

小麦胚芽愈伤组织培养条件对维生素 E 积累的影响

张 恒

(淮阴工学院生物工程与化学工程系, 江苏淮安 223001)

摘要: 本研究通过优化小麦胚芽愈伤组织培养条件, 建立了合适的小麦胚芽细胞悬浮培养体系。选用 B₅、N₆ 和 SH 作为诱导培养基, 采用液体悬浮培养, 通过正交试验优选法确定最适培养条件。以次生代谢产物维生素 E 积累最多为目标, 考察培养基、温度以及 pH 值的影响。结果表明, 小麦胚芽在 B₅ 培养基中, 于 pH 值 5.0、25 ℃ 条件下培养 144 h, 能有效诱导愈伤组织, 且目标产物维生素 E 积累最多。

关键词: 小麦胚芽; 愈伤组织; 悬浮培养; 维生素 E

中图分类号: S512.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2006)01-0033-03

维生素 E 即生育酚是制药工业中的有用成分之一, 也是食品工业中的抗氧化剂。它能保护不饱和脂肪酸, 使其不被氧化成脂褐色素及其自由基, 从而维护细胞的完整和功能, 有一定的抗衰老作用。维生素 E 有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种异构体, 主要存在于植物油中。其中以 α 型的生理功效最高, β 、 γ 型的效价仅为 α 型的 50%, δ 型的功效约为 α 型的 1%^[1-4]。天然存在的生育酚是 d 构型, 而化学合成的为 dl 构型, 活性比前者低。因此, 应用生物技术制备天然生育酚已引起关注。

通过红花细胞培养来生产高活性的生育酚已有报道。Furuya 等^[5] 和甘烦远等^[6] 从红花花蕾的愈伤组织中分离到了生育酚, 并且主要是 α 型, 说明通过细胞培养来生产大量高活性的生育酚是可行的。常见植物特别是大田粮食植物, 以小麦胚芽中维生素 E 含量最高^[7-9], 但利用小麦胚芽细胞建立一个适合天然 α -维生素 E 的生产体系鲜见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

于无菌条件下从小麦中解剖得到小麦胚芽。

1.2 仪器

HH-6 数显恒温水浴锅(金坛市富华电器有限公司), KYC-111 摇床(上海福玛实验设备有限公司), 80-2 离心机(上海手术器械厂), SHB-III 循

环水式多用真空泵(郑州市华科仪器厂), LDZX 自动立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂), YS100 电子显微镜(飞宏电子有限公司), FA2004 上皿电子天平(上海精科天平厂)。

1.3 外植体的选择

小麦用清水洗净, 于 2% 的次氯酸钠中浸泡 10 min, 无菌水冲洗 4~5 遍, 置于 70% 酒精中浸泡 1~2 min, 无菌水冲洗 4~5 遍, 最后再放到无菌水中浸泡 10 h。将镊子与刀片消毒, 无菌室内操作, 取出小麦胚芽, 放入培养基中诱导愈伤组织。

1.4 培养基及培养条件

选用 B₅、N₆ 和 SH 作为诱导培养基, 采用液体悬浮培养, 通过正交试验优选法确定最适培养条件, 见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

水平	A(培养基种类)	B(pH 值)	C[温度(℃)]
1	N ₆	5.0	25
2	SH	6.0	27
3	B ₅	7.0	29

1.5 维生素 E 的含量测定

紫外分光光度法^[10,11]测定: 用无水乙醇溶解维生素 E 标准品, 定容; 以无水乙醇作空白对照, 于 284 nm 处制作标准曲线; 小麦胚芽研磨, 无水乙醇抽提维生素 E, 过滤; 滤液于 284 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线求得样品维生素 E 含量。

2 结果与分析

2.1 维生素 E 标准曲线方程

以标准维生素 E 浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标、284 nm 波长吸光度为纵坐标作图, 依据线性回归原

收稿日期: 2005-08-17

作者简介: 张 恒(1958—), 女, 江苏南京人, 硕士, 教授, 主要从事应用生物化学方面的研究。Tel: (0517) 6192501; E-mail: zh4501@sohu.com。

理^[9~12],求得回归方程为 $Y=0.05X-0.0068(R^2=0.998, P<0.01)$ 。

2.2 小麦胚芽培养时间与维生素 E 积累

选择 B₅ 培养基在 27 ℃ 条件下连续培养,据资料报道^[12],小麦成熟胚芽培养 7 d 后愈伤组织开始分化。自培养 96 h 起维生素 E 含量变化见图 1。

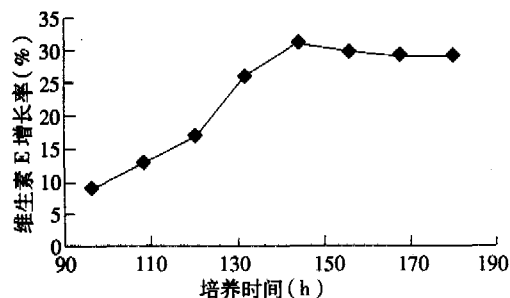


图 1 小麦胚芽培养时间和维生素 E 增长率的关系

结果显示,随培养时间延长,小麦芽胚维生素 E 增长率迅速增加,140 h 达到高峰,此后缓慢下降,170 h 起趋于稳定。次生代谢产物维生素 E 的积累过程与细胞生长过程相似,经历了对新环境的适应、迅速增长、趋于稳定等生化过程,分别相对于细胞生长延迟期、对数生长期、静止期和衰亡期^[13~15]。因此,维生素 E 分离的最佳时段可以选择在 140 h 左右的静止稳定期。

2.3 小麦胚芽培养时间与愈伤组织特征

在一定条件下离体的外植体可以形成愈伤组织,其形成过程是细胞的脱分化过程。一般认为诱发愈伤组织成败的关键在于培养条件。外植体上损伤的细胞能释放一种自溶产物,对诱导细胞的分裂起着重要作用。松脆的愈伤组织是进行悬浮培养最为合适的材料,经机械振荡容易分散成单细胞和小细胞团。应选择生长旺盛且结构疏松的愈伤组织作为继代培养的种子。愈伤组织能否成功诱导,在植物细胞培养中占据重要地位。小麦胚芽作为外植体诱导愈伤组织,随时间变化其愈伤组织也发生改变。在 B₅ 培养基于 29 ℃ 振荡培养,愈伤组织的特征变化见表 2。培养 144 h 时,愈伤组织的外观及显微镜结构见图 2。

表 2 小麦胚芽培养时间和愈伤组织的特征变化

培养时间(d)	小麦胚芽愈伤组织特征
2	大部分被淹没在培养基中,小麦胚芽的颜色为白色
5	培养基中的小麦胚芽为黄色,有少量白色组织分散在培养基中
8	培养基中的小麦胚芽为黄色,白色组织大量积累在培养基中



愈伤组织外观 愈伤组织细胞结构 愈伤组织纤维结构
图 2 小麦胚芽愈伤组织的外观及其在显微镜(40×10)下的细胞结构

2.4 培养条件优化

由于单从愈伤组织外观无法准确判断次生代谢目标产物产量高低,为了考察不同培养条件下小麦胚芽愈伤组织与目标产物的关系,按照正交表 L₉(3⁴)组合,以维生素 E 增长率最高为目标考察各因素的影响,试验结果见表 3。

表 3 正交试验结果及分析

试验号	因 素			维生素 E 含量增长率(%)
	A	B	C	
1	1	1	1	12.31
2	1	2	2	4.99
3	1	3	3	4.57
4	2	1	2	16.55
5	2	2	3	8.54
6	2	3	1	8.52
7	3	1	3	32.39
8	3	2	1	31.87
9	3	3	2	23.94
K ₁	21.87	61.25	52.70	
K ₂	33.61	45.40	45.48	
K ₃	88.20	37.03	45.50	
k ₁	7.290	20.42	17.57	
k ₂	11.20	15.13	15.16	
k ₃	29.40	12.34	15.17	
R	22.11	8.08	2.41	

在 3 个被考察因素中,培养基种类(A)对考核指标影响最大,pH 值(B)次之,培养温度(C)影响最小,最优水平组合为 A₃B₁C₁,即小麦胚芽在 B₅ 培养基中于 pH 值 5.0、25 ℃ 条件下培养 144 h。最适条件下的验证试验结果(表 4)与正交试验结果一

表 4 A₃B₁C₁ 组合验证试验结果

重复	维生素 E 增长率(%)
I	33.65
II	34.16
III	33.27
平均值	33.27

致,该条件适合小麦胚芽细胞培养。经继代培养及再次优化,维生素 E 的积累将进一步提高。

2.5 被考察因素与维生素 E 积累

2.5.1 培养基种类 培养基的营养组成是影响细胞成长和产物合成的主要因素之一。试验中选用 N₆、B₅、SH 3 种培养基,对小麦胚芽愈伤组织培养过程中培养基组成与维生素 E 含量关系进行考察,以确定最适培养基。由正交试验结果可知,培养基的种类与组成对维生素 E 含量影响较大。3 种培养基中维生素 E 含量大小依次为:B₅ > SH > N₆,且 B₅ 培养基中维生素 E 含量明显大于其他培养基,说明该培养基适合于小麦胚芽愈伤组织生长及维生素 E 积累,而 N₆ 培养基维生素 E 含量最小,这可能是由 B₅ 培养基中铵盐含量较少所致^[13~15]。培养基各组分含量变化对维生素 E 积累的影响有待进一步探讨。

2.5.2 pH 值 维生素 E 具有酚型结构^[1~4],其类型很多,但各同系物都由 6-羟色环及支链组成,是苯并二氢吡喃的衍生物。苯并吡喃环 6 号位上的羟基很易失去氢原子形成酚自由基,进而转变为醌,因此维生素 E 在酸性环境下较稳定。同时植物细胞适宜的生长环境也是偏酸性,因此培养基的 pH 值应在酸性范围内。试验条件下以 pH 值 5.0 左右最适宜。酸度过大会影响酶活性,使细胞代谢及次生代谢产物的合成速度降低,还可能使一部分组织受损。

2.5.3 温度 离体培养条件下,培养温度与植物细胞的脱分化、细胞分裂和再分化有着密切联系^[14,15]。温度低于 15℃ 或高于 35℃ 对植物细胞的分裂、分化十分不利,通常控制在 20~35℃。温度过低则愈伤组织生长缓慢,颜色较浅;过高则愈伤组织生长较快,但颜色较深。25~29℃ 范围内,温度对其影响不显著,且 25℃ 时维生素 E 积累最多。

3 结论

随着小麦胚芽愈伤组织培养时间的延长,次生代谢产物维生素 E 积累迅速增加,140 h 左右达到高峰,此后缓慢下降。维生素 E 的积累经历了对新环境的适应、迅速增长、趋于稳定等生化过程。

小麦胚芽愈伤组织最佳培养条件为:B₅ 培养基,pH 值 5.0,25℃,培养 140 h 左右,维生素 E 增长率 30% 以上。

小麦胚芽作为外植体诱导愈伤组织,随时间变化其愈伤组织也发生改变,培养 8 d,愈伤组织积累达到高峰。

参考文献:

- [1] 韩燕峰,梁宗琦,刘爱英. 天然维生素 E 的开发应用前景[J]. 贵州农业科学,2003,31(4):70~72.
- [2] Arbatskii AP, Afon'shin GN, Vostokov VM. Determination of vitamins in feed and foodstuffs by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2004, 59(12):1186~1189.
- [3] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社,2002.438~439.
- [4] 王 贤,张富平. 小麦胚芽营养成分及营养作用[J]. 周口师范学院学报,2002,19(5):43~46.
- [5] Tsutomu Furuya, Takafumi Yoshikawa, Takako Kimura, et al. Production of tocopherols by cell culture of safflower[J]. Phytochemistry, 1987,26(10):2741~2747.
- [6] 甘烦远,郑光植. 红花愈伤组织诱导、生长及其生育酚的产生[J]. 云南植物研究,1991,13(2):189~195.
- [7] 王尚玉,李庆龙. 小麦胚芽的开发利用[J]. 武汉工业学院学报,2004,23(2):28~31.
- [8] 葛毅强,孙爱东,蔡同一,等. 小麦胚芽的营养价值及开发思路[J]. 食品工业科技,1999,20(1):52~53.
- [9] 汤鲁宏,姚惠源,张 晖,等. 麦胚生物活性物质的研究进展[J]. 粮食储藏,1997,(4):38~45.
- [10] 龚经纬,乔志俭,晁党校,等. 紫外分光光度法测定复方维生素 E 霜中的维生素 E 的含量[J]. 兰州医学院学报,1994,20(2):87~88.
- [11] Pilar Ramos Lledó, Soledad Vera. Determination of vitamins A and E in milk samples by fluorescence in micellar media[J]. Fresenius J Anal Chem,2001,369:91~95.
- [12] 柳建军,于洪欣,冯兆礼. 小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化的研究[J]. 山东农业大学学报,1996,27(4):451~456.
- [13] 李 宝,韩振海. 落叶果树离体器官再生研究的现状和存在问题[J]. 中国农业大学学报,2004,9(1):31~36.
- [14] 郭 勇,崔堂兵,谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004.90~99.
- [15] 元英进. 植物细胞培养工程[M]. 北京:化学工业出版社,2004.24~106.