

三分三悬浮培养细胞中苯丙氨酸、鸟氨酸和莨菪碱至东莨菪碱的生物转化

郑光植 何静波 王世林

(中国科学院昆明植物研究所)

提要 在三分三悬浮培养中分别补充前体苯丙氨酸、鸟氨酸和莨菪碱时, 悬浮细胞的生长速率及东莨菪碱的转化率均以补充苯丙氨酸者为最高, 分别比未加前体的对照增加50.2%和4.0%。

在上述处理培养两周后于培养液中分别加入70 ppm的放线菌酮抑制蛋白质合成时, 虽然细胞中东莨菪碱的转化按克干重计算均有明显增加, 但是由于细胞生长受强烈抑制不利于东莨菪碱的总的转化, 按每瓶总干重计算的转化率均比对照低。

在分别补充三种前体并培养两周后使营养缺乏时, 细胞生长比对照稍有降低, 但细胞中东莨菪碱的转化却显著增加。特别是补充莨菪碱并使营养缺乏时, 大大利于莨菪碱转化为东莨菪碱, 转化率高达27.4%。既降低了培养成本又提高了东莨菪碱产量, 有利于未来的工业生产。

关键词 生物转化; 三分三; 悬浮培养

莨菪烷生物碱的生物合成途径E. Leete于1979年^[8]有过评论, 总结了近二十年来的研究工作, 肯定了从鸟氨酸至莨菪碱的生物合成途径。一些学者的工作^[9—11]表明, 苯丙氨酸是托平酸的前体。另一些学者^[15, 16]认为, 托平酸是莨菪碱的前体。我们于1977年^[2]曾报道在三分三愈伤组织培养中, 苯丙氨酸既促进生长又促进莨菪碱和东莨菪碱的合成, 并随其浓度的增加而增加。76年我们还发现在三分三愈伤组织培养中^[1], 莨菪碱的含量随培养时间延长而下降, 而东莨菪碱的含量则相应上升, 似乎在培养初期被愈伤组织合成的莨菪碱在培养的后期转化成东莨菪碱了。这些结果表明, 不仅苯丙氨酸是莨菪碱的前体, 而且莨菪碱是东莨菪碱的前体。而今, 由莨菪碱转化成东莨菪碱是东莨菪碱生物合成的最后一步已被公认^[7, 8, 12]。

为了提高三分三悬浮培养细胞中东莨菪碱的含量, 促进药用植物组织培养在工业化生产的应用, 本文选择了东莨菪碱生物合成的两个较远的前体苯丙氨酸及鸟氨酸和一个直接前体莨菪碱进行了从它们至东莨菪碱生物转化的初步研究。

材料和方法

供试材料为经35次继代培养并经冰冻贮藏^[5]后的三分三愈伤组织变异体^[4]。愈伤组织细胞悬浮培养的培养基是免去琼脂的MS培养液。培养方法、细胞生长速率测定方法及莨菪碱、东莨菪碱含量测定方法均同前^[1, 3]。

前体饲喂方法是将苯丙氨酸(5 mM)、鸟氨酸(5 mM)及莨菪碱(1 mM)分别补充到盛有培养液的500毫升三角瓶中。每瓶含100毫升培养液。不补充任何前体的处理为对照。每处理重复三次。培养四周后收获，分别测定各瓶的细胞生长速率、莨菪碱及东莨菪碱含量，取各处理的平均值。然后将各处理的东莨菪碱含量换算为毫克分子数。按照加入前体的毫克分子数和生成东莨菪碱的毫克分子数，求出各处理的转化百分率，其中以对照的转化百分率作为零。

放线菌酮抑制蛋白质合成试验是在上述前体饲喂试验培养两周后分别加入30 ppm的放线菌酮，并继续培养两周后收获。营养缺乏试验是在上述饲喂试验培养两周后，用插入培养液的特制吸管将培养液全部吸出(很少吸走培养细胞)后，加入新鲜的低营养培养液，并继续培养二周后收获。低营养培养液仍为上述MS培养液，只是其含氮量为原配方的50%，并省去蔗糖。放线菌酮抑制蛋白质合成试验和降低营养水平试验收获后，同前法测定生长速率和两种生物碱含量，并求出其生物转化率。

结果与讨论

如前言所述，如果苯丙氨酸、鸟氨酸是莨菪碱和东莨菪碱的前体的话，在三分三细胞悬浮培养中补充以苯丙氨酸和鸟氨酸，就能促进悬浮培养细胞中莨菪碱及东莨菪碱的合成。试验结果如表1所示。苯丙氨酸的补充使培养细胞中莨菪碱和东莨菪碱含量比未加前体的对照有较明显增加。苯丙氨酸至东莨菪碱的转化率按每克细胞干重为基础计算比对照增加了约1%，按每瓶细胞总干重计算比对照增加了4%。加入鸟氨酸也对两种生物碱的含量及从鸟氨酸至东莨菪碱的转化均有促进作用，有趣的是。苯丙氨酸和鸟氨酸的加入还明显地促进悬培细胞的生长。特别是苯丙氨酸，使悬浮细胞的生长速率比对照增加50.2%。这启示我们，这两种氨基酸不仅是合成莨菪碱和东莨菪碱的前体，而且也是合成蛋白质的前体。促进蛋白质的合成，从而促进了细胞的生长。这与Staba等人^[14]和Sairamta等人^[13]的试验结果不同。Staba等的结果是氨基酸对莨菪碱和东莨菪碱的产量没有影响。Sairamta等的结果是苯丙氨酸只利于生物碱的合成，不利于细胞生长。

从表1还可看出，莨菪碱加到培养液中时，对培养细胞的生长稍有抑制，对两种生物碱的合成也稍有促进。莨菪碱至东莨菪碱的转化率以细胞克干重为基础比对照增加了1.7%，但若以每瓶总干重计算则没有增加。看来，在三分三细胞中莨菪碱不大可能走东莨菪碱生物合成的逆向途径经由托平酸、托平、苯丙氨酸、鸟氨酸进而合成蛋白质促进细胞生长。这与Hashimoto等^[7]的试验结果相一致。

如果上述讨论是符合实际的，在细胞悬浮培养中用放线菌酮来阻断苯丙氨酸和鸟氨

表1. 苯丙氨酸、鸟氨酸和莨菪碱至东莨菪碱的转化
Table 1. Conversion of phenylalanine, ornithine and hyoscyamine to scopolamine

前体	生长速率	莨菪碱含量	东莨菪碱含量	转化率
Precursors	Growth rate	Hyoscy. cont.	Scopo. cont.	Conver. rate(%)
(mM)	(dry wt. mg/day/1)	(mg/g. dry wt.)	(mg/g. dry wt.)	g. dry wt. flask
苯丙氨酸 5	310.82	0.185	0.190	0.9 4.0
Pheny.				
鸟氨酸 5	223.29	0.181	0.185	0.5 1.2
Ornithi.				
莨菪碱 1	193.86	0.182	0.182	1.7 0.0
Hyoscy.				
对照 0	200.97	0.197	0.177	0.0 0.0
Control				

酸合成蛋白质的某一步骤，则必然使苯丙氨酸和鸟氨酸走合成东莨菪碱的途径。两种生物碱的含量将显著增加，同时细胞生长将被强烈抑制。结果如表2所示，情况正是这样。

表2. 放线菌酮对苯丙氨酸、鸟氨酸和莨菪碱至东莨菪碱转化的影响
Table 2. Effect of actidione on conversion of phenylalanine, ornithine and hyoscyamine to scopolamine

前体	生长速率	莨菪碱含量	东莨菪碱含量	转化率
Precursors	Growth rate	Hyoscy. cont.	Scopo. cont.	Conver. rate(%)
(mM)	(dry wt. mg/day/1)	(mg/g. dry wt.)	(mg/g. dry wt.)	g. dry wt. flask
苯丙氨酸 5	99.63	0.190	0.280	6.8 -1.2
Pheny.				
鸟氨酸 5	113.43	0.185	0.251	4.0 -1.2
Ornithi.				
莨菪碱 1	121.64	0.182	0.210	10.9 -6.0
Hyoscy.				
对照 0	148.73	0.170	0.158	— —
Control				
对照（正常培养）	200.97	0.197	0.177	0.0 0.0
Normal culture				

当在悬浮培养中加入苯丙氨酸、鸟氨酸和莨菪碱后用放线菌酮抑制蛋白质合成时，莨菪碱、东莨菪碱含量和以细胞克干重为基础的东莨菪碱的转化率均有明显增加。但由于悬培细胞的生长受到强烈抑制，使东莨菪碱按每瓶细胞总干重计算的转化率均低于未加放线菌酮的对照。因此用放线菌酮抑制蛋白质合成的某一步骤的办法不能提高东莨菪碱的产量。

提高东莨菪碱产量的另一办法是补充苯丙氨酸、鸟氨酸和莨菪碱等前体到三分三悬浮培养的后期，并在培养两周后大量减少糖、氮的供应，使氨基酸、蛋白质合成降低，补充的三种前体就应走东莨菪碱生物合成路线，从而使东莨菪碱的产量大幅度增加。试验结果列于表3。

表3. 营养缺乏对苯丙氨酸、鸟氨酸和莨菪碱转化至东莨菪碱的影响
Table 3. Effect of nutritive absence on conversion of phenylalanine, ornithine and hyoscyamine to scopolamine

前体	生长速率	莨菪碱含量	东莨菪碱含量	转化率
Precursors	Growth rate (mM) (dry wt. mg/day/1)	Hyoscy. cont. (mg/g. dry wt.)	Scopo. cont. (mg/g. dry wt.)	Conver. rate(%) g. dry wt. flask
苯丙氨酸 5 Pheny.	185.36	0.188	0.277	6.6 1.2
鸟氨酸 5 Ornithi.	195.75	0.181	0.250	4.8 1.2
莨菪碱 1 Hyoscy.	190.14	0.183	0.261	27.4 6.0
对照 0 Control	200.14	0.180	0.160	— —
对照(正常营养) Normal nutritive	216.22	0.178	0.178	0.0 0.0

表3表明试验结果与设想一致。在分别加入三种前体培养两周后，使氮、糖缺乏时，悬浮培养细胞的生长速率比未加前体的对照和正常营养的对照均稍有降低。而培养细胞中莨菪碱和东莨菪碱含量均有显著提高。无论按每克细胞干重计算或按每瓶细胞总干重计算的东莨菪碱的转化率均有显著提高。特别是加入莨菪碱并使之营养缺乏时，大大利于由莨菪碱向东莨菪碱的转化，其转化率可高达27.4%。即使按每瓶细胞总干重计算，转化率也可达6.0%。这一点十分重要，因为东莨菪碱的价格比莨菪碱高（约10倍）得多，医用量比莨菪碱少得多，且产东莨菪碱的资源植物又缺乏，加之东莨菪碱在植物中的含量又比莨菪碱的含量低得多[1、5]。如在未来的工业生产的培养液中，添加莨菪碱，同时减少糖、氮供应，既降低了培养成本又增加了东莨菪碱产量，一举两得。

表3还进一步表明莨菪碱至东莨菪碱的生物转化比苯丙氨酸和鸟氨酸至东莨菪碱的转化效率高。

我们在早期的研究中发现三分三愈伤组织及其悬浮培养细胞的生长与其生物碱合成有着矛盾现象[2、5]。本文报道的结果使之得到了解答，这种矛盾现象是由于细胞生长过程和莨菪碱、东莨菪碱在细胞内的生物合成过程争夺前体所致。

根据上述试验结果，并总结各国科学家关于托平烷生物碱的生物合成方面的研究结果[6—16]，和我们过去对三分三愈伤组织培养的研究结果[1、2]，提出如下图1所示的关于托平烷生物碱在植物细胞中代谢途径的假说。

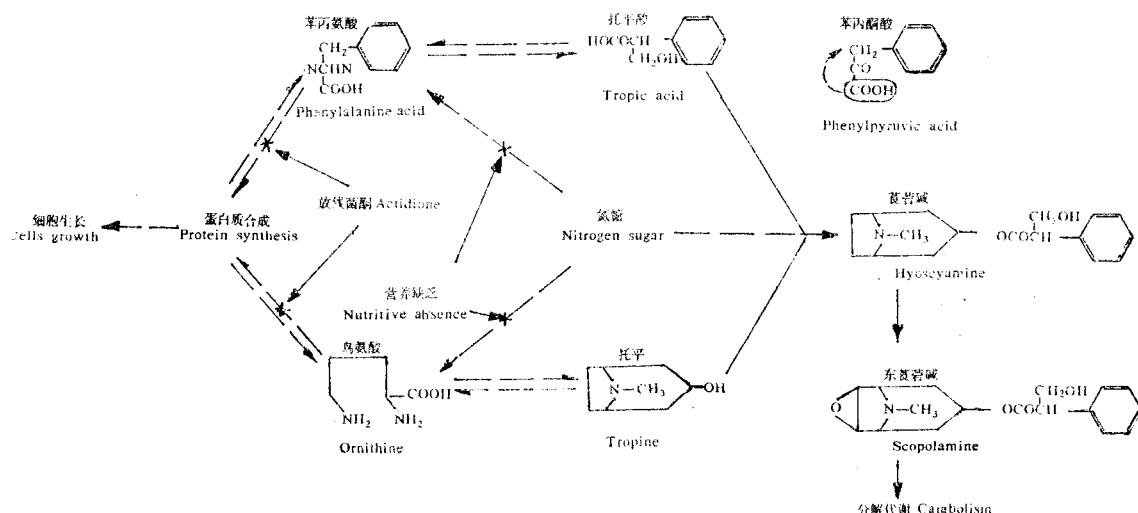


图1. 托平烷生物碱在植物细胞中的可能代谢途径

Fig. 1. Possible metabolism pathway of tropane alkaloids in plant cells

在植物细胞中，鸟氨酸经若干反应最后经由托平转化为莨菪碱的氮杂环骨架部分。苯丙氨酸经若干反应，其中可能经苯丙酮酸的羧基移位，再经由托平酸转化为莨菪碱的侧链部分。莨菪碱经氧化作用形成东莨菪碱。东莨菪碱在植物细胞中是次生物质代谢的最终产物，但它也可能参与细胞中的分解代谢。苯丙氨酸和鸟氨酸的另一代谢途径是沿东莨菪碱生物合成相反的方向，经由蛋白质的合成进而导致细胞的生长。蛋白质的合成也经若干反应，其中重要的反应是DNA指导RNA合成从而导致蛋白质合成。莨菪碱至东莨菪碱的转化和托平酸、托平至莨菪碱的转化则是不可逆的。

参考文献

- [1] 郑光植、梁峰, 1976: 药用植物组织培养的研究 I. 三分三愈伤组织的培养及莨菪碱东莨菪碱的产生。植物学报, 18(2): 163—169。
- [2] 郑光植、梁峰, 1977: 药用植物组织培养的研究 II. 三分三愈伤组织的生长、莨菪碱和东莨菪碱合成的化学调节。植物学报, 19(3): 209—215。
- [3] 郑光植、何静波、王世林, 1982: 药用植物组织培养的研究 IV. 三分三细胞悬浮培养中的激素调节。植物生理学报, 8(1): 53—58。
- [4] 郑光植、何静波、王世林, 1983: 药用植物组织培养的研究 V. 生长速率和东莨菪碱含量皆高而稳定的变异体。植物生理学报, 9(2): 129—134。
- [5] 郑光植、何静波、王世林, 1983: 三分三愈伤组织及其悬浮培养细胞的冰冻贮藏。植物学报, 25(6): 512—518。
- [6] Chan, W. and E. J. Staba, 1965: Alkaloids Production by Dature Callus and Suspension Tissue Cultures. *Lloydia*, 28(1): 55—62.
- [7] Hashimoto, T. and Y. Yamada, 1983: Scopolamine Production in Suspension Cultures and Redifferentiated Roots of *Hyoscyamus niger*. *Planta Medica*, 47: 195—199.

- [8] Leete, E., 1979: Biosynthesis and Metabolism of the Tropane Alkaloids. *Planta Medica*, 36 (2): 97—112.
- [9] Leete, E. and M. L. Louden, 1961: Biogenesis of Tropic Acid: Origin of the Hydroxymethyl Group. *Chemistry and Industry*, 26:1045.
- [10] Leete, E., 1968: Observations on the Non-enzymatic Transformation of Phenylalanine to Tropic Acid. *Tetrahedron Letters*, 55:5793—5794.
- [11] Louden, M. L. and E. Leete, 1962: Further Studies on the Biosynthesis of Tropine Acid. *Amer. J. Chem. Soc.* 84(23):4057—4059.
- [12] Overton, K. H. and D. J. Picken, 1978: Studies in Secondary Metabolism with Plant Tissue Cultures. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 249—299.
- [13] Sairamta, T. V. and P. Khanna, 1971: Effect of Tyrosine and Phenylalanine on Growth and Production of Alkaloids in *Datura tatula* Tissue Cultures. *J. Nat. Products*, 34:170—171.
- [14] Staba, E. J. and A. Jindra, 1968: Dature Tissue, Production of Minor Alkaloids from Chlorophyllous and Non-Chlorophyllous Strains. *J. Pharm. Sciences*, 57(4): 701—704.
- [15] Stohs, S. J., 1969: Production of Scopolamine and Hyoscyamine by *Datura stramonium* L. Suspension Cultures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(6):703—705.
- [16] Tabata, M., H. Yamamoto, and N. Hiraoka, 1971: Alkaloid Production de Tissue de Plants. PP. 389—401, C. N. R. S. Paris.

BIOTRANSFORMATION OF PHENYLALANINE, ORNITHINE AND HYOSCYAMINE TO SCOPOLAMINE IN THE SUSPENSION CULTURE OF *ANISODUS ACUTANGULUS* CELLS

Zhehg Guangzhi, He Jingbo and Wang Shiling

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract When the suspension cultures of *Anisodus acutangulus* were supplemented with precursors of either phenylalanine, ornithine or hyoscyamine, phenylalanine was found to be most effective in promoting both the cell growth and its conversion to scopolamine. The growth rate of the cultures adding phenylalanine as precursor was 50. 2% higher than that without phenylalanine and the ratio of conversion was 4.0%

Upon addition of actidione at the concentration of 30 ppm to the two-week-old cultures, protein synthesis was inhibited. Under such conditions, although the ratio of conversion from various precursors to scopolamine in the cells was increased markedly in terms of gram dry weight, the total scopolamine production per culture flask actually was decreased due to the fact that cell growth

was strongly inhibited by actidione, resulting on lower dry weight yield of scopolamine than the control.

Cell cultures supplimented with three precursors that were allowed to grow for two weeks and then nutritionally depleted had lower cell growth rate than the control, but their conversion rate from precursors to scopolamine was actually increased significantly, especially in the case where addition of hyoscyamine and depletion of nutrition were done at the same time. Under such conditions, the conversion rate from hyoscyamine to scopolamine was as high as 27.4%. These findings showed that the rate of conversion from precursors to scopolamine could be raised while reducing the production (culturing) cost may be applied beneficially to scopolamine production on industrial scale.

Key words Biotrasformation; *Anisodus acutangulus*; Suspension culture