

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА СИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КЛЕТКАМИ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА (*NICOTIANA TABACUM*)

М. П. Шапчиц, В. М. Юрин, А. П. Кудряшов, Г. Г. Филипцова

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, shapchitsm@inbox.ru

Культура клеток и тканей растений все больше привлекает внимание в качестве альтернативы целому растению для продукции вторичных метаболитов. Использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы, не только с точки зрения экономической выгоды получения более дешевой продукции в запланированных количествах, но и сохранения видового разнообразия растений. Действительно использование культуры растительных клеток может спасти от полного уничтожения тысячи дикорастущих растений, ставших уже редкими и синтезирующих полезные для человека вещества.

В настоящее время все шире в технологических процессах используются иммобилизованные клетки. Иммобилизованные растительные клетки по сравнению с суспензионными или каллусными культурами имеют ряд технологических достоинств, таких как многократное использование биомассы, проведение технологического цикла при более высоких плотностях клеток, относительно простое разделение продукта и продуцента. Еще одним важным преимуществом иммобилизации является ее положительный эффект на качественное и количественное содержание вторичных метаболитов [1]. Показано, что в результате иммобилизации синтез вторичных метаболитов, который в значительной степени зависит от физиологического состояния клетки, значительно ускоряется [2], хотя сам процесс иммобилизации зачастую происходит в экстремальных для живого организма условиях и может модифицировать основные физиолого-биохимические характеристики клеточной популяции вследствие изменения микроокружения, нарушения функций плазматических мембран и внутриклеточного метаболизма и ряду других причин.

Фенольные соединения растений, которые продуцируются в основном в процессах вторичного метаболизма, широко используются в медицине, пищевой и косметической промышленности и т. д. В этой связи целью нашей работы было изучение влияния иммобилизации на синтез фенольных соединений клетками культуры табака.

В качестве объекта исследования использовали 14-дневную суспензионную культуру клеток табака (стационарная фаза роста). Суспензионная культура клеток *Nicotiana tabacum*, инициированная из каллусной ткани, культивировалась в жидкой питательной среде RMNO (среда культивирования) [3] в термостате при температуре 24,5° С, постоянно перемешиваясь на качалке (100 об/мин). Среда RMNO содержала минеральные соли среды Мурасиго–Скуга (MS), 3 % сахарозы, 1 мг/л тиамин, 100 мг/л мезо-инозита, 3 мг/л 3-индолилуксусной кислоты, 0,04 мг/л кинетин, 0,1 мг/л 2,4-дихлорофеноксисукусной кислоты, pH 5,6–5,8. Субкультивирование проводили через каждые 14 суток.

Выбор иммобилизации в геле альгината кальция был сделан в связи с достаточной простотой метода и относительно мягкими условиями ее проведения. Ранее нами было продемонстрировано, что полисахаридные гели оказывают протекторное действие против гидродинамического стресса, механических и биологических повреждений на растительные клетки [4].

Клетки табака отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 1500 g в течение 5 минут. Для иммобилизации смешивали 3 г клеток с 10 мл

охлажденного (4–6 °С) 2 % альгината натрия и прокапывали смесь в охлажденный до той же температуры раствор 0,25 М CaCl₂ через шприц с выходным отверстием диаметром 2 мм. Через 20 мин после инкубации в хлориде кальция полученные Са-альгинатные гранулы с включенными в них клетками табака трижды промывали дистиллированной водой и переносили в конические колбы вместимостью 100 мл, содержащие 20 мл 3 % раствора сахарозы для инкубирования. Инкубацию препарата иммобилизованных клеток осуществляли в тех же условиях, что и при культивировании суспензионной культуры табака.

Содержание фенольных соединений определялось спектрофотометрически с помощью реактива Фолина–Дениса внутри суспендированных (контроль) и иммобилизованных в геле Са-альгината клеток табака, а также в среде инкубации (3 % раствор сахарозы) иммобилизованных клеток.

Установлено, что через 30 мин после включения в гель в иммобилизованных клетках табака содержание фенольных соединений было в 1,5 раза меньше, чем в клетках суспензионной культуры *Nicotiana tabacum* (4,1 мг/г и 7,0 мг/г соответственно), однако в дальнейшем при инкубации препарата иммобилизованных клеток содержание фенольных соединений внутри клеток, включенных в гель росло и уже через 2 сут внутриклеточная их концентрация увеличивалась и составляла 8,5 мг/г сух. массы, что несколько превышало содержание их в контроле (клетках суспензионной культуры).

Фенольные соединения, синтезируемые внутри клеток, со временем могут экскретироваться во внеклеточную среду. Действительно в среде культивирования обнаруживается значительное количество фенольных соединений, причем, по мере увеличения периода культивации их концентрация возрастает достигая у 14 дневной культуры 13,5 мг/л. Фенольные соединения были обнаружены также в среде инкубации Са-альгинатных гранул с включенными в них клетками уже через 30 мин культивирования (0,6 мг/л), а при двухсуточной инкубации их наружная концентрация значительно возросла и достигала 5,3 мг/л. Эта величина всего лишь в 2,5 раза меньше содержания фенольных соединений в среде на 14 сутки культивирования суспензионной культуры табака. Следует отметить, что среда инкубации не являлась полноценной для роста клеток и содержала лишь сахарозу. Однако, биосинтез фенольных соединений иммобилизованными клетками *Nicotiana tabacum* осуществляется достаточно интенсивно даже в этой среде.

Отмечаемое снижение внутриклеточной концентрации фенолов сразу же после иммобилизации по всей вероятности обусловлено их выходом из клеток, инициированным процедурой включения в гель или воздействием образующих гель реагентов. Последующее возрастание содержания фенольных соединений как внутри иммобилизованных клеток, так и в среде инкубации указывает на то, что в результате включения в гель клетки не только не утратили способности к синтезу фенольных соединений, но и поддерживают скорость их синтеза на уровне превышающем первоначальный.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akimoto C., Aoyagi H., Tanaka H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 429-436.
2. Gillet F., Roisin C., Fliniaux M.A., Jacquin-Dubreuil A., Barbotin J.N., Nava-Saucedo L.E. // Enzyme Microb Technol., 2000, V. 26, P. 229-234.
3. Сидоров А. В., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация пасленовых // Киев, Наукова думка, 1985, 132 с.
4. Юрин В. М., Шапчиц М.П., Кудряшов А.П. // Вестник БГУ, Сер. 2, № 2, 2004, С. 45-49.