交流中心吉田研究室进行。

参 考 文 献

- 1 Peter Brodelius. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, 27: 561~566
- 2 Jian-Jiang Zhong, Tatsuji Seki, Shin-ichi Kinoshita, and Toshiomi Yoshida, *Biotechnol. & Bioeng.* 1991, 38: 653~658
- 3 Mamoru Tabata. 1991, *Planta Med.*, 57, Supplement Issue 1, S21

Effects of Sucrose and Permeabilizing Agents on Anthocyanin Release from *Perilla Frutescens* Cultures

Xu Ganrong

Zhong Jianjiang

Toshiomi Yoshida

(Wuxi Inst. of Light Ind.) (Huadong University of science and technogy) (Osaka University, Japan)

Abstract The suspended culture of *Perilla frutescens* cells produce anthocyanin (red pigments) intracellularly. We found the red pigments could be released from the cells by treating the cell cultures with permeabilizing agents, such as toluene, chloroform, triton X-100, dimethylsulfoxide, acetate and ethanol. In another aspect, we found that anthocyanin was released from the cultured cells, and the cell growth as well as pigment production were improved, when the cells were cultivated in LS medium containing 4%~4.5% sucrose, compared with that of control containing 3% sucrose. We also found that more proteins in the cells were released into the medium and the average size of the cells (as indicated by the ratio of fresh weight to dry weight) was smaller in the former case than that in the latter, which may be due to the influence of osmotic pressure caused by sucrose. In addition, the capacitance data of these cell suspensions imply the difference of cell membrane between above two cases, and support the evidence of the permeabilization of *P. frutescens* at higher sucrose concentration.

Key-words *Perilla frutescens*; Permeabilization; Anthocyanin