维普资讯 http://www.cqvip.com

生产次生物质的植物细胞大量培养

周立刚　　郑光植

（中国科学院昆明植物研究所）

植物细胞的大量培养是利用植物细胞体系、通过现代生物工程手段，进行工业规模生产，以获得各种产品的一门新兴的跨学科技术[1]。

早在1956年，美国的Routier和Nickell[2]就提出了从植物细胞培养物合成天然产物的专利，试图摆脱自然条件的限制，在人工控制条件下，利用植物细胞的大量培养，工业化生产各种药物。如今植物细胞的大量培养正发展成为一门新兴的科研产业体系，培养规模已达20千升，以培养烟草和人参细胞[、]，大规模培养紫草细胞从中提取紫草素和培养人参根以生产食品添加剂分别于1984年和1988年成功地进行了商品化生产[4,5]。本文对有关问题进行综述和讨论，以期对我国开展这项工作有所裨益。

一、研究历史

植物细胞大量培养的历史已有三十年了，大量培养技术已经成为一门精细的实验科学。有关植物细胞大量培养的具体实例和技术进展详见表1。

1959年Tulecke和Nickell首次采用大体积(20升)的硫酸瓶进行了蔷薇（Rosa sp.）茎段的细胞大量培养[6]。1967年Kaul和Staba采用多升发酵罐对小阿米(Ammi visnaga)进行了细胞大量培养的研究[5]，并从细胞培养物中得到了第一个药用成分呋喃色酮（visnagin），呋喃色酮的含量占细胞干重的0.31%，并以晶体形式得到鉴定。

本世纪七十年代，由于微生物发酵技术进展很快，各种各样的发酵装置如气升式发酵罐（Airlift fermentor），气泡柱式发酵罐（Bubble columnfermentor）等相继广泛地在微生物发酵培养中得到应用[70]，使得植物细胞大量培养的研究迅速地发展。在日本，由于具备了高度发达的微生物工业，一些植物学家和微生物学家都想用类似的常规发酵技术来培养植物细胞以生产有用化合物。许多公司和各大学进行了广泛的合作[71]，这时期，日本关于从植物细胞培养物来生产天然产物的专利不断出现[72]，如卡洛斯香烟（Callus tobacco）和来自烟草培养细胞的磷酸二酯酶（Phosphodiesterase）已出现在市场。

1976年，在西德的Munich召开了第一届国际药用植物细胞与组织培养会议，而使植物细胞大量培养的研究出现了新的里程碑。Zenk等对长春花（Catharanthus roseus）进行了细胞培养的研究[31]，建立了植物细胞次级代谢物含量测定的放射免疫技术（RIA）[73]，和两步法培养技术[31]，并选育出稳定而高产的细胞株。Wagner和Vogelmann等（1977，1978）以鸡眼藤（Morinda citrifolia）和长春花为代表植物，首次对各种大量培养装置进

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 用于发酵罐培养的植物细胞系

细胞系	培养方式	生物反应器	工作体积(总体积) L (L)	培养时间 (天)	培养物产量 (g/L) FW	DW	参考文献
冬青	批式	玻璃瓶	10(20)				(6)
Lolium sp.	批式	玻璃瓶	10(20)				(6)
蔷薇	批式	玻璃瓶	10(20)				(6)
银杏	批式	玻璃瓶	10(20)				(6)
金鱼草	批式	玻璃瓶	0.25(0.75)				(7)
Lolium sp.	批式	不锈钢发酵罐	30;134				(8)
野胡萝卜	批式，连续式	普通搅拌式	7.5;15	5-7	27.6		(9)
绿薄荷	批式	双玻璃瓶	3.0(10)	8	37.4		(10)
桐叶槭	批式	滚瓶	3-5(10)	14		17	(11)
蔷薇	连续式	玻璃瓶	23	31	111	4.6	(12)
天仙子	批式	玻璃瓶	10				(13)
玉米	批式	玻璃瓶	0.9(6)	19	68.4		(14)
小阿米	批式	机械搅拌发酵罐	3(10)		23.1		(15)
大豆	连续式	玻璃瓶	2(5)	19		25.46	(16)
桐叶槭	批式	滚瓶	4.5(10)	21		10.0	(17)
菜豆	批式	V-发酵罐	2.0(7.5)	11	204		(18)
桐叶槭	连续式	圆底玻璃瓶	4(5)	20			(19)
落花生	批式	圆底玻璃瓶	2.3(5)	28	89.6		(20)
大豆	封闭连续式	Pyrex玻璃罐	1.5-1.8				(21)
烟草	批式 半连续式	机械搅拌发酵罐	20(30)	5	20		(22)
烟草	批式	机械搅拌发酵罐	130-600				(23)
大豆	批式	机械搅拌发酵罐	12	7			(24)
烟草	批式	机械搅拌发酵罐	7.5	9		10	(25)
Ipomoea	批式	机械搅拌发酵罐	12(15)	6		14.9	(26)
桐叶槭	连续式	玻璃恒化器	10		160		(27)
烟草	批式	平叶轮发酵罐	12(15),22(30) 150(230)	4-6			(28)
烟草	批式	机械搅拌发酵罐	15000(20000)	5	15		(29)
鸡眼藤	批式	平叶轮发酵罐	10				(30)
鸡眼藤	批式	旋转叶轮发酵罐	10				(30)
鸡眼藤	批式	Kaplan叶轮发酵罐	10				(30)
鸡眼藤	批式	气升式发酵罐	10				(30)
长春花	批式	气升式发酵罐	10	35		18	(30)
长春花	批式	气升式发酵罐	22(30)	30		20-26	(31)
白猪殃殃	批式，连续式	玻璃恒化器	0.7	14			(32)
白猪殃殃	连续式	玻璃恒化器	0.7				(33)
烟草	批式	机械搅拌发酵罐	22(30)	5	300	14	(34)
菜豆	连续式	机械搅拌发酵罐	2(4)	83			(35)
柘树	批式	气泡柱式发酵罐	1(2)				(36)

维普资讯 http://www.cqvip.com

续表1

细胞系	培养方式	生物反应器	工作体积(总体积) L(L)	培养时间 (天)	培养物产量(g/L) FW	DW	参考文献
长春花	批式	气升式发酵罐	10;100	5	20		(37)
烟草	连续式	玻璃恒化器	0.5(0.85)		0.2		(38)
雷公藤	批式	机械搅拌发酵罐	7	30	13		(39)
长春花	批式	气升式发酵罐	7	30	20		(40)
紫草	批式,两步法	气升式发酵罐	200-750		16.8		(41)
烟草	连续式	机械搅拌发酵罐	200-20000	66	16.5		(42)
雷公藤	批式	气升式发酵罐	10				(43)
长春花	批式	机械搅拌发酵罐	3.5(4)	10	19		(44)
曼长春花	批式	滚动鼓式发酵罐	1.35(4)	12	20		(45)
曼长春花	批式	机械搅拌发酵罐	2.5(4)	12	17		(45)
长春花	批式,连续式	气升式发酵罐	9.6(10)	14	16		(46)
人参	批式	机械搅拌发酵罐	25(30)	48	17		(47)
人参	批式	机械搅拌发酵罐	4(5)	48			(47)
烟草	连续式	Pyrex玻璃发酵罐	5.4(12)		3.48		(48)
长春花	连续式	连续流动发酵罐	3(3.5)				(49)
小果	批式	气升式发酵罐	19(20)	20	40		(50)
彩叶紫苏	批式	机械搅拌发酵罐	30;300				(51)
彩叶紫苏	批式	气升式发酵罐	32(40)	8	20		(51)
彩叶紫苏	批式	机械搅拌发酵罐	32(40)	19	26		(51)
毛地黄	批式	气升式发酵罐	200	20	13		(52)
三分三	批式	机械搅拌发酵罐	6(10)	14	21		(53)
三角叶薯蓣	批式	机械搅拌发酵罐	7(10)	13	7.5		(54)
长春花	批式	机械搅拌发酵罐	7(10)	13	9		(54)
毛地黄	批式	机械搅拌发酵罐	5				(55)
长春花	批式	机械搅拌发酵罐	9.8(14)	30	20-25		(56)
长春花	批式,两步法	平叶轮发酵罐	25;750	15	25-30		(57)
长春花	批式	机械搅拌发酵罐	10				(58)
Streptanthus tortuosis	批式	气升式发酵罐	14				(59)
人参	批式	BF-12-玻璃发酵罐	10(12)	26	8-10		(60)
黑种草	批式	LF2-气升式发酵罐		7			(61)
湿地松	批式	各种类型发酵罐					(62)
长春花	批式	气升填充塔发酵罐		21			(63)
曼长春花	批式	气升式发酵罐	30;80				(64)
长春花	批式	机械搅拌发酵罐					(65)
葡萄	批式	气泡柱式发酵罐	3	20	260		(66)
唐松草	批式	搅拌膜式发酵罐	2;19;21	21			(67)
长春花	批式	气升式发酵罐	33	7	9.13		(6)
大豆	批式	机械搅拌发酵罐	30	5	10		(69)

维普资讯 http://www.cqvip.com

行了比较研究[30,74]，研究的培养装置有摇瓶（Shake flask），平叶轮发酵罐（Flat blade turbine reactor），Kaplan叶轮发酵罐(Draft tube reactor with Kaplan turbine)和气升式发酵罐(Airlift fermentor)等，他们分析了摇瓶培养（即悬浮培养）不足的原因是通气不佳，规模太小，另外靠外界振荡既浪费过多的机械能，又使搅拌不彻底，形成所谓的"三层分布"，研究结果表明：气升式发酵罐是植物细胞大量培养最有效的装置，它具有明确限定的流动特性，低切变速率和充足氧气供应的综合效应，该装置的结构较其它装置更为简单，并易于消毒和清洗。

近十年来，植物细胞大量培养的研究进展更快[75]，现从以下几个方面来讨论这一时期的进展情况。

（1）一些植物细胞的大量培养已经或即将商品化生产。早在1977年Noguchi等[29]就曾用20千升的搅拌式发酵罐（STR）来大量培养烟草细胞，后来Hashimoto等[42]又在20千升的发酵罐中连续化培养烟草细胞，目的在于如何工业化应用，他们对培养系统的通气、搅拌方式、培养条件及烟草细胞系的稳定性等进行了详细的研究。

Fujita等（1982）[41]报道了采用两步法培养紫草细胞以获得更多的次生代谢产物紫草素。他们首先使紫草细胞在LS培养基上大量增殖，培养一段时间后，转入到White培养基上，细胞生长减慢，但能大量地生产紫草素。后来，他们将培养基进行改进，生长培养基为MG-5，生产培养基为M-9，通过这样的两步法培养，紫草素的产量为用原来两步法培养所得产量的13倍，结果表明：两步法培养是一种最有效的培养方式。1983年，日本的三井石油化学工业公司（Mitsui Petrochemical Industries Ltd.）正式宣布紫草素作为染料和药物进行工业化生产[76]。1984年以"生物口红"的商品正式投放市场[4]。紫草素已成为第一个通过细胞大量培养方法获得的商品，这对各国该领域的科学工作者是一个极大的鼓舞，同时也说明采用植物细胞大量培养技术生产次级代谢产物的道路是可行的。

此外，从毛地黄（Digitalis lanata）细胞培养物通过生物转化生产地高辛（Digoxin）[77]和黄莲(Coptis japonica)细胞培养生产黄莲碱（Coptisine）[78]均实现了工业化生产。

最近，日本日东电气工业公司（Nitto Electric Industrial Co. Itd.）已商品化大量培养人参根以生产人参食品[5]，他们培养的人参根，没有附加任何生长因子，已采用30升、2千升和20千升的发酵罐来分级培养。培养物中人参皂甙的含量和组成与栽培的人参根几乎完全一致。培养物中人参皂甙的产量为每升500毫克。1988年日本的龟甲曼公司开始销售加入人参细胞培养物抽提物的葡萄酒，以"曼氏长寿泉"的商品正式投放市场而成为第一个组织培养食品。

（2）相当种类的植物如：长春花、三分三（Anisodus acutangulus）、彩叶紫苏（Coleus blumei）等细胞大量培养已达到中试水平、见表1。

（3）由于大量培养的植物种类增加，获得的新成分也不断增加，郑光植（1982）[79]，Staba（1982）[80]和Misawa（1985）[81]等综述对此都进行了详细阐明。

（4）大量培养技术也得到了进一步的改进。[82]

总之，近十年来，植物细胞大量培养的研究取得了很大的进展，相当数量的植物种类已实现了工业化生产，部分已实现了商品化或正要进行商品化生产。需要进一步研究的是如何产生社会和经济效益，将科学研究迅速转化为生产力。

维普资讯 http://www.cqvip.com

二、植物细胞大量培养技术性问题的讨论

植物细胞大量培养是从实验室的操作程序过渡到工业化生产的必经过程，大量培养必须考虑生产的全过程，包括大量培养的后处理等，以下就几个主要问题作一简单的讨论。

1．植物细胞生长慢，代谢低。植物细胞的生长受很多因素的影响，就细胞本身而言，在大量培养装置中生长不快，主要有两方面的原因：一是植物细胞加倍时间长，悬浮培养细胞加倍时间为20～60小时，已报道的发酵罐中加倍时间最快的是生长在富含氮源培养基中的烟草细胞，加倍时间为12小时[29]；二是植物细胞在发酵罐中生长时经常聚成团块，很难在培养液中达到高细胞密度，目前尚无理想的方法来解决聚集成团的问题。故细胞生长速度慢，必然生长周期长，不仅增加了成本，还增加了污染的可能性，是大量培养中的一大问题。

2．所需的次生物质含量不高。据报道[83]有近二十种植物细胞培养物，其次生物质含量超过原植物，但在大多数情况下，培养细胞的次生物质形成量不高，其原因常被认为是培养细胞的形态分化受到抑制，其化学特性也随之丧失[76]。不少报道观察到从愈伤组织分化出的器官或苗，次生物质的含量和类型与原植物一致[84]，但也有不少次生物质如人参皂甙、紫草素、蛇根碱的含量报道是以细胞培养物为基础的。总之，提高所需物质的含量是进行细胞大量培养生产次生物质的关键，目前解决的办法是不断筛选高产细胞株和进行次生物质代谢调控的研究。

3．大量培养的技术。植物细胞大量培养技术是通向工业化和商业化生产的技术难关之一。

（1）植物细胞不耐受切变力。我们目前使用的植物细胞大量培养装置大多是用来培养微生物的发酵罐，用它们来培养植物细胞还存在许多问题。这主要是由于植物细胞和微生物细胞在生理和生产上还存在许多差异（见表2）。

表2　植物细胞与微生物的区别

特征	微生物	植物细胞
大小	$2\mu m^3$	大于$10^5\mu m^3$
存在状态	单个细胞	聚集成团
形成克隆	容易	困难
加倍时间	大于1小时	几天不等
接种密度	小	大
染色体数目	单倍体，二倍体	各种均有
抗切变能力	强	弱
变异性	小	大
发育	形成孢子和假菌丝	形成器官和胚状
通气量	高1-2vvm	低0.2-0.3vvm
产物存在方式	常分泌到培养基	常存在于液泡中

其中主要的是植物细胞抗切变能力很低。这就要求我们努力研制和改进适应于植物细胞培养的培养装置（发酵罐），目前气升式发酵罐被认为最适合于植物细胞培养。

（2）通气与细胞生长。培养基的通气使培养物中的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。过高的通气量可能影响细胞的生长和次级代

维普资讯 http://www.cqvip.com

谢物的形成[85]，气泡和培养基混在一起，在生物量增加时，培养液的流动逐渐受阻，混合不到的区域逐渐增加，形成一个多相系统而使生长变慢。

（3）泡沫问题。泡沫是植物细胞和微生物大量培养时所遇到的共同问题。由于植物细胞在生长后期分泌大量的多糖和蛋白质，使培养物发粘，细胞被气泡、蛋白质和多糖混合的泡沫所包围，逐渐在培养物顶上形成一层覆盖物并越积越厚。泡沫还会留存于培养液和气体接触的界面，特别是分积于各种探头出入口的表面，在大量培养时出现“逃液现象”。目前尚无理想的方式来防止泡沫的形成。消泡剂的应用是否利于植物细胞的生长还无定论，已报道聚丙二醇作消泡剂时会降低植物细胞的生长[86]。

（4）接种量。对于每一细胞系都有其合适的接种量[87]。接种量决定于植物细胞培养物开始生长所需时间，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，接种后细胞生长将会很慢。接种量一般在10～30%，高的达50%，准备足够的接种材料是成本核算中一个不可忽视的项目[88]。

（5）大量培养的后处理，这个问题随着植物细胞大量培养技术的成熟而逐步得到重视。从已知的植物细胞大量培养的技术来看，它比传统的方法复杂，有各种各样的枝节细目需要考虑。后处理的具体内容主要包括：培养装置的清洗、维修；次级代谢物的提取、分离。在植物细胞培养过程中，次级代谢物有的分泌到培养液中，有的贮存在细胞内的液泡或其它细胞器中。因此，后处理应根据具体情况而定，目前主要采取有机溶剂抽提这一古老方法。超临界提取（Supercritical extraction）则刚刚出现，它可能在今后的次级代谢物提取中起重要作用。总而言之，后处理是整个生产流程中的一个重要部分，它所消耗的代价可能高达占全部工程的50%[89]。

三、植物细胞大量培养的研究展望

产生植物次级代谢产物的细胞大量培养的研究，经过无数学者几十年的辛勤劳动，不断探索，人们已见到它的美好前景。

植物细胞大量培养的目标是朝向工业上的应用，该领域包括：提高次生物质产量，改进筛选方法，设计新型的适合于植物细胞生长的发酵罐和如何使培养系统按比例放大，以及应用细胞固相化技术和有关的一些技术等。

国际上生产次生物质的研究已取得显著成绩，我国这个领域虽比较薄弱，但已逐渐开展起来[53,60,90,91,92]。由于该项研究投资量大，国外有财力雄厚的公司支持，国内还不可能有类似的公司，故应采取相应的弥补措施，如国家科学管理部门应积极支持该项研究，各大学和研究所进行联合攻关等。基于我国资源丰富，贵重、稀少而又有应用价值的药物、香料、调料种类很多，因而开展此项研究具有良好的条件。由于植物细胞大量培养不是任何材料都适宜的，所以作为今后工作的重点，应是研究本国的资源，寻找适宜作大量细胞培养的对象，包括次生物质的贵重性，细胞在培养条件下的生长与发育、次生物质的生产以及该物质是否能分泌到细胞外等。

总而言之，未来的十年，我们将会看到几个属于植物细胞大量培养的工业式制造技术用于生产，生产那些高值的，具有很大经济效益的产品。同时，植物细胞大量培养将成为类似于微生物发酵工业一样的高科技产业。