

第7章 植物细胞工程制药

7.5 影响植物次级代谢产物累积的因素

一、课程目标

1) 知识学习目标

1. 掌握药用植物细胞培养的原理和基本方法及药物生产的控制
2. 了解植物细胞后含物和生理活性物质的类型和药用性质

2) 思政育人（法制意识、可持续利用的自然发展观）

通过影响培养条件的内外因讲解，让学生加深内因是变化的根据，外因是变化的条件，外因通过内因而起作用。

二、思政案例

1)课程思政教学实例一：内外因的辩证原理

本节介绍培养条件对次级代谢产物积累的影响。培养条件的影响可以分为培养环境的内在因素和外部因素，内部因素包括营养成分、生物及非生物元素、pH、通气及混合程度、与接种有关的因素等。在这些内容的讲解中让学生加深以下认识：内外因辩证原理是指在唯物辩证法中认为事物的内部矛盾(即内因)是事物自身运动的源泉和动力,是事物发展的根本原因。外部矛盾(即外因)是事物发展、变化的第二位的原因。内因是变化的根据,外因是变化的条件,外因通过内因而起作用。

三、课程组织

导入: 同学们,上节课我们介绍了植物细胞培养的基本技术,这一节我们介绍影响植物次级代谢产物累积的因素。在植物组织和细胞培养过程中,**影响植物次级代谢产物产生和累积的因素主要有:**①生物条件,如外植体、季节、休眠、分化等。②物理条件,如温度、光(包括光照时间、光强、光质),通气(O₂)、pH和渗透压等。③化学条件,如无机盐(N、P、K等)、碳源、植物生长调节剂、维生素、氨基酸、核酸、抗生素、天然物质、前体等。④工业培养条件,如培养罐类型、通气、搅拌和培养方法等。下面我们对几种重要的影响因素进行讨论。

知识点1的讲解: 外植体选择

我们首先来看如何选择外植体,不同外植体的悬浮细胞培养物,最大次级代谢产物的累积时

间是不同的。同一化合物可以在不同外植体的不同生长阶段中累积，比如第 I 组植物，次级代谢产物的累积在延迟期进行，第 II 组植物则在加速期累积，第 III 组植物中次级代谢产物的累积时间与细胞生长曲线同步，第 IV V 组在稳定期大量累积次级代谢产物。

知识点 2 的讲解：培养条件的影响

接下来我们介绍培养条件对次级代谢产物积累的影响。培养条件的影响可以分为培养环境的**内在因素和外部因素**，内部因素包括营养成分、生物及非生物元素、pH、通气及混合程度、与接种有关的因素等。

课程思政融入：通过影响培养条件的内外因讲解，让学生加深内因是变化的根据，外因是变化的条件，外因通过内因而起作用。

我们首先来看第一个**内在因素，接种和诱导是如何影响植物次级代谢产物积累的**。外植体的大小不仅会影响诱导的组织和细胞的生长，而且也关系到次级代谢产品的生产能力，如长春花培养物中蛇根碱的合成，要求外植体直径在 1~12cm 之间，在这种条件下才能分泌噻吩类成分。次级代谢产物的产率与营养成分也是密切相关的，例如在紫草细胞培养中，当营养成分供应量为 1400mg/L 时，细胞干重为 2.8g/L；而将营养成分提高到 1900mg/L 时，

细胞干重则增加到 4.9g/L。

第二个内在因素，基本培养基的组成也会影响植物次级代谢产物的积累，基本培养基的各种成分是愈伤组织和悬浮培养细胞生长的物质基础，尤其在稳定期次级代谢产物累积时作用更加明显。磷的含量低于基本培养基的含磷量，常常导致次级代谢产物的累积，而缺乏磷又会导致生物量的大幅度降低，从提高经济效益的角度，通常使用次级代谢产物低的细胞株进行生产，因为低产细胞株可以通过较高的生物量得到补偿，总体产量比高产细胞株要高。氮源也影响次级代谢产物的积累，我们前面的内容提到，植物细胞培养常用的培养基中通常含有两种主要的氮源，即硝态氮和氨态氮，但是因为植物种类和细胞系的不同，这两种氮源对细胞生长表现出很大的差异。有些植物细胞可以利用铵态氮，而另一些可以利用硝态氮，有些则需要两种氮源，还有些细胞需要某些特殊有机氮源，如天冬氨酸、尿素、酪蛋白水解物和蛋白胨等。

下面我们介绍第三个内在因素，碳源对次级代谢产物积累的影响。碳源通常有两种提供形式，在光自养培养中碳源为 CO₂，在异养培养中碳源为糖类。碳源的性质和数量往往对培养细胞的生物量有很大的影响。CO₂ 可以诱导某些特征反应，如在金苹果的悬浮细胞培养中，高浓度 CO₂ 可以产生一种特有的苹果香味；再如葡萄、藜属、巴戟天属和烟草属植物

可积累 CO₂ 型的次级代谢物。在植物细胞培养中，糖是使用最广泛、作用最强的碳源，最适宜的糖类为蔗糖，使用浓度一般为 2%-5%。总的来说，糖的作用可能为：①延长稳定期(可延长 30~45 天)。②蔗糖分解后的产物，葡萄糖对内源性生长素合成具有抑制作用。③蔗糖可以增强戊糖磷酸化途径有关的酶的活性。例如，在长春花悬浮细胞培养中，加入蔗糖可以得到长春花碱，蛇根碱，以及游离的氨基酸，而加入乳糖只能得到长春花碱。所以说糖的种类不同，积累的次级代谢产物也不同。

接下来我们来看植物生长调节剂对次级代谢产物合成的影响。植物生长调节剂在植物细胞培养中起着非常重要的作用，或者说是关键性作用。但由于植物材料和生理状态的差异，必须通过反复实验才能确定合适的数量和种类。如人们在培养烟草细胞时发现，加入 IAA 时培养物中有尼古丁生成，但 2, 4-D 存在时就不能不合成尼古丁。

下面我们介绍 O₂ 和 pH 如何影响次级代谢产物的积累。培养细胞在生长过程中需要维持正常的呼吸作用，悬浮细胞培养和固定化细胞培养时供氧方式是不同的，悬浮培养可以采用搅拌和通气方式来进行供氧，搅拌速度通常比较慢，搅拌速度过快容易导致细胞破裂，因为植物细胞的抗剪切能力较差。固定化细胞培养只能采用通气方式进行供氧，一般使用含 5%CO₂ 的洁净空气，通气量要适当，过多或过少都会影响细胞生长以及次级代谢产物的合成。比如利用气升式生物反应器培养海巴戟悬浮细胞，蒽醌的含量随着供氧量的不同而变化。pH 也会影响细胞的生长。在细胞生长过程中培养基会变酸或变碱，但常用的培养基都具有一定的缓冲性质，在培养过程中培养液的 pH 一般变化较小。有实验证明，在某些情况下，氢离子浓度可以直接影响次级代谢产物的产生。所以在植物细胞培养中需要我们控制 pH，一般来说，最有利于培养细胞生长的 pH 在 5~6 之间。接下来我们介绍第六个内在因素，渗出物的影响。在细胞悬浮培养后期，培养液中常含有各种代谢产物，如某些初级代谢产物和次级代谢产物以及某些酸性物质、醇类和水解蛋白或活性蛋白等，如落花生悬浮细胞的后期培养液中含有 27 种多肽成分。这些渗出物也会影响次级代谢产物的产生。

通过前面的学习我们知道了培养基的组成是对细胞生长与次级代谢产物的形成最直接、也是最重要的影响因素。但是细胞的生长和次级代谢产物的积累往往是不同步的，想同时得到最佳生长和最佳次级代谢产物的产量是比较困难的。后来人们提出了**两步培养法**。我们来看两步培养法是如何进行操作的，**第一步，使用适合细胞生长的培养基**，称为生长培养基，**第二步使用适合次级代谢产物合成的培养基**，称为生产培养基。两种培养基各有特点：生长的培养基是为了实现细胞的高生产率，生产培养基通常硝酸盐和磷酸盐的含量较低，并且

糖分或碳源的含量也比较低。目前，已经实现了一些有用物质的大规模培养。例如我们前面提到的，已经实现了两步培养法工业化生产紫草素，紫草细胞培养所用的生长培养基为高无机盐含量的改良 MS 培养基，而生产培养基为无机盐含量较低的改良 White 培养基。同样是在紫草细胞培养中，作为生产培养基来说，尽管从 White 培养基到改良培养基 M9 之间仅有细微的不同，在 M9 培养基中附加了 10-5mol/LIA A，White 培养基中附加了 10-6mol/LIA A 和 10-5mol/LKT，使得细胞生物量和次级代谢产物都有了明显升高。

最后我们介绍**培养环境的外部因素对次级代谢产物的影响**，外部因素包括剪切力、搅拌频率、温度和光等。首先，培养物中次级代谢产物产生的最佳温度为 20~28℃。在一定温度(如 15℃)下，细胞不再生长，次级代谢产物也不再产生。温度的变化还会引起产物类型在质和量上的改变，个别情况下由于激活了新的生物合成途径也可能产生新的代谢物质。第二点，植物培养细胞的产率与发酵罐的搅拌速度有关，具体表现在发酵液中的溶氧浓度和机械搅拌对细胞所产生的剪切力上，如搅拌速度对海巴戟长方形细胞(累积蒽醌类成分)、产生甜菜苷的甜菜细胞和累积蛇根碱的长春花细胞等的影响就非常明显。但搅拌频率也不宜过小，如低于 28r/min 时，次级代谢产物的生物合成反应就有可能发生逆转。第三点，培养容器的影响，植物培养细胞次级代谢产物的产生，可以因为所用培养容器的大小和搅拌装置的不同而得到不同的结果，如小规模实验室培养所用的培养容器(50~500mL)具有较高的氧转移率，通过简单的定期搅拌，培养物的每个部位就可以得到比大规模培养更好的氧供应。在生产中由于搅拌带来的剪切力会影响细胞产率，可以使用气升式发酵罐作为替代。

第四点光的影响，对植物培养细胞来说，光是一个重要的影响因素。光照时间的长短、光质和光的强度对某些次级代谢产物(如黄酮、黄酮醇、花色素苷、挥发油等)的累积都有一定的影响。光对植物培养细胞的影响主要表现在：特殊波长的短波脉冲仅仅启动细胞的形态分化和生化过程，而连续光照则可以保持光的反应潜能或反应状态。此外植物激素和光照具有协同作用或对抗作用。例如，在高光强下，2, 4-D 对玫瑰中多酚类成分的合成具有明显的刺激作用。光可以激发单冠毛菊花色素苷的合成，作用光谱分别为 438nm 和 372nm。相反，萘醌的生物合成受到日光灯的抑制，并且具有抑制作用的是蓝光。

总结这一节的内容：这一节我们介绍了影响次级代谢产物积累的主要因素，我们介绍了外植体对次级代谢产物积累的影响，重点介绍了培养条件的影响，培养条件可以分为培养环境的内在因素和外部因素，内在因素包括营养成分、生物及非生物元素、pH、通气及混合程度、与接种有关的因素等。外部因素包括剪切力、搅拌频率、温度和光等。