

参考文献

- 1 宋万志,等. 药学报,1983,18(2):138
- 2 王浴生,等. 中药药理与应用,北京:人民卫生出版社,1983,177
- 3 Kochetkov N K, et al. Tetrahedron Lett, 1961, 730
- 4 Kochetkov N K, et al. Tetrahedron Lett, 1962, 361
- 5 谢晶曦,等. 中国医药工业杂志,1989,20(7):331
- 6 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1979, 27(6): 1383
- 7 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1979, 27(6): 1395
- 8 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1979, 27(7): 1576
- 9 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1979, 27(7): 1563
- 10 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1979, 27(11): 2695
- 11 CA 93, 46238
- 12 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1980, 28(8): 2242
- 13 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1980, 28(11): 3357
- 14 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1982, 30(1): 132
- 15 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1982, 30(9): 3202
- 16 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1982, 30(9): 3207
- 17 IKeya Y. Phytochemistry, 1988, 27(2): 569
- 18 IKeya Y. Chem Pharm Bull, 1988, 36(10): 3974
- 19 日本公开特许公报 89-165,583
- 20 日本公开特许公报 89-172,355
- 21 日本公开特许公报 89-172,354
- 22 末川守. 药学杂志, 1987, 107(9): 720
- 23 日本公开特许公报 89-42,421
- 24 日本公开特许公报 89-42,448
- 25 前田信也. 药学杂志, 1981, 101(11): 1030
- 26 日本公开特许公报 86-189,221
- 27 日本公开特许公报 88-30,410
- 28 Hikino H. Planta Med, 1984, 50(3): 213
- 29 CA 107:127,117
- 30 Kiso Y. Planta Med, 1985, 51(4): 331
- 31 日本公开特许公报 79-52,066
- 32 日本公开特许公报 79-32,403
- 33 日本公开特许公报 80-22,612
- 34 CA 110:82,339
- 35 日本公开特许公报 88-119,422

102 影响植物细胞发酵培养的诸因素

周立刚 奉光植

(中国科学院昆明植物研究所,昆明 650204)

摘要 本文介绍影响植物细胞发酵培养的主要环境因子:光照、搅拌、通气、培养基成分、胁迫因子、温度、pH值、接种量以及细胞的预培养处理等,以提高植物次级代谢物产量。

关键词 植物细胞 发酵培养 植物次级代谢

植物细胞发酵培养是采用现代生物工程手段,在发酵罐中将植物细胞进行工业规模生产,以获得各种产品(包括药物、农药、化妆品、添加剂等)的一门新兴的跨学科技术^[1,2]。自从1956年Routier和Nickell首次提出了利用植物细胞培养技术生产天然药物的专利以来,目前已有多种植物细胞的发酵培养实现了工业化或商品化生产^[3-6]。

植物细胞发酵培养成功的关键在于植物细胞在发酵罐中能迅速地增殖又能大量地合成次级代谢物。植物本身的遗传特性、生长状

况和形态分化等对所建立的细胞培养物中次级代谢物的含量有很大的影响。通过调节环境条件中的物理和化学因素亦可以影响细胞的生长和次级代谢物的合成与积累。内部和外部的环境条件以及培养细胞的预处理等都影响植物细胞培养物中次级代谢物积累的程度。外界环境条件包括有光照、温度、搅拌以及接种量大小等,内部的环境条件包括有培养基成分、前体、胁迫因子、通气和培养物的混合、以及培养基的pH值等。

下面就影响植物细胞发酵培养的几个主

要的环境因素作一简单的叙述。

1 光照

许多次级代谢物的形成受不同波长光的影响。光对细胞培养物中花色素生物合成的诱导,已在不同细胞系统中多次得到证明,Seibert和Kadkade研究了这一诱导作用的光谱峰在372nm和438nm之间^[7],光还能刺激茶树^[8]和保罗氏鲜红玫瑰—Paul's Scarlet Rose)培养物中多元酚合成的增加。^[9]光对某些次级代谢物的产生也呈现抑制效应,如小花赛茛苳中生物碱的产生^[10]和日本黄连 *Coptis japonica* 中小檗碱的合成^[11]均为光所抑制。光对培养细胞次级代谢物合成的生化调节机理尚待进一步研究。从经济上考虑,如果培养过程中不需要光照,可以节约设备和能源,故依赖光照的次级代谢物的合成在发酵罐中进行大量培养是不利的,而且需要设计出特殊的发酵罐。

2 搅拌

普通的摇瓶培养是靠振荡器的外界振荡,而发酵培养主要靠内部的搅拌桨不断地搅拌。同一类发酵罐对某一细胞要求有一定的搅拌速度,如我们培养的三分三 *Anisodus acutangulus*,细胞最适宜的搅拌速度为50r/min^[12],这是因为细胞的抗切变能力是极为有限的,人们发现,在发酵罐中由于内摩擦和搅拌对细胞产生较大的压力即切变应力,很多细胞对此应力极为敏感,往往尚未达到一定的生长量就解体了,植物细胞的发酵培养要求细胞种子具有较强的抗切变能力,能抵御搅拌器施加的压力,在较高的切变应力下生长而不发生溶解,才能保证次级代谢物的出产率。如筛选出的长春花 *Catharanthus roseus* 细胞在涡轮(turbine)转速高达300r/min时还有可能生长,只有在超过这个转速以后,生活力才有比较明显的下降^[13]。所以,在筛选优良的细胞株时,应把切变阻力的大小作为高产细胞系的条件之一。

3 通气与培养物的混合

通气和培养物的混合,两者都是细胞发

酵培养中物理和化学不可分割的组成部分。培养物的通气即使培养中各成分受到空气的机械或化学的作用,在培养系统中通气依赖于培养基的搅动。一般地,一种气体成分不能和其它气体成分分割开来考虑,除非在特殊的情况下,使用不同的气体组合(如O₂和CO₂),在确定的流速上仔细地控制通气过程,遗憾的是目前这种方法在植物细胞发酵培养的工作中用得还很少。^[14]在最广泛的小规模悬浮培养系统中,培养体积对氧吸收系数(OAC)有明显的影响,OAC与其气液界面面积有关,如当培养烟草细胞的体积小时,OAC值就增高,烟碱的产量亦相应增加。

和微生物相比,植物细胞的需氧量要低得多,三角叶薯蓣 *Dioscorea deltoidea* 在恒化培养中维持细胞处于指数生长期所需通气量为0.3vvm,通气量还影响培养细胞的产物形成,较高的O₂/CO₂之比,不仅影响次级代谢物产量,而且还影响产物合成的动力学^[15]。

Wagner和Vogelmann^[16]在大规模发酵罐培养的研究中,也报道了通气与培养物混合的重要性,他们研究的五种发酵培养装置中,所培养的海巴戟 *Morinda citrifolia* 细胞的产量,在气升式发酵罐中比在摇瓶中约多30%,是其它测试的发酵罐中的两倍。

4 培养基成分

植物细胞培养的成功取决于培养基的选择。总的说来,培养基由五类成分^[17]组成:即无机营养物质、碳源、维生素、生长调节剂和有机添加物。其中生长调节剂在决定某一培养物潜在生产力上具有首要作用。生长调节剂对植物细胞培养以影响次级代谢物生产的例子很多,可参考Staba(1980)^[18]及Mantell和Smith(1983)^[19]的评述。通常有利于植物细胞生长的培养基,对诱导次级代谢却不是最适宜的,而能支持活跃次级代谢的培养基条件却限制了快速的细胞分裂,导致指数生长较早地停止。保持持久的减速和静止期的培养条件,通常导致培养细胞中的次级代谢物生物合成和积累。

Fujita 等^[20]采用两步法大规模发酵培养紫草 *Lithospermum erythrorhizon* 细胞,以获得更多次级代谢产物和紫草素。两步法的第一步和第二步培养,除培养方式、规模以及培养工艺上不同外,其中主要是培养基成分的不同。在第一步培养中,紫草细胞培养在 MG-5 培养基^[20]上,使细胞迅速增殖,然后转入第二步培养中,使紫草细胞在 M-9 培养基^[21]上大量地生产紫草素。M-9 培养基的特点是硝酸盐为唯一氮源、磷酸盐的浓度低、铜及硫酸盐的浓度高、吲哚乙酸的浓度高。由于 M-9 培养基的营养成分浓度低,因而不能用以进行细胞的继代培养。

5 胁迫因子

许多次级代谢物被认为在抵御物理、化学和生物等不良环境中起重要作用,如渗透压、化学物质和生物侵袭等胁迫条件可以诱导其合成。

真菌诱发因子(Fungal elicitors)对于刺激和诱导一些培养物产生植物抗毒素最为有效^[22],如罂粟中的血根碱,茜草科中的蒽醌以及长春花中的吲哚生物碱等。这类诱发因子包括经高压灭菌的菌丝体悬浮物,培养物的粗滤液以及蛋白质或多糖等提取物,施加诱发因子即可在很短时间内,一般仅几个小时,大大地提高次级代谢物产量,从而不必采用两步法培养工艺,且缩短发酵时间。无疑诱发因子的应用将很快扩展到多种植物和产物,但真菌诱发因子的应用亦有其局限性,它们仅能触发植物中某些次级代谢物的产生,如在罂粟 *Papaver somniferum* 培养物中加入真菌诱发因子只能刺激血根碱的积累,而对吗啡类生物碱无触发作用。同样长春花培养物中加入真菌诱发因子后只能触发吲哚生物碱的增加,而对抗肿瘤剂长春新碱和双吲哚生物碱的产生无刺激作用。不过利用合适的诱发因子增加培养物中的次级代谢物产量仍是一种有用的途径。如: Funk 等用从酵母多糖中提取的诱导物培养唐松草 *Thalictrum rugosum* 细胞^[23],能明显地提高小檗碱的含量。

Rokem 等^[24]试验了六种真菌菌丝体对三角叶薯蓣皂甙元含量的影响,其中少根根霉 *Rhizopus arrhizus* 使其含量由对照的 2.5% 增加到 7.2%,产量由对照的 134mg 增至 230mg。

提高渗透压对提高某些次级代谢物的含量同样有效。Frischnecht 等^[25]采用甘露糖醇提高培养基的渗透压来培养长春花细胞,能明显地提高吲哚生物碱的含量。一般地,提高初始蔗糖含量水平,能诱导培养物中次级代谢物的增加。Davies(1972)^[9]观察到蔗糖对烟草细胞产生烟碱以及玫瑰细胞产生多元酚的有利作用。尽管蔗糖的主要作用是增加了代谢物生产的水平。也许高的初始蔗糖水平还增加了培养基的渗透压^[10]。

6 温度

植物细胞培养物适宜生长的温度范围一般为 15~32℃,而细胞的生长和次级代谢物的形成的最适温度往往不同。Nettleship 等^[26]在研究骆驼蓬培养细胞时发现,细胞最适生长温度为 30℃,而在 25℃时生物碱产量达最大值,在最高温度下,次级代谢物生产水平迅速下降。甘薯细胞悬浮培养中蔗糖和氨基氮两者的利用速度均降低了 25%,而生长速度却降低很少^[27],这些现象可能是培养细胞的次级代谢物依赖于温度转变的结果,这就要求在发酵罐的两级和多级培养过程中,严格控制好温度,先让植物细胞在最适温度下迅速地生长和增殖,然后在另一适宜温度下大量地合成次级代谢物。

7 pH 值

植物细胞培养中,最适生长通常出现在起始 pH 值在 5~6 范围内的培养基中,含量未确定的有机成分如酪蛋白水解物和酵母提取物的培养基,通常缓冲性能很好,所以在培养过程中 pH 值的改变不大,在没有这些成分的培养基中,培养过程中 pH 的改变是急剧的。Veliky 发现当甘薯细胞生长在 pH6.3 稳定的发酵罐中,它们产生色醇的数量是当细胞生长于 pH 未控制培养时的两倍,当 pH

降至4.8时,色醇的积累完全被抑制^[28]。

8 接种量

对于每一细胞系都有其合适的接种量。接种量决定于植物细胞培养开始生长所需时间,植物细胞的生长有其最低密度效应,如果接种量低于某一临界值,接种后的发酵培养将会失败。因此接种量的大小对细胞的发酵培养亦是相当重要的。接种量一般在10%~30%,高达50%,这就导致这样一个观点,即新鲜培养基必须具备有支持悬浮培养物主动生长的能力,这样具备条件的培养基是多种多样的,通过从活细胞释放未知代谢物和这些未知代谢物达到某一浓度时,条件就具备,因此植物细胞的主动生长是非常重要的。

9 细胞的预培养处理

在两步法或分级批式培养操作步骤中,细胞在种子罐中通过快速生长和增殖,然后转入下一级培养基中,这种培养基是经过修改了的,能促进次级代谢物的生产,如果采用以上的操作步骤,种子预培养方式对以后次级代谢物积累可能有显著作用。例如由含不同水平生长素的种子培养物得到的烟草细胞,当它们培养于生长培养基上时,会积累不同水平的烟碱^[10]。

种子培养物的年龄对次级代谢物生产也会有影响,如预培养21d的烟草细胞比预培养14d的烟草细胞能产生较高水平的烟碱。

随着植物细胞发酵培养的不断改进,细胞的预培养处理越来越受到重视。

综上所述,影响植物细胞发酵培养的因素很多,至于这些因素的确切作用机理还不十分明了,有待于进一步研究。不同细胞系的次级代谢物生产受各种因素影响的情形是很不一样的,目前可用的获得高细胞培养物和次级代谢物产量的最令人满意的方法是应用两步法培养:第一阶段尽可能快地获得高水平的细胞生物量,第二阶段是使次级代谢处于活化状态,大量生产次级代谢物。这样通过两步培养法,在离体条件下植物次级代谢物的生产可以达到或超过原植物的产量,从而

达到商业化生产。

参考文献

- 1 郑光植. 云南植物研究, 1988, 增刊 1: 27
- 2 Scragg AH, et al. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. v. 2. Florida: Academic Press, Inc. Orlando, 1985. 103
- 3 郑光植. 植物生理学通讯, 1987, (2): 76
- 4 刘 涤. 生物工程学报, 1987, 3: 9
- 5 Fowler MW, Plant Cell Culture Technology. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1986. 202
- 6 Fujita T, et al. Plant Biology, 1987, 3: 169
- 7 Seibert M, et al. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. (ED Staba EJ), Boca Raton, Florida: CRC Press 1980. 123
- 8 Forrest GI. Biochemical Journal, 1969, 113: 765
- 9 Davies ME. Planta, 1972, 104: 50
- 10 Tabata M, et al. Phytochemistry, 1972, 11: 949
- 11 Yamada Y, et al. Phytochemistry, 1981, 20: 545
- 12 郑光植, 等. 植物学报, 1986, 28: 123
- 13 Fowler MW. Progress in Industrial Microbiology, 1982, 16: 207
- 14 Fowler MW. Plant Biotechnology. Cambridge University Press, 1983. 3
- 15 Yamakawa T, 等. Agric Biol Chem 1983, 47: 2185
- 16 Wagner F, et al. Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. New York, Springer-Verlag, 1977. 245
- 17 Kurz WEW, et al. Microbiol. Technology, 1979. 2: 389
- 18 Staba EJ. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. Florida: Boca Raton, CRC Press, 1980
- 19 Mantell SH, et al. Plant Biotechnology. Cambridge University Press, 1983. 75
- 20 Fujita Y, et al. Plant Tissue Culture. IAPTC- Tokyo, 1982. 399
- 21 Fujita Y, et al. Plant Cell Reports, 1981, 1: 59
- 22 Dicosmo F. Trends in Biotechnol, 1985, (3): 318
- 23 Funk C, et al. Phytochemistry 1987, 26: 401
- 24 Rokem JS, et al. J Nat Prod, 1985, 48: 210
- 25 Frischknecht PM, et al. 6th Intern Cong Plant Tissue and Cell Culture (Abs). University of Minnesota, 1986: 201
- 26 Nettleship L, et al. Journal of Experimental Botany, 1974, 25: 1114
- 27 Rose D, et al. Canadian Journal of Botany, 1975, 53: 315
- 28 Veliky IA, et al. Lloydia, 1977, 40: 482