

# 生物学因子对紫苏悬浮培养 细胞生长和花色素形成的影响

钟建江

(华东理工大学生化工程研究所 上海 200237)

吉田 正史

吉田 敏臣

(麒麟啤酒株式会社 栃木县 329-12 日本) (大阪大学生物工程国际交流中心 大阪 565 日本)

**摘要** 应用摇瓶培养研究了生物学因子,即:细胞聚集体大小、继代周期和接种量,对紫苏悬浮细胞生长和次生代谢物花色素产生的影响。结果表明:与未经筛选的或细胞聚集体小于  $250\mu\text{m}$  的细胞团块相比,大于  $250\mu\text{m}$  的细胞团块作为接种细胞时,培养所得的花色素含量较低。7—10 天为合适的继代周期,在长时期的继代过程中,细胞生长良好、并且色素含量也高。实验还表明,每升接种 50 克湿细胞最适合于细胞增殖与色素积累。

**关键词** 花色素生产,生物学因子,紫苏,植物细胞培养

在植物细胞培养中,影响细胞生长和代谢物形成因子包括生物学的、物理的和化学的因子。有关理化因子对植物细胞培养的影响已有许多报道,但是,关于生物学因子却信息较少。以往的研究表明,在胡萝卜、烟草和羊毛地黄细胞培养中,细胞聚集体大小<sup>(1)</sup>、继代周期<sup>(2)</sup>和接种量<sup>(3,4)</sup>是影响次生代谢物形成的重要因子。但到目前为止,对某一细胞系还缺乏针对生物学因子的系统考察。为了优化紫苏细胞培养环境、提高花色素的生产效率,本文首次针对生物学因子的影响进行了较详细的考察。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株和培养基

本工作采用紫苏高产细胞株。它是经紫苏叶子诱导得到愈伤组织,再通过细胞小聚集体法筛选获得的细胞系<sup>(5)</sup>。悬浮继代培养采用 Linsmaier 和 Skoog[LS]<sup>(6,6)</sup>基本培养基添加 3%(W/V)蔗糖、 $1\mu\text{mol/L}$  2,4-D 和  $1\mu\text{mol/L}$  6-BA。

### 1.2 培养条件

细胞在含 100ml 培养基的 500ml 三角摇瓶中,在  $25^{\circ}\text{C}$  连续白炽光灯照射下(强度为  $17\text{--}20.4\text{W/m}^2$ )的往复摇床(转速  $75\text{r/min}$ )进行培养。继代培养周期为 7—10 天,接种细胞浓度一般为  $25\text{g/L}$  湿细胞。接种后每隔 1 天取下一个摇瓶用于细胞生长、色素产生和残糖浓度的分析。

### 1.3 分析

细胞鲜重用孔径为  $30\mu\text{m}$  的尼龙网过滤、洗涤后称重。用冷冻干燥法测干重。残余糖浓度按苯酚浓硫酸法分析。花色素量用 1% 的盐酸甲醇溶液将色素从干细胞中抽出,再在  $525\text{nm}$  处测吸光度,然后根据标准曲线计算<sup>(5)</sup>。

本文在准备过程中得到国家教委留学回国人员基金的资助。

本文于 1993 年 11 月 16 日收到。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞聚集体大小对花色素产生的影响

将细胞筛选成各种尺寸大小,以未筛选的细胞作为对照,在继代培养中观察细胞聚集体大小对花色素产生的影响。如表 1 所示,与对照相比较,大于 250 $\mu\text{m}$  的聚集体只能获得较少的色素含量。这一结果表明细胞聚集体大小对代谢物生成有影响,可能是细胞与细胞间的信号传递与细胞团块大小有关。另外,也不能排斥传质对细胞代谢物产生的影响。

表 1 在摇瓶继代培养中紫苏细胞聚集体大小对色素产生的影响

Table 1 Effect of sizes of cell aggregates on anthocyanin accumulation by *Perilla frutescens* cells subcultured successively in a shake flask\*

Size ( $\mu\text{m}$ )	Anthocyanin content(mg/g,dry cell)				
	1	2	3	4	5**
Control	90	87.4	81.7	90.2	77.9
250-2000	67.6	56.2	66.2	54.5	42.1
149-250	76.3	50.3	81.8	79.7	81.4
37-149	105	71.9	88.7	85.5	64.9

\* : The cell growth was almost the same in all the above cases. The data shown here were an average of at least 3 samples. The cell aggregate sizes of the control were in the range of 37—2 000 $\mu\text{m}$  with a distribution similar to that described in a previous paper<sup>(6)</sup>.

\*\* : Successive subcultures

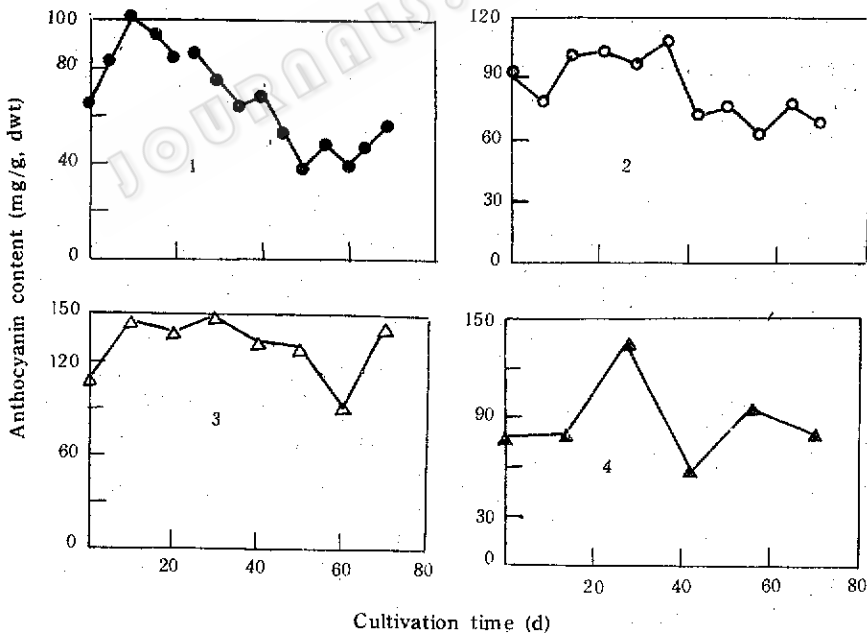


图 1 继代培养周期对紫苏细胞培养生产花色素的影响

Fig. 1 Effect of subculture periods on anthocyanin content of *Perilla frutescens* cells during successive subcultures in a shake flask.

Subculture period(d): A. 5; b. 7; C. 10; D. 14

### 2.2 继代周期对细胞培养的影响

将紫苏细胞分别以 5 天、7 天、10 天和 14 天和继代周期进行培养,针对继代周期对该细胞培养的影响进行了考察。如图 1 所示,细胞在 7 天和 10 天的继代周期的培养中具有较高的花色素含量,即较高的色素比生产率(mg/g, dry cell)。在 5 或 14 天的继代周期情况下,细胞的色素含量较低、也不稳定。研究表明细胞培养继代周期是维持长时间的细胞高产能力的重要因素之一。

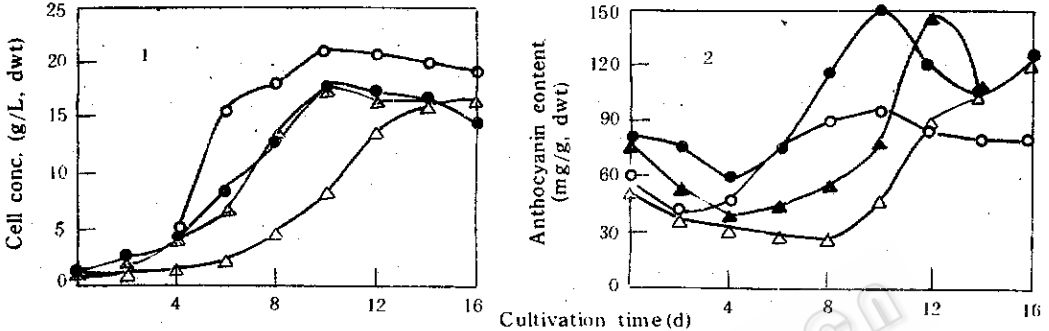


图 2 紫苏细胞在不同继代周期时生长和花色素的产生

Fig. 2 Time profiles of the growth and anthocyanin formation by *P. frutescens* cells in flask cultures at a different subculture period.

Symbols for subculture period(d):○. 5, ●. 7, ▲. 10, △. 14

A. Cell growth, B. Anthocyanin content

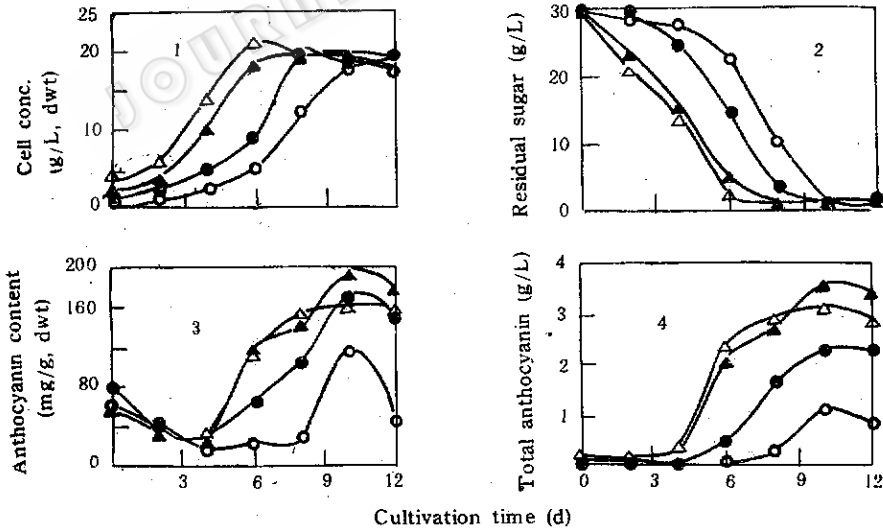


图 3 接种量对细胞生长与色素形成的影响

Fig. 3 Effect of inoculum densities on cell growth and pigment production by *P. frutescens* cells in flask cultures.

Symbols for inoculum densities(g/L):○. 15, ●. 25, ▲. 50, △75

A. Cell growth, B. Residual sugar(g/L, wet cell), C. Anthocyanin content, D. Total anthocyanin

图 2 显示了各继代周期培养中典型的细胞生长和色素形成的时间进程。实验表明,虽然继代周期为 5 天的细胞增殖较快,但色素比生产率较低。继代周期为 14 天的细胞生长较慢,花色素含量也不高。而以 7 或 14 天为周期继代的细胞相对维持良好的生长状态,并且色素比生产率也较高。

### 2.3 接种细胞浓度的影响

在含 100ml 培养基的 500ml 三角摇瓶的培养中,其他条件不变,将接种量控制在 15, 25, 50 或 75g/L,考察了接种细胞密度对细胞生长和色素生产的影响。结果见图 3。

细胞最终浓度十分相近,基质糖也大致在第 10 天左右消耗掉。但是,色素含量(mg/g, dry cell)和总色素生产量(g/L)却相差甚大。在较低接种密度时,花色素的含量和总色素产量较低,而在接种密度为 50g/L 时达到最高值。

### 参 考 文 献

- [1] Kinnersley A M, Dougal D K. *Planta*, 1980, 149: 200-204.
- [2] Mantell S H, Smith H. in: Mantell S, Smith H eds. *Plant Biotechnology*. London: Cambridge University Press, 1983, p. 75-102.
- [3] Ozeki Y, Komamine A. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1985, 5: 45-53.
- [4] Tuominen U, Toivonen L, Kauppinen V *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1989, 33: 558-562.
- [5] Zhong J J, Seki T, Kinoshita S *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1991, 38: 653-658.
- [6] Zhong J J, Seki T, Kinoshita S *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1992, 40: 1256-1262.

## Effects of Biological Factors on Cell Growth and Anthocyanin Formation by Suspended Cultures of *Perilla frutescens* Cells

Zhong Jianjiang

(Research Institute of Biochemical Engineering, East China University  
of Science and Technology, Shanghai 200237)

Masashi Yoshida

(Tochigi Factory, Kirin Brewery Co., Ltd, Tochigi 329-12, Japan)

Toshiomi Yoshida

(International Center of Cooperative Research in Biotechnology,  
Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka 565, Japan)

**Abstract** Effects of biological factors, i. e. size of cell aggregates, subculture period, and inoculum density, on cell growth and production of anthocyanin pigment (a secondary metabolite) by suspended cultures of *Perilla frutescens* plant cells were investigated on a flask scale. It was found that anthocyanin content was lower in a culture inoculated with cells of sizes greater than 250 $\mu$ m, compared with cells with unscreened sizes or with their sizes smaller than 250 $\mu$ m. Subculture periods of 7 days and 10 days were suitable for the cell cultures because favorable growth and a high level of anthocyanin content were maintained during a long period of subculture. An inoculum density 50g/L (Wet cell) was the best for both the cell growth and the pigment accumulation in flask cultures of *P. frutescens* cells.

**Key words** Anthocyanin production, biological factors, *Perilla frutescens*, plant cell culture