

植物细胞培养生产天然产物的研究进展

韩 迎 山

(中国科学院武汉植物研究所, 武昌)

提 要

植物细胞培养技术已成为工业化生产天然产物的一条新途径。本文概述了植物细胞悬浮培养和固定化植物细胞系统生产天然产物的研究进展,介绍了植物细胞培养的产物,提高产物产量的途径和培养系统等方面的研究动态,讨论了目前存在的问题以及未来的发展趋向。

一、引 言

自从1956年 Nickell 等人在美国专利中提出利用植物细胞培养技术工业化生产植物天然产物以来,目前,植物细胞培养技术已成为工业化生产植物天然产物的一条可取途径。继1983年日本三井石油公司首次利用培养的紫草细胞工业化生产出紫草宁之后,迄今已成功利用培养的黄连、人参和毛地黄细胞分别生产出小蘖碱、人参皂甙和地高辛;最近日本又利用固定化的秋唐松细胞在生物反应器中进行了小蘖碱的批量生产;此外,烟草、长春花和洋紫苏等植物也进行了细胞大量培养,并正在或即将过渡到工业化生产。总之,利用植物细胞培养技术生产药物、香精、香料、色素、调味品等天然产物已展现出极其广阔的前景^[1-7]。

二、植物细胞培养的产物

利用培养植物细胞的生物合成和生物转化能力可以产生出原植物所特有的化合物或者将外源加入的有机物转化成具有更高价值的化合物,甚至还可以产生出原植物所没有的新化合物。目前已知培养的植物细胞可以产生五十多

类次生代谢物,如生物碱、萜类、甾体、酚类、醌类等,可以用作药物、香精、香料、色素、调味品以及杀虫剂。从植物细胞培养物产生的新化合物中还可以筛选出新的药物。例如从 *Picralima nitida* 细胞悬浮培养物中分离出的 pericine,即是一种新的中枢神经系统活性的吲哚生物碱。从 *Plagiorhagma dubium* 细胞培养物中检测到的 pericalline、pericine 或抗炎化合物即是由培养细胞产生的具有生物活性和新的化学结构的化合物。可以预言,随着培养植物种类的增多以及灵敏的检测方法的发展,从植物细胞培养物中获得的天然产物也将不断增加^[7,8]。

三、提高产物产量的途径

利用植物细胞培养技术进行天然产物的商业化生产主要取决于提高产物产量的策略。通过高产细胞株的选择、环境条件的调节、添加前体等方法可以提高产物产量,近来则更注重采用胁迫诱导,固定化植物细胞技术和遗传操作等方法改进产物产量^[9]。目前已有几十种植物细胞培养物产生的代谢物高于整体植物(表1)^[10]。

1. 高产细胞株的选择

在培养的植物细胞群体中存在着生化和形态异质性, 利用单细胞克隆或小聚集块克隆法可以从中选择出天然产物含量高的细胞株。目前利用克隆技术已选择出高产色素、维生素、生物碱和甾类等化合物的细胞株。此外, 利用物理、化学因素对培养的植物细胞进行诱变处理也可以选择出高产天然产物的变异株或突变体。最近 Cocking 等人提出采用荧光激活细胞分选术 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 筛选植物细胞, 但由于植物细胞体积较大和不规则而存在困难^[9]。总之, 采用突变、选择以及复制平板培养技术可以选择出天然产物含量高的细胞株。

表1 一些产生等于或高于亲本植物化合物含量的植物细胞培养系统

植物种类	培养类型*	化合物	含量 (%干重)	
			培养物	植物
人参 (<i>Panax ginseng</i>)	C	人参糖甙	27	4.1
海巴戟 (<i>Morinda citrifolia</i>)	S	蒽醌	18	2.2
洋紫苏 (<i>Coleus blumei</i>)	S	迷迭香酸	16	3.0
紫草 (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)	S	紫草宁	14	1-2
日本黄连 (<i>Coptis japonica</i>)	S	卞基异喹啉生物碱	11	5-10
唐松草 (<i>Thalictrum minor</i>)	S	小藜碱	10	0.01
日本黄连 (<i>Coptis japonica</i>)	S	小藜碱	10	2-4
蓬子菜 (<i>Galium verum</i>)	S	蒽醌	5.4	1.2
猪殃殃 (<i>Galium aparine</i>)	S	蒽醌	3.8	0.2
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	C	烟碱	3.4	2.0
白药子 (<i>Stephania cepharantha</i>)	C	双衡州乌药碱	2.3	0.8
蛇根萝芙木 (<i>Rauwolfia serpentina</i>)	S	萝卡辛	1.6	0.25
长春花 (<i>Catharanthus roseus</i>)	S	阿吗碱	1.0	0.3
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	S	泛醌-10	0.50	0.003
雷公藤 (<i>Tripterygium wilfordii</i>)	S	雷公藤素乙 (Td)	0.05	0.001

* S = 悬浮培养 C = 愈伤组织培养

2. 环境条件的调节

环境条件中的化学和物理因素对培养植物细胞的生长和次生代谢物的合成有着极大的影

表2 固定化植物细胞进行的生物合成和生物转化

植物细胞	固定化方法	产物
生物转化		
长春花	琼脂糖 藻酸盐	Cathenamine → 阿吗碱异构物 色氨酸 → 阿吗碱
罂粟 毛地黄	琼脂或明胶 藻酸盐	色氨酸 → 阿吗碱 可待因酮 → 可待因
	藻酸盐	毛地黄毒苷 → 地高辛 甲基毛地黄毒苷 → 甲基地高辛
胡萝卜	藻酸盐	毛地黄毒苷配基 → 杠柳毒苷配基 莪毒配质 → 5β-羟基莪毒配基
薄荷	聚丙烯酰胺	薄荷酮 → 新薄荷醇 长叶薄荷酮 → 异薄荷酮
从头合成		
澳洲茄	聚苯氧化物	甾类糖甙生物碱
海巴戟	藻酸盐	蒽醌
辣椒	泡沫	辣椒素
长春花	藻酸盐	蛇根碱
	藻酸盐/聚丙烯酰胺	阿吗碱
	Xanthan/聚丙烯酰胺	蛇根碱
薰衣草	藻酸盐	蓝色素
甜菜	尼龙片	β-花青苷
烟草	Xanthan/聚丙烯酰胺	生物碱
	藻酸盐	烟碱
大豆	中空纤维	酚类
唐松草	藻酸盐	小藜碱
甘草	藻酸盐	反查尔酮, 甘草亭

响。调节培养基中激素、碳源、大量或微量元素的浓度和不同组合, 以及添加适量合适的前体可以促进培养细胞中次生代谢物的合成。此外, 调节温度、pH、通气和搅拌等物理因素也可以改进次生代谢物的产量。某些次生代谢物是植物抗毒素, 即植物只有在物理、化学、微生物或真菌等胁迫条件下才能合成此类化合物, 利用合适的病原体可以诱发植物细胞培养物在正常情况下不能大量产生的次生代谢物的形成。如利用一定的真菌诱发因子 (fungal elicitors) 可以触发罂粟培养物中血根碱的大量合成^[11]。

3. 固定化植物细胞

与悬浮培养比较, 固定化植物细胞的生长缓慢, 有利于次生代谢物的合成; 产生的代谢物

易于分泌到培养液中,便于连续操作;细胞操作寿命长以及遗传性状较稳定,利用固定化植物细胞生产天然产物具有极大的潜力^[42-44]。自从1979年 Brodelius 等人首次利用固定化的海巴戟、毛地黄和长春花细胞进行天然产物合成的研究以来,目前已成功地固定化了几种植物细胞(表2)。最近,日本三井石油公司已利用藻酸盐固定化的秋唐松细胞进行了小蘗碱的批量生产。总之,对固定化植物细胞的产物产量的提高、代谢产物的分泌、细胞操作寿命和生物反应器的深入研究将是提高产量、降低成本的一条新途径。

4. 遗传操作

随着遗传工程的发展,利用体细胞杂交、外源基因的人工导入和重组 DNA 技术可以创造出高产天然产物的细胞株。Yamada 等将产生小蘗碱的日本黄连与产生花色苷的铁海棠的原生质体融合后,获得了既产生小蘗碱又产生花色苷的高产杂种细胞。Fujita 等^[5]进行了紫草原生质体的融合。Berlin 等试图用遗传转化将色氨酸脱羧酶基因转移到骆驼蓬细胞以提高生物碱的含量;他们还提出克隆催化莨菪碱到东莨菪碱、番荔枝碱到 7-氧-二氢蒂巴因等重要反应的酶的基因可以在微生物中表达,这样将可以利用大肠杆菌大量生产重要的植物次生代谢物^[7]。经发根杆菌转化后的根培养物不仅具有激素自养能力,而且生长迅速,所形成的产物含量也高^[45]。最近日本住友化学工业公司已利用发根杆菌转化后的茄科植物的根培养物批量生产莨菪烷类生物碱。

四、培养系统

植物细胞能象微生物一样在成批培养、半连续培养、连续培养和固定化细胞系统中生长、分裂和合成产物^[46]。但是,植物细胞体积大,容易聚集成团,倍增时间长,对切变力敏感等特点,对其大量培养中的传质控制、无菌操作的维持和搅拌等提出了更高的要求。

在植物细胞大量培养中,用于植物细胞培养的生物反应器有多种类型。Wagner 等(1977)

认为气升式反应器因其切变力低最适于植物细胞培养。Tanaka 等(1983)推荐了旋转式鼓轮反应器,此反应器在高粘性和低流体应力条件下,供氧量较机械搅拌罐好,但放大较难,且难于连续运转。机械搅拌反应器也能用于植物细胞大量培养。Hashimoto 等(1982)已在装有传统叶轮搅拌器的 20000L 发酵罐中进行了烟草细胞的连续培养。Schiel 等(1984)也在装有平叶轮搅拌器的 5000L 发酵罐中进行了长春花、茄和烟草细胞的培养。Ulbrich 等(1985)报道了用于洋紫苏细胞培养生产迷迭香酸的新装置——螺旋系统,此系统不仅产生的天然产物含量高,而且能维持较高的生物量水平。Heggelin 等(1987)报道了一种低切变力的类似于流化床的生物反应器,可用于植物细胞聚集块的培养。用于固定化植物细胞的生物反应器主要有平床系统、柱状系统以及膜反应器^[47,48]。

植物细胞培养系统可以采用一级或二级操作形式(表3)。所采用的工艺形式主要取决于细胞培养中天然产物合成的动力学。由于大多数植物细胞培养物的次生代谢物合成与细胞生长和分裂呈负相关,成批培养通常只能获得细胞生长和产物产量最佳水平的折衷。而两级培养可以提供更有效的生产手段,即第一级尽可能快地产生细胞量,第二级通过改变培养条件使细胞生长和分裂降低以获得较高的产物合成。在两级操作中,也许理想的工艺策略是第一级进行连续培养,随后在第二级采用固定化

表3 植物细胞培养系统的工艺形式

单级操作	两级操作	
	第一级(生物量生产)	第二级(产物合成)
(1) 成批培养	(1) 成批培养	成批培养
(2) 补料成批培养	(2) 连续培养	成批培养
(3) 连续培养	(3) 连续/成批培养	固定化细胞系统
	(4) 补料成批培养	补料成批培养

细胞进行产物的连续生产。但在一级操作中,补料成批培养或半连续培养已成功地用于多种

表4 已投产或中试的植物细胞培养系统及其工艺形式

产物	工艺形式	单级或第一级	第二级	作者
紫草宁	两级	成批培养 气升式反应器	成批培养 气升式反应器	(日)三井石油公司 1983
迷迭香酸	两级	补料成批培养 螺旋反应器	成批培养 螺旋反应器	Ubrich 等, 1985
地高辛	两级	(1)连续培养 气升式反应器 (2)成批培养 气升式反应器	成批培养 气升式反应器 固定化细胞	Reinhard 等, 1980 Alferman 等, 1983
烟草	两级	成批培养 搅拌式反应器	成批培养 搅拌式反应器	Noguchi 等, 1977
牻牛儿苗	两级	成批培养 搅拌式反应器	成批培养 搅拌式反应器	Kanebo (日本)
吡啶生 物碱	两级	成批培养 传统搅拌罐	成批培养 传统搅拌罐	Berlin 等, 1987
人参	单级	成批培养 搅拌式反应器	—	Furuya 等, 1982
人参根	单级	成批培养 传统搅拌罐	—	Uskiyama 等, 1986

细胞系的培养。目前已工业化生产或达中试阶段的植物细胞培养大多采用了两级培养系统(表4)。

五、问题与展望

尽管植物细胞培养生产天然产物近年已有了迅速发展,但仍存在着许多问题。如增加产物产量并使其稳定,提高细胞生长速率、促进固定化细胞的产物释放以及培养技术的改进。采用高产稳定细胞株的选择、生产培养基的开发等传统方法可以提高培养细胞的生产率,但是,今后的研究仍应注重深入了解培养细胞的生

理、生化和遗传特性,特别是次生代谢途径的生化和分子机理,发展操作次生代谢途径表达的方法。可以预言,植物细胞培养技术将成为工业化生产天然产物的一条新途径。

参 考 文 献

- [1] 郑光植:《植物生理学通讯》,1987,2,76。
- [2] 侯嵩生:《武汉植物学研究》,1986,4(4),411。
- [3] 刘添:《生物工程学报》,1987,3(1),9。
- [4] 韩迎山:《生命的化学》,1987,7(3),3。
- [5] Fujita, Y.: *Plant Tissue and Cell Culture* (ed. by Green, C. E. et al.), Alan R. Liss, Inc., 1987. 169—185.
- [6] Fowler, M. W.: *Plant Cell Culture Technology* (ed. by Yeoman, M. M.), Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1986, 202—227.
- [7] Berlin, J.: *Biotechnology* (ed. by Rehm, H. J. et al.), Weinheim, 1986, 630—658.
- [8] Nickell, L. G.: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (ed. by Staba, E. J.), CRC Press, Inc., Florida, 1980, 235—269.
- [9] Rokem, J. S.: *Adv. Biotechnol. Process* (ed. by Mizrahi, A. et al.), Vol. 4, Alan R. Liss, Inc., 1985, 241—274.
- [10] Brodelius, P.: *Trends in Biotechnol.*, 1985, 3(11), 280.
- [11] DiCosmo, F.: *Trends in Biotechnol.*, 1985, 3(3), 11.
- [12] Shuler, M. L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986, 469, 270.
- [13] Rosevear, A.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, Vol. 31, Springer-Verlag, Berlin, 1985, 37—53.
- [14] 三上洋一:《细胞工学》,1986,5(11),959。
- [15] Flores, H. E.: *Trends in Biotechnol.*, 1987, 5(3), 64.
- [16] Fowler, M. W.: *Trends in Biotechnol.*, 1986, 8, 214.
- [17] Lindsey, K.: *Plant Biotechnol.* (ed. by Mantell, S. H.), Cambridge University Press, Cambridge, 1983, 39—66.
- [18] Prenosil, J. E.: *Enzyme Microb. Technol.*, 1983, 5, 323.

{本文于1987年10月21日收到}

(上接第11页)

与会代表一致认为这是一次成功的会议,规模不大,交流充分,形式多样,气氛活跃。会议由生物物理学会副理事长、分子生物物理专业委员会主任王大成主持。厦门大学生物系和中国生物物理学会办公室周到、细致的会务安排保证了会议的圆满成功。

根据代表的意见,专业委员会确定三年后召开第二届学术会议。

[中国科学院生物物理所 华庆新]