Литература

1. *Nakayama T., Amachi T.* Fungal peroxidase: its structure, function, and application // J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 1999. Vol. 6. P. 185–198.
2. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 288 с.

СИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ РАСТЕНИЙ

А. А. Булатова, Ю. В. Асташева

Культура клеток растений привлекательное альтернативное целому растению средство для получения ценных вторичных метаболитов. Растительные клетки тотипотентны, т.е. каждая клетка в культуре содержит полную генетическую информацию и, следовательно, сохраняет способность синтезировать весь спектр соединений, найденных в родительском растении.

В настоящее время возможность использования культур растительных клеток для получения биологически активных соединений общепризнанна. Некоторые растительные культуры клеток синтезируют вторичные метаболиты даже в больших количествах, чем в интактном растении. Однако применение культур растительных клеток для промышленного синтеза сопряжено с рядом проблем (медленный рост культуры, способность клеток к агрегации, выращивание в строго асептических условиях, чувствительность к механическим повреждениям и т.д.), ограничивающих их внедрение в производство [1].

На сегодняшний день разработаны стратегии для увеличения синтеза вторичных метаболитов культурами клеток растений. К числу последних принадлежит иммобилизация. Под иммобилизацией понимают метод, который закрепляет каталитически активный фермент или клетки на носителе и предотвращает их поступление в жидкую фазу.

Иммобилизация может значительно влиять на клеточную физиологию и образование вторичных метаболитов. В некоторых случаях иммобилизация приводит к заметному увеличению продукции вторичных метаболитов.

Первым требованием при выборе способа иммобилизации является сохранение метаболической активности клеток и, следовательно, мягкость метода, позволяющая сохранить основные физиолого-биохимические функции обрабатываемого объекта. Чаще всего для иммобилизации растительных клеток используют мягкие гелевидные системы. Наиболее широко используется в качестве матрикса – Са-альгинат. Кроме того, используют и другие гели, такие как агар, агароза, желатин,

каррагинан и полиакриламид. Объектами для иммобилизации являются суспензионные культуры, при этом наиболее пригодными считаются неагрегированные суспензии.

Фенольные соединения растений, которые продуцируются в основном в процессах вторичного метаболизма, широко используются в медицине, пищевой и косметической промышленности [2; 3]. В этой связи целью нашей работы было изучение влияния иммобилизации на синтез фенольных соединений клетками растений.

В качестве объектов исследования служили клетки суспензионных культур табака (*Nicotiana tabacum*) и сирени (*Syringa vulgaris*) в стационарной фазе роста. Культура клеток табака является классическим хорошо изученным объектом. Культура клеток сирени практически не изучалась, литературные данные весьма не многочисленны. Следует отметить, что сирень обыкновенная содержит широкий спектр биологически активных веществ и представляет интерес с научной точки зрения для получения препаратов иммуномодулирующего и адаптогенного действия.

Иммобилизовали клетки табака и сирени включением их в Са-альгинатный гель. С этой целью использовали 2% и 3% альгинатный гель и 0,25 М $CaCl_2$. Затем иммобилизованные клетки инкубировали в конических колбах на 100 мл в 20 мл 3% сахарозы на качалке (100–120 об/мин) в темноте в термостате при 25 °С. В качестве контроля служили не иммобилизованные клетки, инкубируемые в тех же условиях, что и иммобилизованные.

Для анализа синтеза фенольных соединений (ФС) иммобилизованными клетками (ИК) и не иммобилизованными клетками (НК) определяли содержание ФС внутриклеточно и в среде инкубации. Количественное определение суммы фенольных соединений проводили спектрофотометрически с реактивом Фолина-Дениса по поглощению при 720 нм [4].

Картина изменения содержания ФС в ИК и НК табака и в среде инкубации последних представлена на *рис*. 1 и 2.

Как можно видеть из рис. 1 ИК табака содержали большее количество фенольных соединений по сравнению с НК в период первых 5 суток после иммобилизации. Увеличение содержания фенольных соединений в ИК в течение 5 суток происходило с постоянной и большей скоростью в отличии НК. После 4 суток инкубирования в НК наблюдалось даже некоторое снижение количества ФС.

В среде инкубации НК табака содержание ФС в первые 4 суток было больше по сравнению с ИК (*рис*. 2). Однако на 5 сутки в среде инкубации НК наблюдалось заметное увеличение ФС (13,8 мг/л) по сравнению с НК (9,29 мг/л).

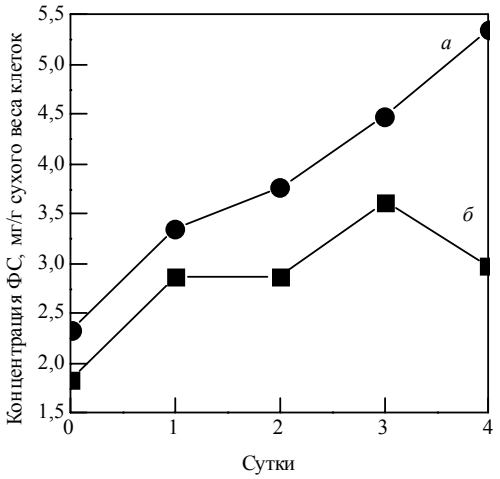

Рис. 1. Динамика изменения содержания фенольных соединений в клетках табака при инкубации в 3 % растворе сахарозы: *а* - неиммобилизованные клетки табака, *б* – иммобилизованные в 3 % альгинат клетки табака

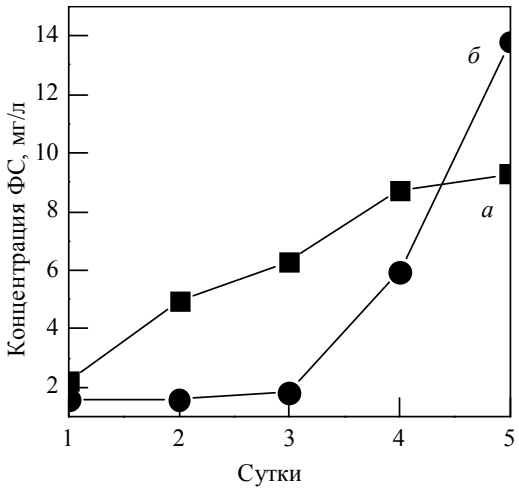

Рис. 2. Динамика изменения содержания фенольных соединений в среде инкубации иммобилизованных и не иммобилизованных клеток табака: *а* – среда с не иммобилизованными клетками (контроль), *б* – среда с иммобилизованными клетками (3 % альгинатный гель)

К 5 суткам после иммобилизации клетки табака показали больший уровень внутриклеточного содержания ФС и значительное преобладание в накоплении их в среде инкубации по сравнению с НК. Это позволяет сделать вывод об увеличении биосинтеза и экскреции ФС клетками табака под влиянием иммобилизации.

Анализ содержания ФС в НК (контроль) и ИК сирени проводили на 5, 8 и 13 сутки инкубирования. В клетках сирени иммобилизованных с использованием 3% альгинатного геля наблюдалось большее содержание ФС на протяжении всего исследуемого периода по сравнения с контролем. Кроме того, этот вариант ИК накапливал наибольшее количество ФС в среде инкубации к 13 суткам – 24, 37 мг/л.

В клетках сирени, иммобилизованных с использованием 2% альгинатного геля, концентрация ФС на 5 сутки также была выше (9,32 мг/г сухого веса клеток), чем в контроле (6,78 мг/г сухого веса клеток), однако в дальнейшем происходило ее снижение вообще и относительно контроля. Следует отметить, что накопление ФС в среде инкубации ИК данного вариан та было заметно выше, чем НК на протяжении всего исследованного периода. Картина изменения содержания ФС в ИК и НК сирени и в среде инкубации представлена на *рис*. 3 и 4.

Таким образом, результаты данных исследований демонстрируют влияние иммобилизации на синтез ФС в клетках табака и сирени, а также на выход данных вторичных метаболитов в среду инкубирования. Причем показана зависимость этих процессов от концентрации используемого для иммобилизации альгинатного геля.

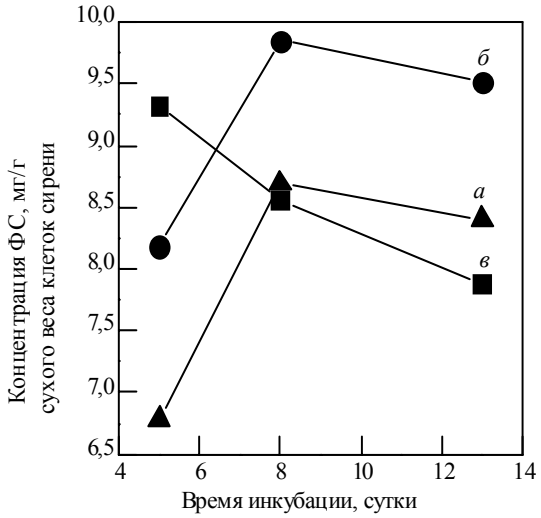

Рис. 3. Динамика изменения содержания фенольных соединений в клетках сирени при инкубации в 3% растворе сахарозы:
а – не иммобилизованные клетки сирени,
б – иммобилизованные в 3% альгинат клетки сирени,
в – иммобилизованные в 2% альгинат клетки сирени

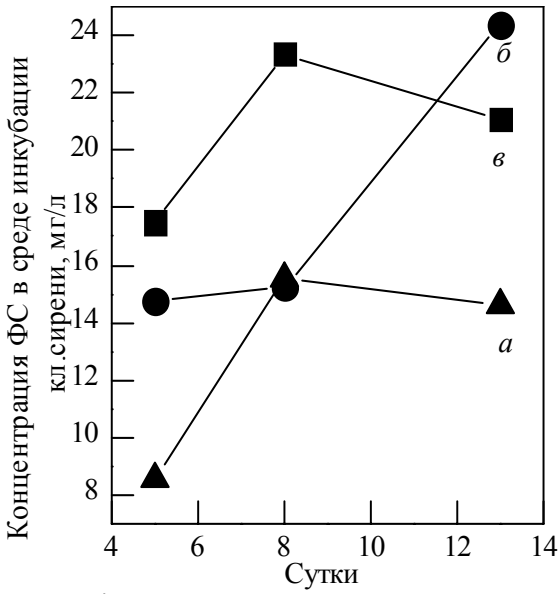

Рис. 4. Динамика изменения содержания фенольных соединений в среде инкубации иммобилизованных и не иммобилизованных клеток сирени: *а* – среда с не иммобилизованными клетками, *б* – среда с иммобилизованными в 3% альгинат клетками сирени, *в* – среда с иммобилизованными в 2% альгинат клетками сирени

Можно также заключить, что использование иммобилизованных клеток табака и сирени позволит накапливать большие концентрации ФС в среде культивирования по сравнению с НК. Тем не менее, необходим подбор оптимальных для синтеза и выхода ФС в среду культивирования условий иммобилизации, в частности концентрации альгинатного геля

Литература

1. *Шапчиц М. П., Юрин В. М. и др*., Влияние иммобилизации на синтез фенольных соединений клетками культуры табака (Nicotiana tabacum L.), БГУ, Мн., 2005 .
2. *Вудворд Дж.* Иммобилизованные клетки и ферменты, М., «Мир», 1998 .
3. *Brodelius P.*// Production of biochemicals with immobilized plant cells: possibilities and problems // Annals New York Academy of Science, 1983 Vol. 413, p.383
4. *Swain T., Hillis W. E. I.* Sci. Food Agr, 10, 1959, p. 63–68

ПАПЯРЭДНІ АНАЛІЗ БРЫЯФЛОРЫ КЛЕЦКАГА РАЕНА

Т. А. Кебікава

Мохападобныя з’яўляюцца важным кампанентам раслiннага покрыва. Яны ўваходзяць у склад шматлікіх фітацэнозаў, з’яўляюцца эдыфікатарамі на балотах, дамінантамі і субдамінантамі наглебавага покрыва лясных згуртаванняў.