

提高植物培养细胞中次级代谢产物含量的途径

甘烦远 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

THE PATHWAYS OF PROMOTING SECONDARY METABOLITE CONTENTS IN PLANT CELL CULTURES

Gan Fan-yuan Zheng Guang-zhi

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

利用植物细胞培养的方法可以取代人工栽培、天然采集或人工合成的方法大量生产很多具有价值的产物(如药品、农药、香料、色素及食品添加剂等)。目前,利用紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)培养细胞生产紫草素^[11],利用人参(*Panax ginseng*)根培养物生产食品添加剂等已进入商业市场^[1]。另外,利用黄连(*Coptis japonica*)培养细胞生产小蘗碱^[18]、利用长春花(*Catharathus roseus*)培养细胞生产蛇根碱及阿吗碱^[15]和利用毛地黄(*Digitalis lanata*)培养细胞生产地高辛等^[34]亦都进行了工业化生产。尽管这样,由于植物培养细胞亦存在着一些缺点如很多培养物中代谢物含量很低或不存在、生长速度缓慢加上目前发酵成本过高、很多关键性问题未解决等等,使之未能广泛地应用于工业化生产。近年来,为了解决上述诸问题特别是解决培养物中代谢物含量低的问题,各国科研人员进行了不懈的努力,取得了长足的进展。本文着重对这方面近年来采用的新方法及新技术的研究作一概述。

最适培养条件的调控

迄今为止,许多学者已对影响植物细胞生长和代谢物含量的各种化学的和物理的因素作了详细的研究^[33]。这些因素是获得最佳产物含量的最基本方法之一。

培养基中的蔗糖和葡萄糖常常是使培养物的生长达到最高的碳源。而增加蔗糖的浓度往往会提高培养物的产物含量^[28]。只有少数报道认为葡萄糖更有利于产物的积累^[14]。提高培养基中硝酸盐、磷酸盐及钾盐的浓度倾向于促进细胞生长,而降低氮源和磷酸盐浓度则能增

表1 增加前体提高代谢物含量的一些例子

植物培养细胞	前体	代谢物
胡芦巴 (<i>Trigonella foenumgrascum</i>)	烟酸	胡芦巴碱
瓦氏龙舌兰 (<i>Agave wightii</i>)	胆甾醇	皂草甙元
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	肉桂酸	苯乙烯醛基丁二胺
	苯丙氨酸、酪蛋白氨基酸	莨菪灵、莨菪亭
洋紫苏 (<i>Coleus blumei</i>)	酪氨酸、多巴、苯丙氨酸	迷迭香酸
紫花洋地黄 (<i>Digitalis purpurea</i>)	孕甾酮、胆甾醇	洋地黄毒甙
白猪殃殃 (<i>Galium mollugo</i>)	琥珀酰苯甲酸	蒽醌
天仙子 (<i>Hyoscyamus muticus</i>)	柠檬酸、鸟氨酸、 乙酰酪氨酸	生物碱
长春花 (<i>Catharanthus roseus</i>)	色氨酸、色胺、 Secologanin	蛇根碱、阿吗碱
玫瑰 (<i>Rosa rugosa</i>)	半乳糖内酯	抗坏血酸
雷公藤 (<i>Tripterygium wilfordii</i>)	法呢醇	雷公藤内酯
红花 (<i>Carthamus tinctorius</i>)	植醇	维生素E
辣椒 (<i>Capsicum frutescens</i>)	异癸酸、香苯胺	辣椒素
金鸡纳 (<i>Cinchona ledgeriana</i>)	色氨酸	喹啉生物碱
日本莨菪 (<i>Scopolia japonica</i>)	托品酸	生物碱
三角叶薯蓣 (<i>Dioscorea deltoidea</i>)	胆甾醇	薯蓣皂甙元
紫草 (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)	苯丙氨酸	紫草宁
人參 (<i>Panax ginseng</i>)	醋酸钠、法呢醇	人參皂甙
西洋参 (<i>Panax quinque folium</i>)	角鲨烯	人參皂甙

加代谢物的含量[25]。钙和其他微量元素如锰、铜等也对产物的积累有促进作用[21]。有时在培养基中加入不同的添加物也能有效地刺激产物的积累。例如在红花 (*Carthamus tinctorius*) 培养细胞中, 加入0.1%水解酪蛋白可使维生素E的产量提高约5倍[20]。

培养细胞生长及其产物积累需有一适合的接种量。在紫草细胞培养中, 细胞收获量与接种细胞量呈正比例增加, 但细胞的紫草素产率在种细胞量达6克/升干重时为11%, 达到最大值, 在此之上的种细胞量抑制紫草素的生产, 含量急剧下降[6]。

在培养基成分对产物形成的影响中, 研究最多的就是各种植物激素了。对这类物质的浓度或组合稍加改变, 往往能造成次级代谢产物含量的显著变化, 在决定某一培养物的潜在生产力上具有重要的作用[37]。

关于如何控制培养环境的物理条件(如温度、pH值、光照等)以增加产物含量的问题, 已经有了系统的研究, 证明了这些物理因素肯定能影响产物的含量[34]。

不同培养基之间对产物合成亦有较大的影响。促进细胞生长与产生有效成分的培养基不一定相同, 在这种情况下, 最好的方法就是采用两步培养法。自从Zenk在1977年首次提出“两步培养法”[46]以来, 已在多种材料中得到应用并取得了较好的结果。如Fujita等[17]利用两步培养法(先在生长培养基中使紫草细胞快速生长, 然后转移到生产培养基中大量合成紫草素)生产的紫草素含量高达细胞干重的14%。1983年日本三井石化公司开始利用植物细胞培养方法生产紫草素, 以后又做成成品(唇膏、肥皂等)投入市场, 成为第一个植物细胞工程产品[11]。

增加前体和生物转化

— 加入前体可以刺激产物的生物合成进而提高次级产物的含量。如Yeoman等在利用辣椒培养细胞生产辣椒素的研究中,加入辣椒素合成的前体香苯胺和异构辣椒素的方法,使辣椒素的产量提高百倍之多^[43]。加入前体的效果往往很不一致。因此有必要加强对次级代谢产物生物合成途径的基础研究。表1列举了一些加入前体增加产物积累的例子。在研究中应注意加入前体的浓度、饲喂的时间及使用方法等问题。

生物转化是利用植物培养细胞进行工业化生产有用产物的另一种手段。如德国的Alfermann实验室利用毛地黄的培养细胞能使 β -甲基毛地黄毒甙几乎100%地转化为 β -甲基地高辛^[7]。目前他们正在进行4000升更大规模的工业化试验,估计很快就会进入商业性生产^[34]。另外,在胡萝卜、长春花、薄荷、罂粟等植物细胞培养中也成功地进行了代谢物生物转化试验^[36]。利用生物转化不仅可以提高所需产物的含量,而且还可以转化在正常情况下植物不含有的化合物或产生新的产物。因此,这方面的应用正越来越受到重视。

诱导子的应用

所谓诱导子“Elicitors”是一类特殊的触发因子。在很多情况下它能开启代谢过程中酶的活性^[12],因而能增加次级代谢产物的含量,有时甚至可以诱导形成新的化合物(表2)。由于诱导子对植物细胞的专一性不同,因而选择适宜种类的诱导子是很重要的^[26]。

诱导子诱导产物形成的必要前提是要在相对短的时间内获得大量增殖的培养细胞,但这并不总是能做到的。因此,必须结合其他的提高细胞生长的方法,使植物培养细胞的生长与代谢物含量同时提高。

发状根培养

与细胞分化有关的可增加培养细胞中代谢物含量的另一途径是“发状根”(hairy root)的诱导和培养。发状根是植物各器官受到土壤细菌*Agrobacterium rhizogenes*的发根突变种感染而产生的。它是细菌中Ri质粒的T-DNA插入寄主细胞核基因组而得到的表现型。发状根有大量的根毛而且具有丰富的侧向分枝,因而生长速度很快(典型的加倍时间为2—4天),这样的速度几乎超过所有的未经转化的根培养物及多数悬浮培养物。目前已从很多种双子叶植物中获得了发状根培养物^[35]。从这些生长迅速、产物产生高而又稳定的发状根培养物中,已获得了很多目的成分的化合物。如Yoshikawa^[44]利用*A. rhizogenes*的A4菌株感染人参的愈伤组织生长出的发状根,其生长比原来的愈伤组织快,产生的皂甙亦较多。Flores等报道^[16],转化成功的赛苜蓿属和天仙子属发状根可保持稳定生物碱高产达25个月以上。Hamill等^[23]对烟草及甜菜的研究亦取得类似上述的结果,并可将产生的烟碱释放到培养基中。另外,对长春花、曼陀罗、金鸡纳和紫草等植株都已获得发状根并能产生相同于母本的目的化合物。因此,利用发状根培养以生产次级代谢产物是具有极大潜力的,具有进一步开发的價值。但对次级产物的工业化生产来说,尚需研究出一套适用于发状根大量培养原生产工艺。

表2 诱导子诱导植物培养细胞代谢产物的形成

植物培养细胞	诱导子	代谢产物
芸香 (<i>Ruta graveolens</i>)	脱乙酰几丁质、 真菌多糖	吡啶酮
罂粟 (<i>Papaver somniferum</i>)	真菌孢子、 真菌菌丝体	可待因、 吗啡、血根碱
长春花 (<i>Catharanthus roseus</i>)	二乙氨基二氯苯乙酰 5-氟胞苷 真菌多糖 甘露醇 渗透压 真菌培养滤液	阿吗碱、长春新碱 里立脂素单葡萄糖甙 多炔 蛇根碱 阿吗碱、长春新碱 阿吗碱、长春新碱
紫草 (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)	活性炭 琼脂胶 寡糖素 真菌多糖	海胆呋喃B 紫草宁 紫草宁 氧化补骨脂素、 补骨脂内脂、 Graveolone
石蛇床 (<i>Petroselinum hortense</i>)		几丁质甘油阮
大豆 (<i>Glycine max</i>)	脱乙酰几丁质、 多聚赖氨酸、 真菌葡聚糖	
菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	真菌细胞壁物质、 变性核糖核酸酶	菜豆阮
鬼针草 (<i>Bidens pilosa</i>)	真菌培养物	苯基庚三烯
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	真菌匀浆 黑曲霉多糖、 压热RNA酶	Phytuberin、Rishitin 顺式-十五碳-6-烯-1,3- 二炔-5,15-二醇 顺式-十五碳-1,9-二烯- 4,6-二炔-3,5-二醇 薯蓣皂甙元 6-甲氧基蜂蜜曲菌素
三角叶薯蓣 (<i>Dioscorea deltoidea</i>)	真菌菌丝体	
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	真菌匀浆、 寡糖及多肽	
落花生 (<i>Arachis hypogea</i>)	紫外线	3,4,5-三羟基二乙烯
唐松草 (<i>Thalictrum rugosum</i>)	酵母提取液	小藜碱
花菱草 (<i>Eschscholtzia californica</i>)	真菌细胞壁成分	苯并吡啶生物碱
山辣椒属 (<i>Tabernaemontana sp.</i>)	纤维素酶、 真菌滤液	鸟散羧酸衍生物
粗榧 (<i>Cephalotaxus hayingtonia</i>)	真菌菌丝体	三尖杉碱、 高三尖杉碱
棉树 (<i>Gossypium arboreum</i>)	真菌孢子	棉酚
茜草 (<i>Rubia tinctorius</i>)	真菌菌丝体	蒽醌
金鸡纳 (<i>Cinchona ledgeriana</i>)	真菌菌丝体	蒽醌
海巴戟 (<i>Morinda citrifolia</i>)	纤维素酶	蒽醌
豇豆 (<i>Vigna angularis</i>)	放线菌素D、钒酸钠	黄豆甙原衍生物
三七 (<i>Panax notoginseng</i>)	寡糖素、甘露醇	人参皂甙
人参 (<i>Panax ginseng</i>)	寡糖素、真菌菌丝体	人参皂甙
西洋参 (<i>Panax quinque folium</i>)	寡糖素、真菌菌丝体	人参皂甙
红花 (<i>Carthamus tinctorius</i>)	寡糖素	α -生育酚

植物细胞固定化技术的应用

植物细胞固定化是将植物细胞包裹于一些多糖或多聚化合物(如褐藻酸盐、琼脂和聚丙烯酰胺等)内或吸附在这些惰性基质上进行培养,并生产有用代谢物的技术。与液体培养的游离细胞相比,它具有提高反应效率、延续反应时间及保持产物生产的稳定等优点。目前应用植物细胞固定化技术主要进行生物合成及生物转化的研究。如Brodelius等^[10]发现固定在褐藻酸盐中的长春花细胞合成阿吗碱的能力比游离的高出40%,并且其累积生物碱的能力达150天以上,产生的生物碱可分泌到培养基中。又如,固定的毛曼陀罗细胞当加入莨菪烷前体鸟氨酸时,9天后生物碱含量比未处理的高0.5毫克/克干重^[32]。而固定化的罂粟细胞,可进行由可待因酮转化为可待因的生物转化,且能连续培养6个月,其中88%的可待因甲基吗啡分泌到胞外培养液中去。而对这些分泌作用的机理目前尚不清楚^[19]。

高产细胞系的筛选

植物细胞培养工业化应用的关键前提之一是必须有一个高产并稳产的细胞系。由于植物培养细胞具有高度的变异性及异质性,因此通过自然筛选或诱变筛选均有可能从中筛选到所需性状的细胞变异系。如利用目视法可以从培养细胞中筛选到具高含量色素的细胞系^[13]。利用放射免疫分析法可以从单细胞水平上进行筛选^[17],因而筛选到的高产细胞系其稳定性就很高。利用其他的自然筛选方法如抗性筛选法、生物试法、显微分光光度法、酶标免疫法、GC-MS联用法、薄层层析及高效液相色谱法等都能够筛选到高产的细胞系^[8]。这些快速、灵敏的分析方法可大大缩短筛选时间,同时结合单细胞克隆技术进行筛选可使选择到的高产细胞系同质化并具有较好的遗传稳定性。

应用各种化学或物理的诱变因子处理进行诱变筛选,亦已取得极大进展。有些筛选的突变体表现了良好的生产能力^[4]。有关这方面的进展可参考最近报道^[2, 3]。

提高次级代谢产物含量的研究进展

培养细胞中有些产物可以分泌到培养基中,但大部分产物一般都贮存于细胞液泡内。无疑增加产物外渗就有可能提高细胞内产物积累。除了应用固定化技术之外,目前还有主要的两种方法,第一是增加细胞膜的通透性,在培养基中加入各种诱导外渗物质如二甲亚砜(DMSO)、活性炭、非离子吸附树脂或用超声波等处理都可有效地刺激产物外渗进而提高产物产量^[29]。第二是在培养基中加入吸收剂,如Knoop等^[31]利用矿物油和Miglyol等形成的两相系统处理母菊属植物*Matricaria chamomilla*的培养细胞,发现其渗到油相的精油含量比在单相系统中高60倍。目前,对产物外渗机理已有一定了解,Yamamoto等^[42]在研究唐古草细胞中小蘘碱分泌时,发现分泌是通过存在于产生小蘘碱细胞的质膜上的耗能过程来实现的。这是至今首次发现通过主动运输系统来分泌植物次级产物的例子。

植物次级产物生物合成具有多条途径^[4]。因此在产物的生物合成中可以加入各种生物调节剂,使合成朝终产物方向进行,并抑制终产物进一步分解。在三角叶薯蓣中^[38],加入抑制八氢番茄素合成酶的物质如phenylpyradizone除莠剂和达草灭(norflurazon)等,可以降低胡萝卜素的生成但增加了薯蓣皂甙元的含量。另外,加入蛋白质抑制剂或其他的抗代谢

物等都能有效地提高产物的含量^[27]。

近年来,有关研究植物产物生物合成途径及其相关酶的报道日益增多。Zaprometov^[45]与Hahlblock^[22]等综述了酚类成分合成的酶学及其调节机理,发现其中的一个关键酶苯丙氨酸解氨酶(PAL酶)只有在受光刺激下活性才加强,因而类黄酮及花青素的含量亦增加。Bohm^[9]也详细讨论了有关生物碱合成的酶类,发现由色胺酸脱羧酶(TDC酶)催化的初始色胺酸脱羧反应在骆驼蓬细胞产物形成中是其中的关键的限速步骤,因而加入色胺就可使产量提高。TDC酶在长春花细胞中亦被发现^[30]。此外,对小蘖碱合成过程中的酶类等亦都进行了详细的研究^[24]。如果所有特定化合物产量的提高都已发展到利用酶水平调节的时候,那么大量生产高含量的次级代谢物的时候就为期不远了。

利用不同种细胞融合产生的杂种后代,可能具有较高的生命力和合成能力。Yamada等将高产小蘖碱细胞系的黄连细胞与高产花青素的铁海棠细胞系的细胞进行融合,获得了高产的杂交系^[40]。

遗传工程的应用可大大缩短细胞的生长周期并提高产物的积累。将植物基因内编码次级产物合成所需酶的基因导入细菌或真菌细胞,可使发酵时间由原来的30—60天减至1—2天,并能快速合成所需产物。但由于次级代谢产物合成中一般有众多的酶参与,因此,在目前的重组DNA技术之下,要完成所有这些酶的基因编码是相当困难的,而选择其中的一步或两步酶催化的生物反应是可能的^[35]。Yamada等^[41]最近已克隆化小蘖碱合成中酶的基因成功,现在正在导入大肠杆菌作表达试验。利用遗传工程和植物细胞培养技术也已进行生产调味品的大胆尝试^[39]。

综上所述,通过采取各种调控途径及各种新技术、新方法的使用,目前已有几十种植物细胞培养物的代谢产物的含量接近或超过原植物中的含量^[5]。最大限度地提高次级代谢产物的含量就会使植物细胞培养实现工业化生产能早日广泛地进行。

参 考 文 献

- [1] 日经生物技术,1988年5月9日号,6—7页。
- [2] 甘炳远、郑光植,1990,国外医药、植物药分册,5:10—14。
- [3] 李树敏、朱蔚华,1990,植物学报,32:103—109。
- [4] 梁峰、郑光植,1981,植物生理学通讯,(1):14—21。
- [5] 韩迎山,1988,植物生理学通讯,(4):11—17。
- [6] 森木悌次郎,1984,植物细胞培养マニエアル(山田康之编著),讲谈社,东京,pp.134—140。
- [7] Alfermann, A. W. et al., 1983, in: Plant Biotechnology (Mantell, S. H. et al., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 67-74.
- [8] Berlin, J. et al., 1985, *Adv. in Biochem. Eng. / Biotechnol.*, 31: 99-132.
- [9] Bohm, H., 1978, in: *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978* (Thorpe, T. A. ed.), Univ. of Calgary, Canada, pp.201-209.
- [10] Brodelius, P., 1985, in: *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology* (Laskin, A. I. ed.), Benjamin/Cummings Pub. Co. Inc., London, pp. 109-121.
- [11] Curtin, M. E., 1983, *Biotechnology*, 10: 649-657.
- [12] DiCosmo, F. and Misawa, M., 1985, *Trends in Biotechnology*, 3: 318-322.
- [13] Dix, P. H., 1986, in: *Plant Cell Culture Technology* (Yeoman, M. M. ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 143-201.

- [14] Dougall, D. K. et al. , 1983, *Biotech. Bioeng.* , 25, 581-594.
- [15] Drapeau, D. et al. , 1987, *Planta Medica*, 53, 373-368.
- [16] Flores, H. E. et al. , 1986, in: VI Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture (Abs.) (Somers, D. A. et al. , eds.) , Univ. of Minnesota, Minnesota pp. 117.
- [17] Fujita, Y. et al. , 1981, *Plant Cell Reports*, 1, 61-64.
- [18] Fujita, Y. and Tabata, M. , 1987, in: Plant Tissue and Cell Culture (Green, C. E. et al. , eds.) , Alan R Liss Inc. , New York, pp. 169-185.
- [19] Furuya, T. et al. , 1984, *Phytochemistry*, 23, 999-1002.
- [20] Furuya, T. et al. , 1987, *Phytochemistry*, 26, 2741-2747.
- [21] Hagimori, M. et al. , 1982, in: Plant Tissue Culture 1982 (Fujiwara, A. ed.) , Maruzen Co. Ltd. , Tokyo, pp. 349-350.
- [22] Hahlblock, K. et al. , 1980, *Adv. in Biochem. Eng.* , 18, 39-54.
- [23] Hamill, J. D. et al. , 1987, *Biotechnology*, 5, 800-804.
- [24] Hashimoto, T. and Yamada, Y. , 1987, *Eur. J. Biochem.* , 164, 277-285.
- [25] Hayashi, T. et al. , 1988, *Phytochemistry*, 27, 1371-1374.
- [26] Heinsteins, P. F. , 1985, *J. Nat. Prod.* , 48, 1-9.
- [27] Hsu, A. F. , 1981, *J. Nat. Prod.* , 44, 408-411.
- [28] Khouri, H. E. et al. , 1986, *Plant Cell Reports*, 5, 423-426.
- [29] Kilby, N. J. et al. , 1986, in: VI Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture (Abs.) (Somers, D. A. et al. , eds.) , Univ. of Minnesota, Minnesota, pp. 352.
- [30] Knoblock, K. H. et al. , 1981, *Z. Naturforsch.* , 36c, 40-44.
- [31] Knoop, B. et al. , 1983, *Z. Naturforsch.* , 38c, 484-489.
- [32] Lindsey, K. and Yeoman, M. M. , 1983, in: Plant Biotechnology (Mantell, S. H. et al. , eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 39-66.
- [33] Mantell, S. H. et al. , (eds.) , 1983, Plant Biotechnology, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 75-108.
- [34] Misawa, M. , 1985, *adv. in Biochem. Eng. /Biotechnol.* , 31, 59-88.
- [35] Mugnier, J. , 1988, *Plant Cell Reports*, 7, 9-12.
- [36] Mulder-Krieger, T. H. et al. , 1988, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 13, 85-154.
- [37] Rokem, J. S. and Goldberg, I. , 1985, *Adv. in Biotechnol. Proc.* , 4, 241-274.
- [38] Tal, B. et al. , 1984, *Phytochemistry*, 23, 1333-1337.
- [39] Van Brunt, , 1985, *J. Biotechnology*, 3, 525-530.
- [40] Yamada, Y. et al. , 1985, *Biotechnology*, 85, Asia, 3, 55-61.
- [41] Yamada, Y. et al. , 1988, in: Proceedings of China-Japan Symposium on Plant Biotechnology, Shanghai, pp. 14-21.
- [42] Yamamoto, H. et al. , 1987, *Plant Cell Reports*, 6, 356-359.
- [43] Yeoman, M. M. et al. , 1979, in: Proc. Int. Workshop in Plant Cell Cultures, Results and Perspective (Sala, F. et al. , eds.) , Italy, pp. 61-71.
- [44] Yoshikawa, T. , 1987, *Plant Cell Reports*, 6, 449-453.
- [45] Zaprometov, M. N. , 1978, in: Frontiers of Plant Tissue Culture 1978 (Thorpe, T. A. , eds.) , Univ. of Calgary, Canada, pp. 335-340.
- [46] Zenk, M. H. et al. , 1977, in: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application (Barz, W. et al. , eds.) , Springer-Verlag, Berlin, pp. 27-43.
- [47] Zheng, G. Z. et al. , 1982, in: Plant Tissue Culture 1982 (Fujiwara, A. ed.) , Maruzen Co. Ltd. , Tokyo, pp. 339-340.