

## **РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ПРОДУКТОВ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ**

**О.В. Молчан, М.П. Шапчиц, В.М. Юрин**

*Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь*

### **Введение**

Высшие растения являются уникальным источником соединений, используемых в фармацевтической промышленности, как в чистом виде, так и после различной химической трансформации [1]. Фармакологически активные вещества растительного происхождения чаще всего относятся к основным классам вторичных метаболитов - алкалоидам, изопреноидам, фенольным соединениям [2]. В растениях синтезируются также цианогенные гликозиды, поликетиды, витамины и др. Структурное многообразие и широкий спектр биологической активности вторичных метаболитов делает их незаменимой основой многих лекарственных препаратов. Кроме того, развитие генетической инженерии и создание растений - продуцентов рекомбинантных белков предоставляет дополнительные возможности для синтеза новых эффективных фармакологически активных соединений [3].

В настоящее время получение ряда соединений, например, эфирных масел, фенольных соединений, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, и др., в промышленных масштабах достигается, в основном, путем их экстрагирования из тканей дикорастущих или плантационных растений, часто относящихся к редким видам. В связи с этим, необходимо активное развитие новых направлений биотехнологии и биоинженерии, связанных с культурой растительных клеток и тканей. Одним из таких направлений является иммобилизация клеток растений.

Преимущества иммобилизованных клеток по сравнению со свободными клетками культуры широко признаны в настоящее время. Характерная для иммобилизованных клеток способность к сверхсинтезу и экскреции вторичных метаболитов является основой для разработки технологий получения лекарственных препаратов с помощью регулируемого биосинтеза. В ряде работ показано, что подбор условий иммобилизации позволяет оптимизировать технологический процесс и повысить метаболический потенциал растительной клетки [4]. В то же время, создание биореакторов на основе иммобилизованных клеток растений до сих пор не нашло широкого применения. Очевидно, что разработка подходов к масштабному, полноценному использованию

иммобилизованных растительных клеток возможна лишь на основе анализа их физиолого-биохимических характеристик и идентификации механизмов внутриклеточной регуляции метаболических процессов.

### **Иммобилизация клеток растений**

Начиная с середины 80-х годов прошлого века, иммобилизация, как средство увеличения жизнеспособности и продуктивности культивируемых клеток, заняла важное место в биотехнологии [5]. Получение иммобилизованных систем клеток растений включает следующие этапы [6]:

1. получение культуры клеток с определенными заданными свойствами, например линии клеток с высоким выходом продукта и низкой скоростью роста;
2. подбор соответствующего метода иммобилизации и условий культивирования, при котором жизнеспособность клеток и биосинтез целевого продукта поддерживались бы максимально длительное время;
3. создание условий экскреции продукта из клеток в среду культивирования при сохранении жизнеспособности культуры.

Выбор методов иммобилизации существенно ограничивается чувствительностью клеток высших растений к параметрам окружающей среды (механическому, осмотическому воздействиям, pH, температуре, концентрации O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>, химически активным веществам и т.д.) [6]. Вероятно вследствие этого, ряд методов, применяемых для иммобилизации микроорганизмов, таких, как прикрепление к твердым носителям с помощью адсорбции и ковалентной сшивки, встраивание в полиакриламид и полимеры на основе винила и уретана, оказались не эффективными для клеток растений. Наибольшее распространение в настоящее время получили способы иммобилизации растительных клеток путем их встраивания в гранулы полисахаридных гелей природного происхождения. В качестве носителей используют: желатин, пектин, хитозан, агарозу, альгинат кальция, каррагинан калия и др.

Клетки, включенные в полисахаридный матрикс, в большинстве случаев сохраняют высокую жизнеспособность и метаболическую активность в течение длительного времени [1, 4-7]. В ряде работ отмечается, что иммобилизация способствует повышению устойчивости клеток к механическому повреждению и инфекциям [1-4]. В частности, была показана протекторная роль иммобилизации при осмотическом стрессе для клеток *Catharanthus roseus* [8]. Отмечается также, что устойчивость иммобилизованных клеток к вирусной инфекции определяется не только ограничением проникновения вирусов через

носитель, но и собственной антивирусной активностью ряда носителей, например альгината [9, 10].

### **Особенности вторичного метаболизма иммобилизованных растительных клеток**

Содержание вторичных метаболитов в клетках растений обусловлено генетически, находится под контролем роста и развития организма и определяется активностью их синтеза и деградации на клеточном уровне, а также эффективностью экскреции [11]. Процессы вторичного метаболизма характерны для дифференцированных клеток и тканей и реализуются с максимальной эффективностью при оптимальных внешних условиях в соответствии с таксономической специфичностью [12]. Возможность использования культур растительных клеток для получения биопрепаратов уже давно является общепризнанной. Культивируемые клетки тотипотентны, поэтому любое вещество, синтезируемое в интактном растении, в принципе, можно получить и в культуре клеток. Однако в быстро растущих недифференцированных клеточных культурах синтез продуктов вторичного метаболизма, обладающих фармакологической активностью, чаще всего не происходит на характерном для интактных растений уровне [11-13]. Отчасти, эту проблему можно решить, используя специализированные клетки и ткани растительного организма в качестве эксплантов для получения культуры и ее последующей иммобилизации.

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 [11].

*Стабилизация биокатализа.* К основным преимуществам иммобилизованных клеток относятся более высокая активность и стабильность метаболических процессов по сравнению со свободными клетками культуры [14].

При длительном культивировании свободные растительные клетки часто претерпевают значительные изменения. Поэтому важным биотехнологическим параметром является стабильность клеточной культуры, как в отношении процессов роста, так и в отношении синтеза биологически активных веществ. Оказалось, что у иммобилизованных клеток наблюдается удлинение стационарной фазы роста [15]. Таким образом, синтез необходимого продукта происходит, когда клетки характеризуются ограниченной скоростью делений, т.е. в период наименее вероятного возникновения

генетических изменений. За счет более длительной стационарной фазы, можно решить и ряд проблем, связанных с излишней наработкой биомассы.

С помощью меченых предшественников было показано, что вследствие замедления ростовых процессов продукты первичного метаболизма накапливаются и/или становятся более доступными для процессов вторичного метаболизма [15]. Поэтому системы иммобилизованных культур характеризуются стабильностью продуктивного биокатализа в течение длительных промежутков времени.

*Способность к сверхсинтезу продуктов вторичного метаболизма.* Большинство иммобилизованных клеточных культур, по сравнению с соответствующими суспензионными, характеризуются большими скоростями синтеза (сверхсинтезом) продуктов вторичного метаболизма. Так, например, при иммобилизации культуры клеток *Catharanthus roseus*, было установлено увеличение скорости синтеза *de novo* катарантина, виндолина, серпентина, аймалицина - предшественников ценных в фармакологическом отношении индольных алкалоидов винбластин и винкристина [5, 7, 16]. Активация синтеза вторичных метаболитов *de novo* наблюдалась также при иммобилизации в альгинате кальция *Morinda citrifolia* (антрахиноны), *Nicotiana tabacum* (никотин, скополин), *Datura innoxia* (тропановые алкалоиды скополамин и атропин), *Syringa vulgaris* (фенольные соединения) [6, 14, 17, 18].

Процесс иммобилизации может оказывать значительное влияние на образование продуктов вторичного метаболизма посредством модификации внутриклеточных физиологических процессов. При изучении особенностей физиологии иммобилизованных растительных клеток были установлены изменения в процессах фотосинтеза и дыхания, возникающие вследствие иммобилизации [14, 19]. Были обнаружены изменения барьерно-транспортных свойств плазматической мембраны, в частности - параметров транспорта  $K^+$ ,  $H^+$  и  $NO_3^-$  [20].

Поскольку иммобилизованные клетки существуют в гетерогенной двухфазной системе, существенное влияние на внутриклеточные биохимические процессы оказывает разделение субстратов, газов, ионов, ингибиторов и продуктов между иммобилизованной и водной фазой [21]. Для поддержания оптимального физиологического состояния иммобилизованных клеток, аналогичного состоянию свободных клеток суспензионной культуры, необходимо свести к минимуму диффузионные ограничения и условия. Этого можно достичь уменьшением размера иммобилизованных гранул, повышением концентрации субстрата в основном растворе, увеличением пористости носителя и оптимизацией распределения биомассы внутри частиц [6].

Изучение среды внутри матрикса по таким параметрам, как рН, содержание  $O_2$  и  $CO_2$ , содержание питательных веществ, в различных системах иммобилизации и режимов культивирования является весьма затруднительным. К сожалению, встречаются лишь единичные работы, позволяющие охарактеризовать параметры микросреды при иммобилизации. Так, например, было экспериментально показано, что специфическое накопление  $O_2$  клетками культуры *Catharanthus roseus*, иммобилизованными в сферические кальций-альгинатные гранулы с радиусом 0,1 см, составляет 30% от накопления  $O_2$  свободными клетками. [22]. В этой же работе авторы установили, что накопление  $O_2$  характеризуется экспоненциальной зависимостью от расстояния от центра гранулы. При 10% концентрации  $O_2$  в среде инкубации содержание  $O_2$  в центре гранулы и на расстоянии 0,02 см было близко к 0 даже при самой низкой плотности клеточной культуры - 50 г/л (плотность инокулума). При концентрации  $O_2$  в среде инкубации - 21%, значительное ограничение доступа кислорода в центр гранулы наблюдалось только при максимальной плотности культуры – 300 г/л (после 24 дней инкубации). Таким образом, было показано, что для стимуляции процессов синтеза аймалицина в иммобилизованных с помощью альгината кальция клетках культуры *Catharanthus roseus* оптимальным является размер гранул менее 2 мм и соотношение концентраций растворенных в среде инкубации  $O_2$  и  $CO_2$  – 50 и 0,3%, соответственно [22].

Внутриклеточная регуляция синтеза вторичных метаболитов при иммобилизации

*Стресс-сигналинг.* 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 клетках культуры растений [11]. Элиситорами являются соединения биотического или абиотического происхождения из различных источников, которые могут индуцировать физиологические или морфологические изменения в организме-мишени, вызывая активацию вторичного метаболизма [23]. Контроль метаболизма и формирование ответных реакций на действие стрессоров происходит вследствие трансдукции сигнала рядом внутриклеточных медиаторов (посредников). Установлено, что в ответ на действие элиситоров и ряда других стрессоров в клетках растений наблюдается повышение концентрации активных форм кислорода [24]. Перекись водорода, одна из активных форм кислорода, действует в клетках растений, как вторичный медиатор в стрессовых сигнальных каскадах [25]. Например, влияние ряда абиотических стрессовых факторов и

биорегуляторов, опосредованное ростом концентрации перекиси водорода, стимулирует синтез индольных алкалоидов в клетках культуры *Catharanthus roseus* [8].

Оказалось, что 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  $\alpha$ -галактозидазы, которые аккумуляровались в клеточной стенке [27].

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* [17]. 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 [26]. Активность альгината, как карбогидратного элиситора, стимулирующего вторичный метаболизм – продукцию капсаицина, была обнаружена при исследовании иммобилизованных клеток суспензионной культуры *Capsicum frutescens* [28].

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 [3]. 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 [3]. В то же время, при иммобилизации клеток культуры *Vitis vinifer* генерация перекиси водорода (в 4,4 раза ниже, чем в иммобилизованной *Crusilata glabra*) не сопровождалась ростом концентрации антрахинона [3]. Было установлено, что в клетках *Crusilata glabra* перекись водорода является вторичным медиатором, который опосредует продукцию антрахинона при стрессе, инициируемом возникновением микросреды в процессе иммобилизации [3]. В то время как на клетки суспензионной культуры *Vitis vinifera* носители оказывают непосредственное влияние в качестве элиситоров [3].

Самым эффективным методом иммобилизации растительных клеток является их включение в кальций-альгинатный гель. Альгинат – натуральный полисахарид, состоящий из D-маннуровой и L-гулуровой кислот. В ряде работ было показано влияние альгината на физиологическую активность растительных клеток [16, 18-22]. При иммобилизации суспензионной культуры *Plumbago rosea* в альгинате кальция накопление плюмбагина в клетках было в 8 раз выше по сравнению со свободной культурой [26]. Как уже упоминалось, при воздействии альгината, как элиситора, внутриклеточная концентрация плюмбагина увеличивалась лишь вдвое [26]. Таким образом, влияние иммобилизации на внутриклеточный метаболизм является сложным многокомпонентным процессом.

При манипуляциях с клеточными культурами требуется соблюдение асептических условий, поэтому все растворы подвергаются автоклавированию. Оказалось, что после автоклавирования при 121<sup>0</sup>С в течение 20 минут альгинат в растворе находится в виде полимеров (5 кДа), олигомеров (1-5 кДа) и небольших фрагментов HDPs (heat degraded products) [29]. И именно HDPs оказывают существенное влияние на физиологическое состояние клеток культуры *Catharanthus roseus*, вызывая рост концентрации активных форм кислорода и активацию 5'-фосфодиэстеразы, фермента, катализирующего деградацию РНК до нуклеозид-5'-монофосфатов. Авторы работы предполагают, что продукты, образующиеся при разрушении альгината вследствие автоклавирования, могут регулировать и другие внутриклеточные процессы, изменяющие физиологическое состояние клеток *Catharanthus roseus* при иммобилизации и приводящие к активации синтеза индольных алкалоидов [29].

Таким образом, инициируемая 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.

*Электростатические свойства носителя.* В ряде работ предполагается, что немаловажную роль играет заряд носителя, формирующего экстраклеточный матрикс при иммобилизации [20, 30-32]. 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 [30].

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 [31].

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 [32]. 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 [32].

*Роль  $Ca^{2+}$  как вторичного медиатора.* Участие  $Ca^{2+}$  как вторичного медиатора в трансдукции внешних сигналов и его важное полифункциональное значение для процессов роста и развития растительной клетки хорошо изучены [33]. Однако его роль при иммобилизации исследована явно не достаточно. Существуют лишь единичные работы [4-7, 34, 35].

Так, при сравнительном анализе влияния  $Ca^{2+}$ , альгината, и кальций-альгината на синтез сесквитерпенов в клетках культуры *Hyoscyamus muticus* при иммобилизации, было обнаружено, что ключевая роль принадлежит именно кальцию [34]. В ряде работ предполагается, что кальций-альгинатный матрикс является депо  $Ca^{2+}$  [4-7]. 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  $^{45}Ca^{2+}$  клеток [35]. В данном случае, по-видимому, хитозан действует как элиситор, влияющий на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$ .



## Заклучение

Клетки растений - уникальный и богатейший источник самых разнообразных биологически активных веществ. Поэтому естественно, что именно они являются наиболее перспективными объектами для иммобилизации. По-видимому, с помощью методов иммобилизации удастся практически решить проблемы, связанные с использованием культур растительных клеток и тканей для получения сложных органических соединений.

Интерес, проявляемый учеными к работам по иммобилизации растительных клеток, находит свое отражение в числе публикаций, которое с каждым годом быстро растет. Дальнейшие исследования физиолого-биохимических свойств иммобилизованных клеток растений, характеристик изменений структуры плазматической мембраны, механизмов синтеза новых белков (активация экспрессии, включение молчащих генов, активация ферментов), изменения в энергетическом обмене при иммобилизации помогут оптимизировать условия регуляции сверхсинтеза вторичных метаболитов.

На основании установленных закономерностей станет возможной разработка биотехнологических производств широкого спектра биопродуктов для фармацевтической и пищевой промышленности, агропромышленного комплекса и т.д.

## Литература

1. Fowler, M. Plant cell biotechnology to produce desirable substances / M. Fowler // Chemistry and Industry. – 1981. - Vol. 7. – P. 229-233.
2. Berl, W. J. Secondary products from plant cell cultures / W. J. Berl [et al.] // Biotechnology. - 1986. - Vol. 4. – P. 630-658.
3. 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.
4. Вудворд, Дж. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / Дж. Вудворд // – М.: Мир, 1988. - 215с.
5. Brodelius, P. Immobilized plant cells / Brodelius P., Mosbach K. // Adv. Appl. Microbiol. -1982. - Vol. 28. - P. 1-18.
6. Болвелл, Г.П. Биотехнология растений: культура клеток / Г.П. Болвелл // М.: Агропромиздат, 1989. - 280 с.
7. 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.
8. Zhao, J. Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock / J. Zhao, W.H. Zho, Y.Q. Guo // Biothechnol. Lett. – 2000. – Vol. 22. – P. 1227-1231.
9. Pardee, K.I. Plant virus inhibitors from marine algae / K.I. Pardee [et al.] // Can. J. Bot. – 2004. – Vol. 82, № 3. – P. 304-309.
10. Kintzios, S. Study on the mechanism of bioelectric recognition assay: evidence for immobilized cell membrane interactions with viral fragments / S. Kintzios [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2004. – Vol. 20. – P. 907–916.

11. Zhong, J.J. Biochemical engineering of the production of plant specific secondary metabolites by cell suspension cultures / J.J. Zhong // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2001. – Vol. 72. – P. 1–26.
12. Plas, H.W. Relation between primary and secondary metabolism in plant suspension cultures / H.W. Plas, C. Eijkelboom, M.J.M Hagendoorn // Plant Cell Tissue Org. Cult. – 1995. – Vol. 43. –P. 111–116.
13. Favali, M. A. *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasma: alkaloid production and structural observations / M. A. Favali [et al.] // Protoplasma. – 2004. – Vol. 223. – P. 45–51.
14. Юрин, В.М. Имобилизованные 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.
15. Knorr, D. Immobilization and permeabilization of cultured plant cells // D. Knorr, S.M. Miazga, R.A. Teutonico // Food Technol.- 1985. - Vol. 39, №10. – P. 135-140.
16. Aoyagi, H. Indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* protoplasts with artificial cell walls containing of guluronic acid rich alginate gel / H. Aoyagi [et al.] // J. Ferment. Bioeng. – 1998. – Vol. 85. – P. 306-311.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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 л.
21. Bienaime, C. How to build an adapted and bioactive cell microenvironment? A chemical interaction study of the structure of Ca-alginate matrices and their repercussion on confined cells / C. Bienaime [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research. - 2002. – Vol. 67A, № 2. – P. 376-388.
22. 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.
23. Akimoto, C. Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells / C. Akimoto, H. Aoyagi, H. Tanaka // Appl. Microbial. Biotechnol. – 1999. – Vol. 52. – P. 429-436.
24. Breusegem, F.V. The role of active oxygen species in plant signal transduction / F.V. Breusegem [et al.] // Plant Sci. – 2001. - Vol. 161. – P. 211-134.
25. Foyer, C.H. Hydrogen peroxide- and glutathione - associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling / C.H. Foyer [et al.] // Physiol. Plant. – 1997. – Vol. 100. – P. 241- 254.
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. Chiharu, A.T. Production of 5'-phosphodiesterase by *Catharanthus roseus* cells promoted by heat-degraded products generated from uranic acid / Chiharu, A.T. [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering/ - 2002. - Vol. 94, №. 2. - P. 154-159.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. White, P.J. Calcium in plants / P.J. White, M.R. Broadley // Ann Bot. – 2003. – Vol. 92. – P. 487-511.
34. 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.
35. 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.