

УДК 577.15.086.83

РЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИСАХАРИДНЫХ НОСИТЕЛЕЙ НА СИНТЕЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В ИММОБИЛИЗОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

В.М. Юрин, О.В. Молчан, С.Н. Ромашко, Т.И. Дитченко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Иммобилизация – это фиксация биокатализаторов (ферментов или клеток) в некоторой фазе, чаще всего нерастворимой, отделенной от другой фазы (раствора), в которой находятся молекулы субстрата и (или) продукта, причем возможен перенос этих молекул. Для иммобилизации могут быть использованы адсорбенты органической (хитин, альгинат) или неорганической (глины, кремнеземы) природы, искусственные неорганические носители (углеродные материалы, керамика) и синтетические полимеры (полиэтилен, нейлон, полиуретаны).

Основные требования, предъявляемые к материалам, которые применяют в качестве носителя для иммобилизации, сводятся к следующим: высокая механическая, химическая и биологическая устойчивость, обеспечивающая стабильность получаемых иммобилизованных препаратов; возможность получения технологически удобных форм (гранул, мембран, листов и т.д.); сохранение активности фермента или ферментативных систем клетки; отсутствие нежелательных воздействий на препарат (токсичность, температура, стресс и т.д.), а также препятствий для переноса к препарату субстрата, газообмена и отвода продуктов жизнедеятельности; надежное удержание фермента и клетки; высокая гидрофильность для протекания реакций в водной среде; дешевизна и простота процедуры иммобилизации, т.е. экономическая оправданность.

При иммобилизации необходимо учитывать проблему микроокружения препарата. Поэтому выделяют следующие способы иммобилизации:

- на носителе или на поверхности носителя. В этом случае удерживаемая поверхность или часть поверхности носителя «омывается» внешней средой (жидкой или газообразной);

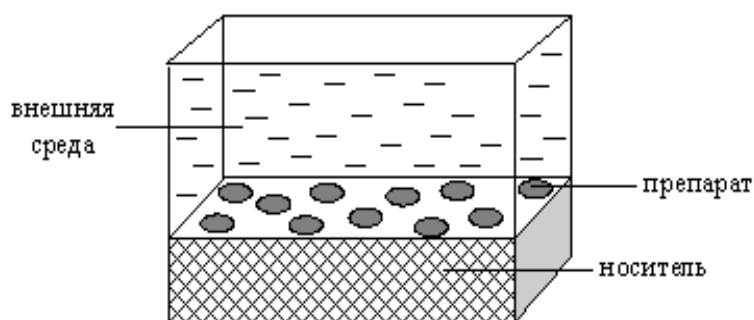


Рисунок 1 – Иммобилизация на носителе

- в носителе или в массе (объеме) носителя. Между внешней средой и препаратом в результате иммобилизации появляется слой материала носителя. В данном случае свойства носителя (например, пористость, заряд, гидрофильность) в значительной степени могут сказываться на функционировании иммобилизованного препарата и на уровне реализации потенциальных возможностей;

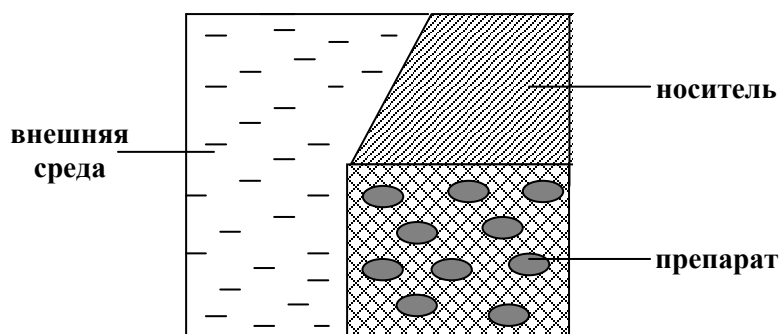


Рисунок 2 – Иммобилизация в массе носителя

- использование мембранной технологии. Препарат и небольшая часть внешней среды помещены в замкнутый объем, отделенный от остальной среды избирательно проницаемой мембраной, размер пор, в которой таковы, что субстраты и продукты через них проникают, а иммобилизованный препарат удерживается внутри замкнутого объема.

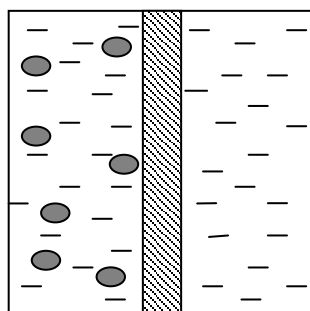


Рисунок 3 – Иммобилизация с использованием мембранной технологии

Уже в первых работах по изучению иммобилизованных клеток были замечены их отличия от свободных клеток суспензионных культур. Главным образом, отмечалось повышение наработки вторичных метаболитов, уменьшение скорости роста культуры и увеличение длительности функционирования в биореакторе.

К настоящему времени использование иммобилизации оказалось эффективным для ряда культур растительных клеток (табл. 1) [1-7].

Большинство иммобилизованных клеточных культур, по сравнению с соответствующими суспензионными, характеризуются большими скоростями синтеза (сверхсинтезом) продуктов вторичного метаболизма. Так, например, было показано, что при иммобилизации в альгинате клеток *Morinda citrifolia* продукция антрахинонов увеличивается в 10 раз [4], скополамина и атропина клетками *Datura innoxia* – также в 10 раз [8], аймалицина и серпентина суспензионной культурой *Cataharanthus roseus* – в 2,5 раза [9], гидроксикоричных кислот суспензионной культурой *Echinacea purpurea* – в 1,4 раза [10].

В то же время, нужно отметить, что практика применения иммобилизованных клеток основана главным образом на эмпирическом подходе. Условия иммобилизации и инкубации, материал носителя, пермеабиллизация, способствующая экскреции конечного продукта, а также другие процедуры подбираются опытным путем. Это зачастую не позволяет добиться оптимальных условий технологического процесса и рационально использовать потенциал иммобилизованной клетки. В этой связи возникает настоятельная потребность всестороннего изучения влияния процедуры иммобилизации на ход физиолого-биохимических процессов, протекающих в растительной клетке для

разработки технологии создания современных экологически безопасных физиологически активных веществ.

Таблица 1 – Использование иммобилизованных растительных клеток для получения физиологически активных веществ

Метод иммобилизации	Иммобилизованные культуры	Использование
Гранулы, 2-5% охлажденная агароза (40-20°C)	<i>Catharanthus roseus</i>	Синтез аймалицина <i>de novo</i>
Гранулы, 2-4% альгинат натрия, ионное поперечное связывание	<i>Catharanthus roseus</i>	Синтез алкалоидов <i>de novo</i>
	<i>Daucus carota</i>	Биотрансформация стероидов
	<i>Morinda citrifolia</i>	Синтез антрахинонов <i>de novo</i>
	<i>Digitalis lanata</i>	Биотрансформация дигитоксина
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Синтез никотина
	<i>Papaver somniferum</i>	Биотрансформация морфиновых алкалоидов

Процесс иммобилизации может оказывать значительное влияние на образование продуктов вторичного метаболизма посредством модификации как внутриклеточных физиологических процессов [11], так и плазматических мембран клеток [12].

Поскольку иммобилизованные клетки находятся в гетерогенной двухфазной системе, существенное влияние на внутриклеточные биохимические процессы оказывает разделение субстратов, газов, ионов, ингибиторов и продуктов между иммобилизованной и водной фазой. Наличие диффузионных ограничений может менять свойства клеток путем создания микроусловий внутри иммобилизованного матрикса, отличающихся от условий в основном растворе. Для поддержания физиологического состояния клеток, аналогичного состоянию свободных клеток суспензионной культуры, необходимо свести к минимуму указанные диффузионные ограничения.

Изучение среды внутри матрикса по таким параметрам, как рН, содержание O₂ и CO₂, наличие питательных веществ и т.д. является весьма затруднительным. К сожалению, встречаются лишь единичные работы, позволяющие охарактеризовать параметры микросреды при иммобилизации. Так, например, было экспериментально показано, что специфическое накопление O₂ клетками культуры *Catharanthus roseus*, иммобилизованными в сферические кальций-альгинатные гранулы с радиусом 0,1 см, составляет 30% от накопления O₂ свободными клетками [1]. В этой же работе авторы установили, что содержание кислорода характеризуется экспоненциальной зависимостью от центра гранулы к периферии.

Возникновение стрессовых для растительной клетки условий, к которым приводит создание микросреды внутри матрикса, может оказаться желательным в том случае, если это позволяет повысить синтез или экскрецию продукта. Использование стрессовых факторов, в том числе, элиситоров, – одна из наиболее эффективных стратегий увеличения синтеза необходимых вторичных метаболитов в культурах клеток растений. Элиситоры могут индуцировать общую и неспецифическую устойчивость растений. Под влиянием элиситоров происходит изменение функционирования генома, связанное с уровнем экспрессии защитных генов, приводящее к активации метаболических реакций в клетке [13].

Стрессовая реакция растительной клетки, инициируемая процессом иммобилизации, также сопровождается генерацией активных форм кислорода и приводит к росту

метаболической активности. В частности, при иммобилизации клеток культуры и протопластов *Catharanthus roseus* в агарозном геле наблюдали стимуляцию синтеза индольных алкалоидов, сопровождающуюся ростом активности пероксидазы и - галактозидазы [14].

Полисахариды, используемые в качестве иммобилизующего матрикса, могут действовать как элиситоры. Так, например, пектин и хитозан вызывают рост концентрации антрахинонов в клетках суспензионной культуры *Morinda citrifolia* [15]. Воздействие хитозана и альгината натрия, как элиситоров, на клетки суспензионной культуры *Plumbago rosea*, приводит, соответственно, к восьми- и двукратному увеличению накопления нафтохинона плюмбагина – соединения, обладающего противоопухолевой активностью [16]. Активность альгината, как карбогидратного элиситора, стимулирующего продукцию капсаицина, была обнаружена при исследовании иммобилизованных клеток суспензионной культуры *Capsicum frutescens* [17].

Подтверждением действия элиситоров на синтез вторичных метаболитов служат также результаты, приведенные в табл. 2.

Таблица 2 – Примеры увеличения синтеза вторичных метаболитов под действием элиситоров, вырабатываемых микроорганизмами [4]

Растение	Микроорганизм	Вторичный метаболит	Концентрация, мг/г сух.в.		Продолжительность инкубации, ч
			А	Б	
<i>Cinchona ledgeriana</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Антрахиноны	3	15	600
<i>Dioscorea deltoides</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Диосгенин	25	72	72
<i>Papaver somniferum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	Морфин	0,07	1,4	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Фазеолин	0	170	48
<i>Thalictrum rugosum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Берберин	20	50	96

Примечание: А – контроль; В – в присутствии элиситора

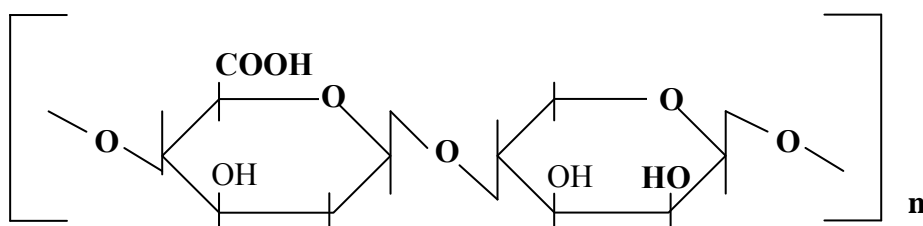
Механизмы стимуляции процесса биосинтеза вторичных метаболитов в клетках культуры при иммобилизации могут быть различными в зависимости от вида растения. Так, например, при иммобилизации суспензионных культур *Crusilata glabra* и *Vitis vinifera* в гранулах с использованием пектина и хитозана в качестве носителей, наблюдался рост внутриклеточной концентрации перекиси водорода, который мог быть обусловлен либо прямым элиситорным действием полисахаридов, либо стрессом, инициируемым возникновением микросреды. В иммобилизованных клетках культуры *Crusilata glabra* также в 5 раз увеличивалась концентрация антрахинона и в 34 раза - его экскреция в среду инкубации по сравнению со свободными клетками культуры. В то же время, при иммобилизации клеток культуры *Vitis vinifera* генерация перекиси водорода (в 4,4 раза ниже, чем в иммобилизованной *Crusilata glabra*) не сопровождалась ростом концентрации антрахинона. Было установлено, что в клетках *Crusilata glabra* перекись водорода является вторичным медиатором, который опосредует продукцию антрахинона при стрессе, инициируемом возникновением микросреды в процессе иммобилизации [6]. В то время как на клетки суспензионной культуры *Vitis vinifera* носители оказывают непосредственное влияние в качестве элиситоров [6].

Влияние иммобилизации на внутриклеточный метаболизм является сложным многокомпонентным процессом. Иницируемая иммобилизацией стрессовая реакция клетки приводит к активации сигнальных каскадов, в ряде случаев стимулируя синтез

вторичных метаболитов. Модуляция метаболической активности клеток при иммобилизации, вследствие возникновения микросреды, как стрессового фактора, и/или элиситорного действия носителя, зависит от вида культуры и пути синтеза конкретного вторичного метаболита. Следовательно, идентификация путей передачи сигнала и компонентов сигнальной трансдукции позволит регулировать и повышать эффективность продукционного процесса различных видов вторичных метаболитов, ферментов и рекомбинантных белков в культурах растительных клеток.

Самым эффективным методом иммобилизации растительных клеток является их включение в кальций-альгинатный гель.

Альгинат – натуральный полисахарид, состоящий из D-маннуроновой и L-гулуруновой кислот:



В ряде работ предполагается, что немаловажную роль играет заряд носителя, формирующего экстраклеточный матрикс при иммобилизации. Было показано, что в процессе иммобилизации клеток *Coffea arabica*, именно заряд кальций-альгината влияет на секрецию полисахаридов, модификацию структуры формирующейся клеточной стенки, что сопровождается активацией синтеза алкалоидов [18].

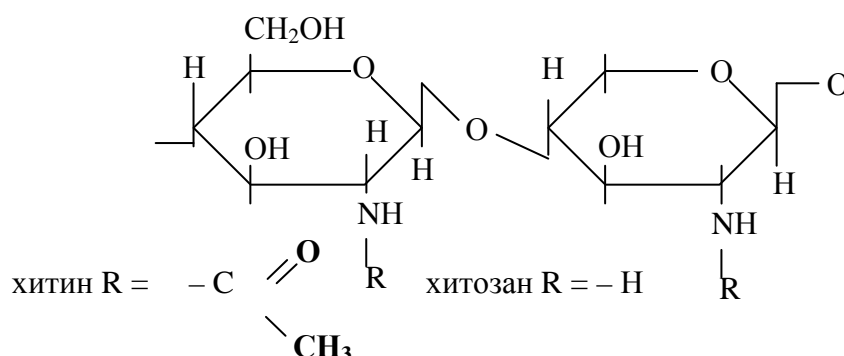
Содержание пектина в образующихся клеточных стенках было значительно выше при иммобилизации протопластов *Linum usitatissimum* в носителе, имеющем заряженные группы (кальций-альгинатном), чем при иммобилизации в нейтральном агарозном геле [19].

Исследования экспрессии генов, ассоциированных со специфическими морфогенетическими ответами протопластов *Linum usitatissimum*, показали, что синтез *de novo* специфических полипептидов не различается при иммобилизации в агарозе и альгинате кальция [20]. В то время как, количество этих специфических полипептидов в ионно-связанном с клеточной стенкой состоянии значительно выше при иммобилизации в альгинате кальция. Таким образом, наблюдается прямая корреляция между морфогенетическими ответами, образованием ионных связей между белками и клеточной стенкой и электростатическими свойствами иммобилизующего матрикса [20].

Участие Ca^{2+} как вторичного медиатора в трансдукции внешних сигналов и его важное полифункциональное значение для процессов роста и развития растительной клетки хорошо изучены [21]. Однако его роль при иммобилизации исследована явно не достаточно. Существуют лишь единичные работы, хотя показано благоприятное влияние присутствия кальция в различного рода носителях. Так, при сравнительном анализе влияния Ca^{2+} , альгината, и кальций-альгината на синтез сесквитерпенов в клетках культуры *Hyosyamus muticus* при иммобилизации, было обнаружено, что ключевая роль принадлежит именно кальцию [22]. Вероятный механизм, по которому Ca^{2+} , как вторичный медиатор, оказывает влияние на физиологическое состояние клеток растений при иммобилизации, может включать его высвобождение из полисахаридного матрикса и активацию Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны.

С другой стороны, исследование влияние хитозана на клетки суспензионной культуры *Glycine max* показало, что хитозан изменяет проницаемость плазматической мембраны для Ca^{2+} и происходит быстрый выброс иона из предварительно нагруженных $^{45}\text{Ca}^{2+}$ клеток [23]. В данном случае, по-видимому, хитозан действует как элиситор, влияющий на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} .

Некоторые иммобилизованные системы, в частности кальций-альгинатные гранулы, способны вызывать не только увеличение синтеза продуктов вторичного метаболизма, но и их экскрецию в культуральную среду.



Свободные клетки суспензионной культуры *Juniperus chinensis* аккумулировали подофиллотоксин во внутриклеточных компартментах, тогда как иммобилизованные с использованием Са-альгината клетки экскретировали его в культуральную среду в значительных количествах (до 4 мг/г сухого веса). В другом случае, иммобилизовали в Са-альгинатные гранулы продуцирующие скополин клетки суспензионной культуры *Nicotiana tabacum*. Свободные клетки суспензионной культуры аккумулировали скополин в цитоплазматических компартментах, напротив, иммобилизованные растительные клетки экскретировали значительные его количества [24].

По-видимому, с помощью методов иммобилизации удастся практически решить проблемы, связанные с использованием культур растительных клеток и тканей для получения сложных органических соединений.

Перспективы использования иммобилизованных растительных клеток весьма широки. Они могут быть использованы для создания моноферментных *биокатализаторов на основе целых клеток*, обеспечивающих полный синтез целевого продукта, для получения лекарственных, профилактических и диагностических препаратов, рекомбинантных белковых лекарственных веществ, для трансформации вторичных метаболитов (например, превращение дигитоксина в дигоксин). Далее, могут быть созданы *биокатализаторы нового поколения* на основе одновременной иммобилизации продуцентов и ферментов трансформации продукта биосинтеза (рис. 4). Объединение в одном реакторе процесса биосинтеза и реакции трансформации значительно снизит себестоимость продукции вследствие уменьшения затрат на выделение и очистку биологически активных веществ и повысит качество продукции.

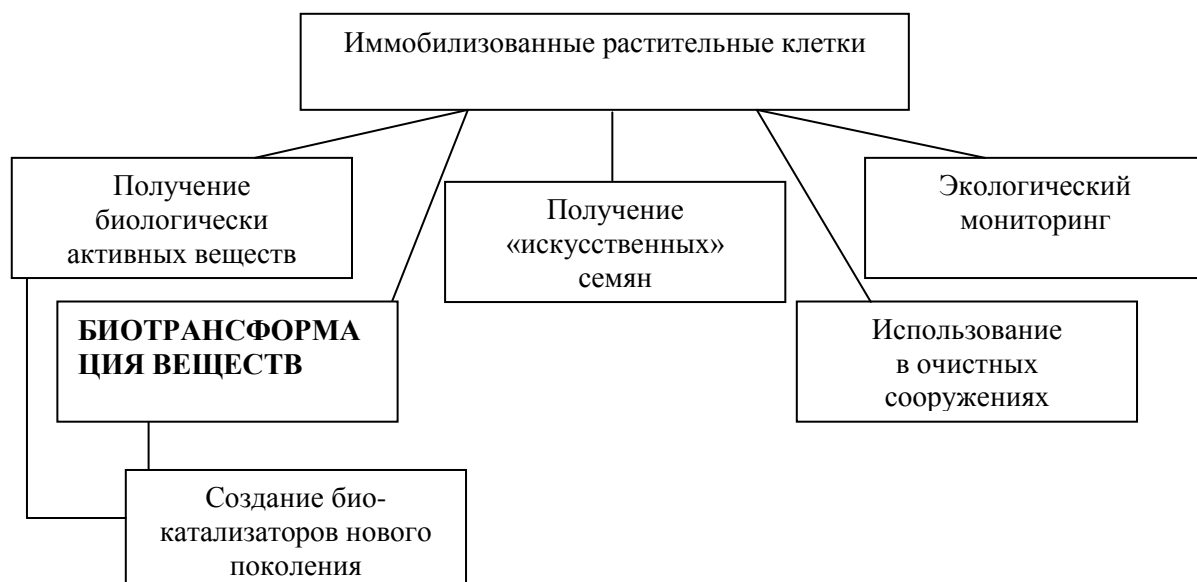


Рисунок 4 – Схема возможного использования иммобилизованных растительных клеток.

Иммобилизованные растительные клетки могут быть использованы для решения проблем экологии и охраны окружающей среды путем создания биосенсоров. Клеточные биосенсоры на основе иммобилизованных клеток - аналитические устройства, позволяющие получать и перерабатывать экспресс-информацию о химическом составе тех или иных объектов, т. е. могут быть использованы для повышения качества анализов, контроля технологических процессов, оценки качества пищевых продуктов. Иммобилизация создает условия для интенсификации сельскохозяйственного производства путем разработки новых методов культивирования растений, а именно, получение «искусственных семян» с использованием комбинирования методов иммобилизации и микроклонального размножения.

Таким образом, клетки растений – незаменимый источник очень многих практически важных веществ. Однако при крупномасштабном использовании растительных клеток с целью получения широкого спектра органических соединений необходимо учитывать ряд проблем (медленный рост, низкую механическую устойчивость, способность к агрегации, зачастую низкий выход целевого продукта, генетическую нестабильность и т.д.). Использование иммобилизованных растительных клеток позволяет во многом устранить указанные недостатки, что дает основание рассматривать данный подход в качестве эффективной стратегии для повышения синтеза вторичных метаболитов и разрабатывать на его основе технологии промышленного получения ценных соединений.

Список литературы

1. Lee-Parsons, C. Sparge gas composition affect biomass and ajmalicine production from immobilized cell cultures of *Catharanthus roseus* / C. Lee-Parsons, M. Shuler // Enzyme and Microbial Technology. – 2005. – Vol. 37. – P. 424-434.
2. Ziyad-Mohammed, M.T. Plant cell immobilization in alginate and polyurethane foam / M.T. Ziyad-Mohammed, A.H. Scragg // Method in molecular biology. – 1990. – Vol. 6. – P. 513-536.
3. Болвелл, Г.П. Биотехнология растений: культура клеток / Г.П. Болвелл // М.: Агропромиздат, 1989. – 280 с.
4. Brodelius, P. Stress induced secondary metabolism in plant cell culture / P. Brodelius // In Pais MSS, Mavituna F., Novais JM (eds) Plant cell biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1988. – 195 p.
5. Юрин, В.М. Иммобилизованные растительные клетки. Физиолого-биохимические особенности / В.М. Юрин // Нарочанские чтения; материалы международной научно-практической конф., Минск-Нарочь, 27-30 сентября 2006 г. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: В.М. Юрин [и др.]. – Минск, 2006. - С. 227-231.
6. Dörnenburg, H. Evaluation of immobilization effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes / H. Dörnenburg // Process Biochemistry. – 2004. – Vol. 39. – P. 1369-1375.
7. Johnson, T.S. Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* / T.S. Johnson, G.A. Ravishankar, L.V. Venkataraman // Mill. Food Biotechnol. – 1991. – Vol. 5. – P. 197- 205.
8. Gontier, E. Effects of calcium, alginate, and calcium-alginate on growth and tropane alkaloid levels of a stable of *Datura innoxia* Mill. / E. Gontier, B.S. Sangwan, J.N. Barbotin // Plant Cell Reports. – 1994. – Vol. 13. – P. 533-536.
9. Rosevear, A. Immobilized plant cells. / A. Rosevear, C.A. Lambe // in Plant Cell Culture. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Series. – 1985.– Vol. 31. – P. 37-58.

10. Савчук, Е.В. Влияние иммобилизации на содержание биологически активных веществ в суспензионной культуре эхинацеи пурпурной / Е.В. Савчук, Т.И. Дитченко. // Материалы Республиканской научно-практической конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «III Машеровские чтения». Естественные науки. Витебск, 24-25 марта 2009 г. / Витебск: УО ВГУ им. П.М. Машерова. – Витебск, 2009. – С. 91-92.
11. Филиппова, Г.Г. Фотохимическая активность клеток / Г.Г. Филиппова, М.П. Шапчиц, В.М. Юрин. // Нарочанские чтения; материалы международной научно-практической конф., Минск-Нарочь, 27-30 сентября 2006 г. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: В.М. Юрин [и др.]. – Минск, 2006. – С. 239-244.
12. Рудковская Е.Е. Индуцированные полисахаридами изменения ионного транспорта через плазмалемму иммобилизованных растительных клеток: дис. канд. биол. наук: 03.00.12 / Е.Е. Рудковская. – Минск, 1998. – 92 с.
13. Endreb R. Plant Cell Biotechnology / R. Endreb // Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1994. – 353 p.
14. Nobuaki, M. Production of cell wall accumulative enzymes using immobilized protoplasts of *Catharanthus roseus* in agarose gel / M. Nobuaki [et al.] // Biotechnology Letters. – 2003. Vol. 25. – P. 1687–1693.
15. Dörnenburg, H. Effectiveness of plant-derived and microbial polysaccharides as elicitors for anthraquinone synthesis in *Morinda citrifolia* cultures / H. Dörnenburg, D. Knorr // J. Agric. Food. Chem. – 1994. – Vol. 42. – P. 1048–1052.
16. Komaraiah, P. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption / P. Komaraiah [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 101. – P. 181-187.
17. Lindsey, K. The synthetic potential of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. Cv. Annum / K. Lindsey, M.M. Yeoman // Planta. – 1984. – Vol. 162. № 6. – P. 495-501.
18. Haldimann, D. Redirecting cellular metabolism by immobilization of cultured plant cells: a model study with *Coffea arabica* / D. Haldimann, P. Brodelius // Phytochemistry. – 1987. – Vol. 26. – P. 1431-1434.
19. David, H. Pectins in walls of protoplast-derived cells embedded in agarose versus alginate beads / H. David. [et al.] // Protoplasma. – 1995. – Vol. 86. – P. 122-130.
20. Roger, D. Immobilization of flax protoplasts in agarose and alginate beads / D. Roger, A. David, H. David // Plant Physiology. – 1996. – Vol. 112. – P. 1191-1199.
21. White, P.J. Calcium in plants / P.J. White, M.R. Broadley // Ann Bot. – 2003. – Vol. 92. – P. 487-511.
22. Curtis, W.R. Role of calcium and differentiation in enhanced sesquiterpene elicitation from calcium alginate-immobilized plant tissue / W.R. Curtis, P. Wang, A. Humphrey // Enzyme and Microbial Technology. – 1995. - Vol. 17, № 6. – P. 554-557.
23. Young D.H. Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effect on membrane permeability / D.H. Young, H. Kauss // Plant Physiology. – 1983. – Vol. 73. - 698-702.
24. Gillet F. Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for production of enhanced amounts of scopolin / F. Gillet // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – Vol. 26. – P. 229-234.