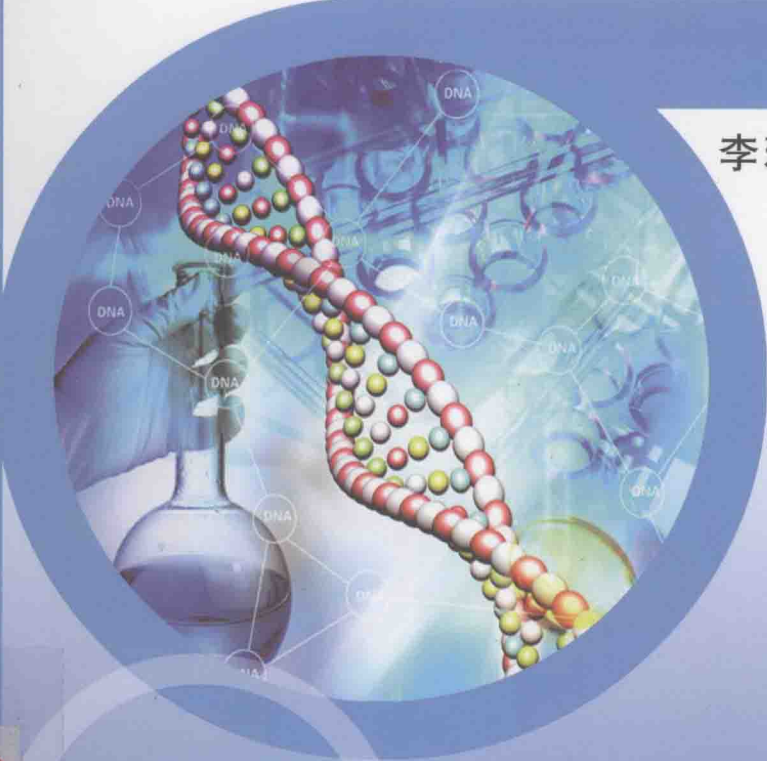


现代生物技术 前沿进展

XIAN DAI SHENG WU JI SHU QIAN YAN JIN ZHAN

李雅丽 巩东辉 著



 吉林大学出版社

现代生物技术前沿进展

李雅丽 巩东辉 著

吉林大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代生物技术前沿进展/李雅丽, 巩东辉著. —长春:
吉林大学出版社, 2013. 3
ISBN 978-7-5601-9772-2

I. ①现… II. ①李… ②巩… III. ①生物技术—研究
IV. ①Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 060036 号

书 名: 现代生物技术前沿进展
作 者: 李雅丽 巩东辉 著

责任编辑: 韩志宏 责任校对: 曲 楠
吉林大学出版社出版、发行
开本: 787×1092 毫米 1/16
印张: 18.75 字数: 430 千字
ISBN 978-7-5601-9772-2

封面设计: 山 石
吉林省吉财印务有限公司 印刷
2013 年 4 月第 1 版
2013 年 4 月第 1 次印刷
定价: 35.00 元

版权所有 翻印必究
社址: 长春市明德路 501 号 邮编: 130021
发行部电话: 0431-89580026/28/29
网址: <http://www.jlup.com.cn>
E-mail: jlup@mail.jlu.edu.cn

内容简介

本专著分为 3 部分,分别为植物生物技术篇、动物细胞生物技术篇及微生物生物技术篇。主要介绍了各自科研领域国内外的相关研究进展及各科研团队在本领域近年的研究成果。植物生物技术篇第一章以甘草细胞为例,主要介绍了利用植物细胞大规模培养生产天然药用成分的相关技术及研究成果;第二章主要介绍了定位于亚细胞器的植物生物反应器国内外的研究进展;第三章主要介绍了内蒙古鄂尔多斯高原碱湖发现的螺旋藻在形态、解剖结构上的近年研究成果,同时对国内外不同种的螺旋藻的分类学差异、原产地地理情况及产业状况进行了较详细的介绍。动物细胞生物技术篇主要介绍了哺乳动物体细胞再程序化技术目前国内外最新的研究进展。微生物生物技术篇主要以乳酸细菌的研究进展为主要介绍对象,介绍了该研究方向的一些技术、原理及近年国内外的研究成果。本书内容涵盖广泛、新颖,图文并茂,文字可读性强,可为相关研究领域的科研人员了解国内外该领域的最新研究进展提供有益的借鉴。

前言

20 世纪后叶生命科学的各个领域都取得了巨大的进展,其发展可以用日新月异来形容,生命科学的快速式、爆发式的发展也使其在自然科学领域的位置越来越显得重要,于是很多科学家认为在未来的自然科学中,生命科学将要成为领导学科,甚至预言 21 世纪是生物学世纪。

生物技术是现代生命科学在技术领域的应用,由于生物技术在农业、医药、食品、化工、环保和能源等方面的发展带来重大的变革,全世界正在兴起生物技术研究的热潮,生物技术或许将成为 21 世纪最为重要的技术之一。

作为从事生物科学和技术的科研工作者,寒来暑往,不知不觉中已经从曾经的青春年少逐渐步入不惑之年,虽然时间改变了我们的容貌,但对于科研工作的满腔热情却丝毫没有退却。追忆往昔,不禁让人心生唏嘘,于是就有把近些年各自领域内国内外的研究进展结合自己的科研工作整理出版一部专著的想法,以此向那些在本领域作出杰出贡献的学者致敬,同时也是对各自这十几年科研工作的一段小结,这个梦想几经周折,经过大家的共同努力现在终于实现了。

参与本专著编写的人员都是从事生物技术基础科学或应用科学研究的一线工作者,对各自钻研的领域具有丰富的专业知识和技术积累,熟知各自研究领域国内外的最新研究进展。其中,内蒙古科技大学李雅丽编写了第一章的内容;第二章的内容由李琚撰写完成;第三章的作者是巩东辉;包头轻工职业技术学院的王凤梅编写第四章第一节、第二节的内容,内蒙古科技大学的马利兵编写了第四章第三节的内容;第五章第一节、第四节由云月英完成,第五章第二节、第三节、第五节、第六节、第七节由王文龙完成。全书由李雅丽和巩东辉统稿,并共同对书稿进行了详细的校对工作。本专著的出版得到了内蒙古科技大学数理与生物工程学院的支持,在此表示感谢。本专著获得内蒙古科技大学教材出版基金的资助,在此一并表示感谢。

由于作者的专业水平和知识有限,书中难免有一些不足和疏漏之处,敬请读者和专家批评指正,以便将来进一步完善。

李雅丽、巩东辉

2012 年 8 月 23 日于内蒙古科技大学腾飞楼

目 录

第一章 植物细胞大规模培养技术研究进展	3
1.1 植物细胞培养技术	4
1.1.1 植物细胞培养技术概述	4
1.1.2 植物细胞培养设备与细胞培养室	5
1.1.3 植物细胞放大培养反应器的选择	6
1.1.4 植物细胞大规模培养研究的实践应用	7
1.2 甘草细胞大规模培养生产天然药物	8
1.2.1 甘草的主要化学成分	9
1.2.2 甘草资源现状	12
1.2.3 甘草细胞培养生产活性成分研究进展	14
1.3 甘草悬浮培养细胞合成次生代谢产物分析	16
1.3.1 构建甘草悬浮细胞培养物 HPLC 指纹图谱	17
1.3.2 悬浮培养的胀果甘草细胞中黄酮类化合物 HPLC 分析	20
1.3.3 悬浮培养的胀果甘草细胞中查尔酮 A 的测定	24
1.3.4 胀果甘草悬浮细胞中甘草酸分析	27
1.4 提高植物细胞培养生产次生代谢物产量的方法	31
1.4.1 高产细胞系的选育	31
1.4.2 培养条件的优化	32
1.4.3 前体物质对次生代谢的调控	33
1.4.4 添加诱导子	34
1.5 基因工程技术在植物细胞培养中的应用	36
1.5.1 提高合成途径中关键酶基因的表达	36
1.5.2 限制非目的途径的酶活性	36
1.5.3 关键酶基因调控因子的应用	37
1.5.4 建立过表达查尔酮异构酶(CHI)基因的甘草转基因高产细胞株	37
1.6 甘草细胞的保存技术研究	46
1.6.1 植物种质资源离体保存技术研究现状	47
1.6.2 甘草细胞及组织的保存技术	49
1.7 植物细胞悬浮培养的动力学分析	51
1.7.1 胀果甘草细胞培养方法	54

1.7.2 各实验参数的测定	54
1.7.3 悬浮培养胀果甘草细胞在实验条件下的生长曲线	54
1.7.4 胀果甘草细胞悬浮培养过程中培养液 pH 值的变化	55
1.7.5 胀果甘草细胞对培养液中残糖的消耗规律	55
1.7.6 胀果甘草细胞对培养液中氮源的消耗	56
1.7.7 胀果甘草细胞对培养液中磷酸根的消耗规律	56
1.7.8 胀果甘草悬浮细胞中总黄酮含量的测定	56
1.7.9 悬浮培养胀果甘草细胞动力学模型的建立	57
1.8 搅拌式反应器中甘草细胞放大培养与操作策略优化研究	59
1.8.1 搅拌式反应器中甘草细胞放大培养	60
1.8.2 甘草细胞反应器培养操作优化策略	63
1.8.3 搅拌式反应器中培养甘草细胞常见问题分析	65
参考文献	68
第二章 细胞器的植物生物反应器研究及应用	75
2.1 植物生物反应器概述	75
2.2 利用植物作为生物反应器研究的关键技术	76
2.2.1 提高植物生物反应器中外源基因表达水平	76
2.2.2 降低外源蛋白下游加工处理成本	79
2.2.3 安全性问题	79
2.3 外源蛋白在叶绿体中的积累	80
2.3.1 叶绿体基因组的基本结构	81
2.3.2 叶绿体转化系统的优越性	82
2.3.3 叶绿体遗传转化技术的原理	83
2.4 外源蛋白在油体的积累	84
2.4.1 油体的结构特征	84
2.4.2 油素蛋白的结构和功能	85
2.4.3 油素蛋白的基因及其表达	86
2.4.4 油体与油素蛋白的合成和降解	87
2.4.5 植物油体表达系统	87
2.5 外源蛋白在淀粉体中的积累	88
2.5.1 淀粉及生物合成	88
2.5.2 淀粉体及淀粉粒的结构	89
2.5.3 淀粉粒结合的淀粉合成酶(GBSS)	91
2.6 外源蛋白在其他亚细胞器中的积累	92
2.6.1 内质网(endoplasmic reticulum,ER)	93
2.6.2 植物种子	93

2.6.3 过氧化物酶体	94
2.7 亚细胞器植物生物反应器生产外源蛋白的实际应用	94
2.8 前景展望	102
参考文献	103
第三章 螺旋藻及产业化进展	108
3.1 螺旋藻的发现	108
3.2 螺旋藻四大产地湖泊概况	109
3.2.1 非洲 Chad 湖	109
3.2.2 墨西哥 Texcoco 湖	112
3.2.3 云南程海湖	112
3.2.4 鄂尔多斯高原碱湖	115
3.3 螺旋藻(节旋藻)的分类和形态结构	137
3.3.1 国外发现的螺旋藻概述	139
3.3.2 鄂尔多斯碱湖螺旋藻的分类和形态	141
3.4 国内外螺旋藻产业发展状况	157
3.4.1 早期研究及产业化发展	157
3.4.2 早期市场需求和变化情况	158
3.4.3 国内早期螺旋藻科研及产业化情况	159
3.4.4 内蒙古鄂尔多斯地区螺旋藻产业发展	160
3.4.5 鄂尔多斯高原螺旋藻产业发展优势和存在问题	165
参考文献	180
第四章 哺乳动物体细胞再程序化技术前沿、进展	187
4.1 体细胞核移植技术	188
4.1.1 同种间细胞核移植技术发展简史	188
4.1.2 跨种间细胞核移植技术发展简史	192
4.1.3 体细胞核移植技术的基本操作流程	196
4.1.4 体细胞核移植技术的研究进展	203
4.2 体细胞与干细胞融合技术	208
4.2.1 体细胞与干细胞融合技术的发展简史及研究进展	208
4.2.2 体细胞与干细胞融合技术操作流程	209
4.2.3 体细胞与干细胞融合技术的应用前景及存在的问题	211
4.3 诱导的多潜能干细胞技术	213
4.3.1 诱导的多潜能干细胞技术发展简史及研究进展	213
4.3.2 iPS 细胞技术的随机模型	213
4.3.3 构建 iPS 细胞的基本策略	214

4.3.4	iPS 细胞构建策略的改进和安全性的提高	215
4.3.5	iPS 细胞构建策略的新突破	217
4.3.6	iPS 细胞再程序化效率的提高	218
4.3.7	iPS 细胞研究的展望	221
参考文献		221
 第五章 乳酸细菌的研究进展		237
5.1	概述	237
5.2	乳酸细菌的分离及纯化	240
5.2.1	平板分离法	241
5.2.2	选择培养分离法	242
5.3	乳酸细菌的定量分析	243
5.3.1	传统方法	243
5.3.2	现代分子生物学方法	245
5.4	乳酸细菌分类鉴定	248
5.4.1	传统分类法	248
5.4.2	数值分类法	254
5.4.3	化学分类法	255
5.4.4	遗传学分类法	257
5.5	乳酸细菌的益生特性	266
5.5.1	降胆固醇	266
5.5.2	降亚硝酸盐	270
5.5.3	抗氧化	271
5.5.4	抑制肿瘤	273
5.5.5	血糖调节	273
5.5.6	血压调节	274
5.5.7	免疫调节	275
5.6	乳酸细菌的基因与基因工程	275
5.6.1	乳酸细菌的染色体	276
5.6.2	乳酸细菌的质粒	276
5.6.3	乳酸细菌重要的功能基因	276
5.6.4	乳酸细菌的基因工程	278
5.7	乳酸细菌在食品中的应用	278
5.7.1	乳酸细菌在乳品中的应用	278
5.7.2	乳酸细菌在肉品中的应用	280
5.7.3	乳酸菌在发酵果蔬中的应用	281
参考文献		282

第一章 植物细胞大规模培养技术研究进展

近些年来,随着人口的增长和对植物源药物需求的急剧增加,人类对于天然植物药资源的掠夺性开发,造成许多重要的植物次生代谢产物资源面临枯竭,而栽培植物的收获期太长,并且栽培品种质量低下,这些使得靠大面积人工栽培提取天然产物的方法来满足市场需求存在诸多困难和风险。另外很多有重要价值的次生代谢产物在植物体中含量低,仅靠从天然植物中获取这一途径已不能满足市场需要,这就使得许多有极高利用价值的植物次生代谢产物来源十分困难,特别是一些天然药物,极大地限制了制药业的发展和临床应用,日益增长的供需矛盾导致了一些天然活性药物价格昂贵。化学、医学和生物学等相关领域的研究人员积极探索,寻找新的药用植物资源替代途径,进行了广泛深入的研究,取得了一定的进展,可归结为以下几种:

(1) 化学全合成法

很多天然药物的化学法全合成已经实现。然而大部分天然药物合成路线长而复杂,需要经过很多复杂的化学反应过程,且合成过程要求条件高,出现成本过高、收率低、合成物药理评定困难等问题,至今尚无法实现商业化生产。

(2) 生物/化学半合成

生物/化学半合成法是以植物中所含的某些天然药物的类似物,或者前体物等为原料,经过某些化学反应,将其转化为目标化合物。通过生物/化学半合成方法生产天然药物是一种有效的途径,被很多国际国内的制药公司采用,一定程度上缓解了天然药物药源紧张的局面。生物/化学半合成法虽然实现了更大限度的利用药用植物,但还是摆脱不了对珍稀天然植物的原料依赖,不能从根本上解决资源匮乏的问题。

(3) 内生菌发酵法生产天然药物

利用植物内生菌发酵法生产天然药物是解决一些贵重药物药源问题的有效途径之一。植物内生菌是指生活史中某一阶段生活在植物组织内,对植物没有引起明显病害症状的一类微生物,从表面消毒的植物组织中可以分离得到,或从植物体内部获得,是一类相对来说开发较少、次生代谢产物丰富、应用前景广阔的资源微生物。研究发现一些植物内生菌不仅能够参与植物次生成分的合成,而且还能够独立产生丰富的次生代谢产物,有的内生菌能产生与其寄主植物相同或类似的活性物质。1993年 Stierle A 等首次报道了从太平洋紫杉树中分离出一种可产生紫杉醇的内生真菌,为紫杉醇的微生物生产提供了可能性。但内生菌发酵液中药用成分含量低是制约这一技术工业化应用的主要瓶颈问题。

(4) 植物细胞培养生产天然药物

利用植物细胞离体培养技术生产天然药物一直被认为是缓解目前药用植物资源短缺

问题的最有希望的途径。这一技术不破坏植物资源,不占用土地、培养周期短、培养条件和环境人工可控;另外可通过优化细胞悬浮培养体系、添加前体物和诱导子等方法有效调控细胞内目标次生代谢产物的产量,而且从细胞培养物中分离和纯化活性成分比从原植株中提取简单,这些优势使得植物细胞培养技术在过去 30 年中取得了很大进展。对药用植物细胞培养的研究范围涉及培养条件的选择、高产细胞株系的筛选,活性成分生产调控及生物过程的动力学分析、生物反应器的改造等很多方面。

1.1 植物细胞培养技术

1.1.1 植物细胞培养技术概述

自从 White P. R. 和 Gautheret R. J. 在 1939 年用实验方法建立了植物细胞和器官培养技术以来,植物细胞培养技术现已发展成为一门精细的实验科学,在材料消毒、接种培养、继代保存、分离鉴定和工业化生产等方面已经建立了一套系统的操作程序。面对着药用植物有限的蕴藏量,如何进行合理有效地开发利用是我们亟待解决的问题。自从 20 世纪 50 年代提出用植物细胞大量培养作为工业化生产植物次生代谢产物的一条途径以来,全世界已对近 1 000 种植物进行过细胞培养方面的研究,生产的天然产物包括药品、香料、色素、食品、化妆品等 500 多种。

植物细胞培养技术是利用植物细胞体系、通过现代生物工程手段以获得各种产品的一门新兴的跨学科的工程技术,是目前公认的最有前景的珍稀植物药物资源的生产技术之一,可以很好地解决天然植物资源匮乏问题,具有显著的社会经济效益。植物细胞培养具有人工栽培无法比拟的优点,主要体现在以下几点:①不破坏植物资源;②不受地区、季节、病虫害及其他自然因子的影响;可在完全人工控制的条件下生产,一年四季不断进行,不受地区和季节限制,植物细胞培养在无菌条件下进行,防止病菌及虫害侵扰,节约土地,便于工业化生产;③细胞培养具有相对较快的增殖速率,其生长周期通常在一周到几周,而植物的生长缓慢;④高产细胞株可从高产植物建立并筛选获得,通过改变培养条件和选择优良细胞系的方法可获得超过原植物产量的代谢物;⑤培养物为较均一的细胞,容易进行大规模培养;⑥产物的提取较为方便。迄今为止,在这个领域内,从许多植物培养细胞中分离出 600 多种次生代谢产物,通过筛选细胞系,改进培养条件和技术,以及设计适合植物培养细胞的发酵罐,人们已使包括紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)、毛地黄(*Digitalis lanata*)、红豆杉(*Taxus* spp.)和彩叶紫苏(*Coleus blumei*)在内的多种药用植物细胞培养达到工业化生产的规模,有的已经发展成药用商品投入市场。

另外由于植物天然产物的多样性及不可替代性,加上其结构的复杂性,建立细胞培养体系,有助于发现新的化合物。据统计,过去已从植物细胞培养物中提取出了 200 余种生物碱,其中有 30 多种生物碱的含量达到甚至超过原植物。已从 30 种植物的细胞培养物中得到了 85 种新的化合物,其中 27 种为生物碱类,19 种为萜类,30 种为蒽醌类,11 种为苯丙烷类。采用植物细胞培养生产次生代谢产物被认为是解决资源问题的有效途径,为大规模反应器培养和工业化生产提供可能。另一方面,采用植物细胞培养可以方便地进行植物防御反应和代谢调控等一系列基础方面的研究,而这在完整植株中是很难进行的。目前,植物

细胞培养已经作为一种模式系统来进行植物细胞的生长代谢、对外界环境的胁迫以及细胞内信号分子相互作用等方面的研究。

目前植物细胞大规模培养主要是液体悬浮培养,悬浮培养可以增加细胞与培养液的接触,保持均匀的传质与传氧环境,另外避免培养物产生的有害代谢产物聚集在局部导致浓度过高伤害细胞。悬浮培养一般采用两段法,第一阶段是在固体生长培养基上进行,主要是尽可能促使细胞快速增长,大量积累细胞生物量;第二阶段是在液体生产培养基上进行,主要是加速次生代谢,积累次生代谢产物。在细胞培养整个过程中,可以根据不同阶段的需求,在培养基中添加不同品种和浓度的植物激素或前体与诱导子等以促进细胞生长和代谢。

1.1.2 植物细胞培养设备与细胞培养室

植物细胞小量培养一般在细胞培养箱内进行,植物细胞培养箱实际就是一个有光照带湿度的恒温培养箱(见图 1-1),其中的光照、温度、湿度等条件能够满足植物细胞的生长需求。植物光照培养箱原理是几组灯管和一套控温装置(通常 5~50℃)。如果高级点的还有光照设置,比如几点开灯几点关灯,什么时候光照强一些等。

植物细胞培养的实验室通常应该包括通用实验室、无菌操作室、细胞培养室、显微工作室,工业化生产还需有相应的发酵设备配制室和用于栽培试管苗的专用花房或遮荫棚等。实验室的大小和设置可根据自己的工作性质和规模自行设计,其中最主要的是无菌操作室和细胞培养室。

通用实验室主要用于植物细胞培养所需器具的洗涤、干燥和保存,培养基的配制、分装和灭菌,化学试剂的存放及配制,蒸馏水的生产等。根据工作量的大小配备中央操作台和用于清洗的水槽及供放置各种培养器具的橱柜,一般情况下还需要配备一台电热烘箱,用于迅速干燥各种器皿和组织材料。配制培养基需要的主要仪器设备有冰箱、电子天平、酸度计、灭菌锅等也应该配备齐全。房间要宽敞明亮,通风良好。

无菌操作室一般包括缓冲间和接种室两部分,缓冲间是为了使工作人员在进入无菌操作室前有一个过渡,以减少带入无菌操作室的室外杂菌。缓冲室中可放置工作服、工作帽、拖鞋等,可配备紫外灯随时进行灭菌。工作人员在缓冲间内要换上清洁的衣物、鞋帽、口罩,头发、手和脸都要十分清洁,避免带入杂菌造成污染。缓冲间的门一般与接种室的门要错开。接种室主要用于植物材料的消毒和接种、培养物的继代转移等等,是无菌操作的重要空间,面积按实验室的工作量大小而定。墙壁和地面要光滑,便于清洗和消毒。除入口和通风口外均应密封,以减少室内外空气对流污染室内环境。接种室主要安放 1~2 台超净工作台,使用前可以用新洁尔灭溶液擦洗台面,然后开紫外光灯照射灭菌。若使用过久,引起堵塞,需要清洗或更换过滤板。超净台内需配备一些镊子、接种环、手术剪刀、酒精灯等常用器具。另外要定期用甲醛和高锰酸钾熏蒸房间。

细胞培养室是培养细胞的场所,和植物组织培养室一样,要满足细胞生长所需的温度、光照、湿度等条件(见图 1-2)。培养室的房间一般不需安装窗户,若原来有窗户的房间应将窗户封闭,但是应当安装排风扇。室内主要配备培养架和控制温度和光照的设备。室内温度通常要求 25℃左右,一般采用空调控制。培养室一般采用普通日光灯作为光源,日光灯安装在每层培养架的下面或者侧面,以满足每层外植体生长需要。每日的照明时间根据不

同的细胞采用自动定时器控制。有的细胞需要暗培养,还需要考虑增设一个暗培养室,作为那些不需要光照的外植体培养的場所。在培养室内还应放置液体培养需用的摇床或旋转床等。在南方湿度高的地方可以考虑在培养室内安装去湿机。

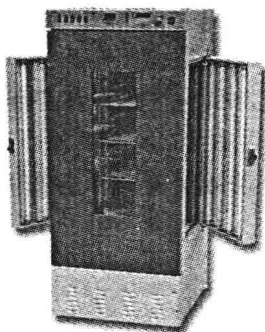


图 1-1 细胞培养箱



图 1-2 细胞培养室

1.1.3 植物细胞放大培养反应器的选择

植物细胞培养的反应器主要有搅拌式、气升式、鼓泡式、转鼓式几种。选择和开发新型反应器一般有以下几点依据:是否能长时间维持无菌状态;是否能维持反应器内发酵液均匀混合;是否能很好地控制反应器内的温度、pH;是否能保持稳定的供氧;植物细胞对反应器流体剪切力的敏感程度;反应器放大的难易程度等等。

搅拌式反应器 and 气升式反应器是最常用的传统的反应器类型(见图 1-3, 1-4), 搅拌式反应器通过搅拌和通气控制溶氧, 混合效果好, 供氧能力强, 适应性广, 可以用传统的微生物培养的经验对植物细胞培养过程进行控制, 在植物细胞大规模培养中广泛应用。但它有一个明显的缺点就是培养的过程中搅拌产生的剪切力会对植物细胞产生伤害, 植物的细胞壁对剪切耐受性差, 很容易被打碎, 这样直接影响细胞的生长和次生代谢产物的合成。桨叶形搅拌器产生的剪切力相对柔和, 对植物细胞的伤害相对较小, 适合植物细胞生长。另外较大的桨叶可以在比较低的搅拌速度下提供较好的搅拌效果, 因此可以通过调整搅拌桨样式、桨叶大小、搅拌速率等方式来尽量减小因搅拌而产生的剪切力, 降低对细胞的伤害程度, 提高细胞及其代谢产物的产量, 提高搅拌式生物反应器在植物细胞培养中的应用效果。搅拌式生物反应器的另一个不足之处是搅拌轴因为长时间使用会封不严, 而植物细胞生长周期长, 要求反应器有在相对长的时间里保持良好的防污染的能力, 在这一点上, 气升式反应器有明显的优势, 它没有搅拌装置, 整个系统封闭, 容易保持反应器内无菌状态。另外气升式反应器结构简单, 通过上升液体和下降液体的静压差实现气流循环, 剪切力小、适合于培养那些对剪切力敏感的植物细胞。但是气升式反应器明显的缺陷是容易发泡, 起泡主要是因为培养初始培养基中高浓度的糖以及培养后期细胞释放的蛋白质所致。

将气升式反应器与低速搅拌相结合, 可以加强混合, 有利于氧传递同时细胞所受剪切力相对降低, 这样的新型植物细胞培养反应器可以有很广泛的应用前景。近年来, 依据微生物固定化培养技术, 植物细胞固定化培养技术也有所发展, 采用的固定化系统主要包括流化床、膜反应器和填充反应器等。一般采取凝胶包埋、膜固定、泡沫固定和表面吸附等。固定化培养植物细胞, 减少了细胞因剪切力所受的损伤, 有利于次级代谢产物的合成、分泌及

分离。

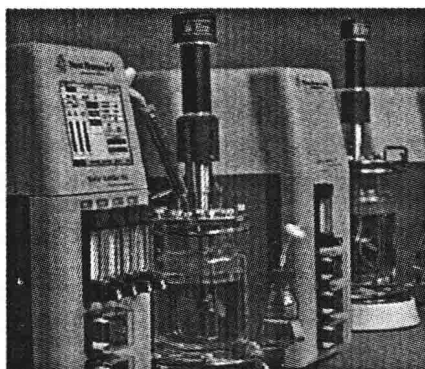


图 1-3 搅拌式生物反应器

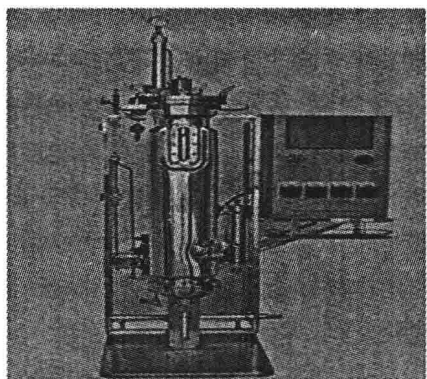


图 1-4 气升式生物反应器

1.1.4 植物细胞大规模培养研究的实践应用

自 20 世纪 60 年代,国内外相继开展了植物细胞培养生产药用有效成分的研究,1956 年,Routin 和 Nicker 首次提出以植物细胞培养合成天然产物的专利申请,介绍了用 30L 鼓泡塔反应器进行植物细胞培养生产次生代谢物(Cai et al., 2012; Sheludko et al., 2010; Fumagali et al., 2008; Paek et al., 2005)。1967 年,Kaul 和 Staba 成功培养了牙签草(Ammivisnaga)细胞,从细胞培养物中分离到了呋喃色酮(faranochromes)(Huang et al., 2002)。到 20 世纪 80 年代,全世界大约 40 多种植物的细胞培养研究获得成功,有些药用植物的研究达到中试水平。1983 年,日本三井公司利用生物反应器培养紫草细胞,生产紫草宁和小檗碱,规模达到 750L,产物最终浓度达到 1 400mg/L(Rojas et al., 1999);日本日东电工公司完成了 500L 人参皂苷和花色素的生产、西德 A. Nattermann&Gie (Havkin Frenkel et al., 1997) GmbH 公司完成了 75 000L 迷迭香酸的生产(Venkat et al., 1997)、美国完成了香子兰代谢物的生产、加拿大的血根碱生产等等。迄今为止,全世界已经有 1 000 多种植物进行过细胞培养的研究。例如,作为染料和消炎药物的紫草宁(shikonin)、抗癌新药紫杉醇(taxol)、长春花碱(vinblastine)、抗疟疾新药青蒿素(artemisinin)、生物碱(berberine)等。我国研究人员在该领域也开展了大量的工作。目前,我国已建立了三七、三分三、人参、西洋参、三尖杉、紫草、洋地黄、长春花、丹参、红豆杉、毛地黄、黄连及雷公藤等十几种药用植物的液体培养系统,经过对培养基和培养条件的优化,已使有效成分达到或超过原植株,并出现了植株中没有的新代谢产物。在此基础上,人们已经对烟草、人参、紫草、西洋参、红豆杉、长春花、毛地黄、黄连等多种植物细胞进行了大规模生产实验。武汉华中科技大学依靠国家“八五”、“九五”攻关计划的支撑和 863 重点项目的支持,实现了 100L 红豆杉细胞培养,产量达到了 146mg/L;中科院化冶所刘大陆等研制了新型植物细胞培养生物反应器,并与中科院植物所叶和春等合作完成了 150L 新疆紫草细胞培养生产紫草宁的中试(邢建民等,1999,2000)。

国内外学者对植物细胞培养生产技术中各个环节进行了广泛探索,研究出了一系列植物细胞次生代谢产物的增产策略,同时开发了一些更适合植物细胞培养的生物反应器。虽

然植物细胞大规模培养生产有效成分取得了飞速发展,但目前真正实现工业化生产的事例并不多。主要是因为植物细胞大规模悬浮培养过程中某些关键技术还是难以突破,一系列的瓶颈问题使得工业化生产仍面临很大的挑战。如在悬浮培养过程中,由于植物细胞的团聚性,常常聚集在一起呈现出较大的细胞团,容易产生泡沫。也有的植物细胞会合成并分泌一些黏多糖类植物,使反应体系黏度增大,造成传质与传氧的困难,最终使得细胞生长缓慢、部分细胞褐化死亡,造成有效成分含量降低;同时,悬浮细胞遗传稳定性较差,在连续继代培养过程中容易发生变异;植物细胞对液体的剪切力敏感等等,这些问题使得稳定高产的可控定向诱导合成技术、工业化放大规律、产物高效分离过程等关键技术等都有待于进一步优化。

1.2 甘草细胞大规模培养生产天然药物

甘草(*Glycyrrhiza*),又名美草,灵通,甜草根,多年生草本或者半灌木的植物,属于豆科(*Leguminosae*)、蝶形花亚科,世界上最古老也是应用最广泛的中草药之一,在亚洲和欧洲的许多国家都有大量入药的记录,包括中国、日本等(Kitagawa et al., 1998a)。中药甘草是甘草属植物干燥的根和茎,作为一种补中益气的中草药,已被大量应用在传统中药制剂中,大约 70% 的中药配方制剂都把甘草作为其中一个主要成分(Hatano et al., 1998),所以又有“十方九草”之说。随着科技的不断发展,甘草的用途不再局限于中药产业,在其他工业上需求量也极高。甘草这个名字来源于希腊词“glycy”,甜味的意思,甘草提取物(主要成分为甘草酸)作为甜味剂被广泛用于咖啡、果汁等各种食品饮料生产,食品工业和烟草行业。甘草皂苷可活化皮质甾类化合物(抑制代谢酶),抗炎症作用比较缓和,可用于膏、霜、水、露、乳液、奶类和蜜类等所有化妆品,可防止某些化妆品的过敏反应,更适用于高级发用或肤用化妆品中,长期使用不会产生副作用。

甘草属植物包括 30 多个品种,广泛分布在世界各地(Kitagawa et al., 1998b)。我国是世界甘草的主要产地之一,在全世界 24 种豆科甘草中,我国分布有 18 种,《中国药典》确定光果甘草(*G. glabra*) (见图 1-5)、胀果甘草(*G. inflata*) (见图 1-6)和乌拉尔甘草(*G. uralensis*) (见图 1-7)三个品种为甘草属植物的代表。甘草为多年生草本,具有抗寒、耐热、耐旱、抗盐碱、适应性强以及生命力旺盛等优良特性,是干旱、半干旱地区重要的植物资源之一。我国甘草产地分布在西北(包括宁夏黄河河套两岸,甘肃河西走廊等地区,新疆、青海、陕西)、华北(包括内蒙古的赤峰市、通辽市、兴安盟、巴彦卓尔市、阿拉善盟)都有甘草分布。其中主要产品为乌拉尔甘草,在东起科尔沁草原西至新疆额尔齐斯河的狭长东西向带状区域广泛分布,多产于海拔 500~1 500m,向阳干燥的半荒漠草原或黄土沙丘碱性土壤中;胀果甘草主要分布在新疆境内的南疆、东疆及甘肃西部,生于海拔 800~1 500m 的河流两岸滩地及冲积平原与干旱草甸区。光果甘草则主要分布在甘肃西部、青海北部及新疆东部海拔 1 000~1 500m 的风沙坡地(董静洲等, 2006)。

甘草自古以来就是一种很重要的药用植物,人类应用它的历史约有 4 000 年之久。我国是世界上认识和研究甘草最早的国家,东汉成书的《神农本草经》中将其列为上品。自

1964 年荷兰学者发表有关甘草提取物对医治胃溃疡有较好疗效的论文后,甘草引起了国内外医药及化学工作者的广泛重视,人们便开始对其化学成分及应用进行广泛而深入的研究。



图 1-5 光果甘草



图 1-6 胀果甘草



图 1-7 乌拉尔甘草

1.2.1 甘草的主要化学成分

甘草根和根茎粗壮,皮红棕色。茎直立,有白色短毛和刺毛状腺体。根呈圆柱形,不分枝,长 30~120cm,直径 0.6~3cm,带皮的甘草,其外皮松紧不等、红棕色、棕色或灰棕色,具显著的皱纹、沟纹及稀疏的细根痕,两端切面平齐,切面中央稍陷下。质坚实而重,断面纤维性,黄白色,有粉性,有一明显的环纹称菊花心,常形成裂隙。微具特异香气,味甜而特殊。根茎形状与根相似,但表面有芽痕,横切面中央有髓。以外皮细紧、有皱沟、红棕色、质坚实、粉性足、断面黄白色、味甜者为佳。炙甘草呈老黄色,质黏有光泽,味甜,具焦香气。

甘草有非常多的药理学活性,是 100 多种中成药的主要原料。这些生物活性主要归因于甘草含有的化学成分。多年来,各国学者对甘草化学成分进行了大量的研究,特别是对甘草不同种、同种不同产地、同植株不同部位、不同组织结构中的化学成分进行了细致的研究工作。目前,已有超过 400 多种化合物从甘草属中分离,其中,三萜皂苷类和黄酮类通常