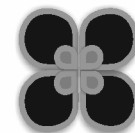


90  
ЛЕТ

# Биология



УДК 581.1:575.2

В.М. ЮРИН, Т.И. ДИТЧЕНКО

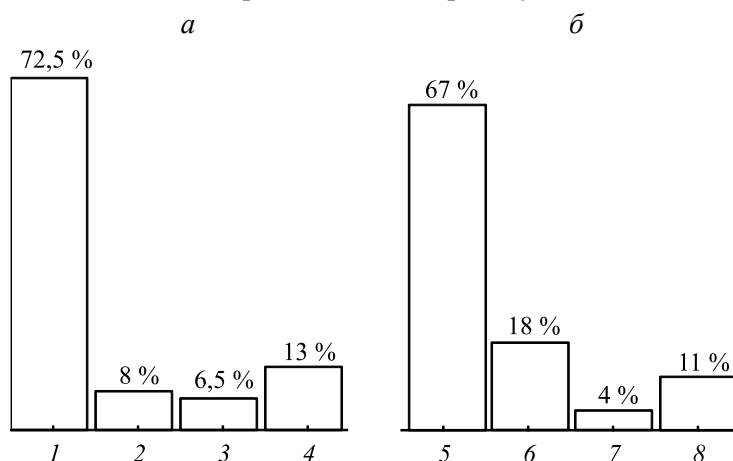
## ФИТОБИОТЕХНОЛОГИЯ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В УЧЕБНОЙ И НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ КАФЕДРЫ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

The main directions of phytobiotechnology scientific researches development at the Plant Physiology and Biochemistry department are considered. Significant amount of scientific results and methodological developments indicate that the department in recent years significantly expanded and improved teaching and research facilities for training in plant biotechnology.

Растительные клетки являются уникальными источниками ценных биологически активных веществ разной химической природы, которые обладают не только широким спектром лечебного действия, но и применяются в парфюмерии, пищевой промышленности, сельском хозяйстве.

Клетки и ткани высших растений, выращиваемые на питательных средах *in vitro* в строго контролируемых условиях, все шире используются в фитобиотехнологии. Название «фитобиотехнология» образовано от четырех слов греческого происхождения: *phyton* – растение, *bios* – жизнь, *teken* – искусство, *logos* – наука. Следовательно, это наука об использовании растительных объектов в технике и промышленном производстве. Фитобиотехнология рассматривается как часть общей биотехнологии, хотя по своим теоретическим и методологическим принципам ее можно выделить в самостоятельную дисциплину.

Обширное царство растений – потенциально неограниченный источник клеток и тканей, которые могут быть введены в культуру, и, как следствие, существуют неограниченные возможности для создания новых фитобиотехнологических процессов, в которых нуждается человечество.



Применение вторичных метаболитов в различных областях (а) и отдельных классов соединений в фармакопии (б):

1 – фармацевтические средства; 2 – пищевые добавки; 3 – пигменты; 4 – другие продукты; 5 – алкалоиды; 6 – сердечные гликозиды; 7 – стероиды; 8 – другие вещества

В последние годы много усилий было направлено на идентификацию в культуре растительных тканей продуктов вторичного метаболизма, представляющих собой ценные лекарственные средства. На рисунке указаны основные области применения и классы вторичных метаболитов растений, ис-

пользуемых в фармакопии [1]. Биомасса культивируемых клеток растений с начала 1980-х гг. используется в качестве источника важных продуктов. Однако существующие трудности и нерешенные вопросы сдерживают широкомасштабное их применение, обуславливают нерентабельность биотехнологических производств многих ценных видов растений.

Принципиальной проблемой является низкое содержание вторичных метаболитов в культуре растительных клеток. Это можно объяснить тем, что в искусственных условиях *in vitro* происходит частичная потеря способности к реализации генетической информации, относящейся к вторичному метаболизму. Правда, существуют культуры, которые содержат в равном количестве или даже превосходят по содержанию продукта *in vivo* в целом растении [2, 3]. Для экономически оправданного получения ценных биологически активных веществ необходима разработка приемов, обеспечивающих увеличение продуктивности культуры клеток растений.

На выход вторичных метаболитов в культурах растительных клеток и тканей влияют многие факторы, однако все способы регуляции вторичного метаболизма в культуре *in vitro* можно разделить на две группы: физиологическая и генетическая. В основе физиологического регулирования лежит изучение физических и химических условий культивирования растительных клеток, оптимальных для образования вторичных метаболитов. Уделяя серьезное внимание проблеме влияния состава среды (регуляторы роста, источники углерода (сахара), минеральные вещества, элиситоры и др.) и внешних условий культивирования (свет, аэрация, температура) на эффективность синтеза вторичных метаболитов, усилия экспериментаторов, таким образом, направлены на подбор сред, которые обеспечивают как рост культуры, так и образование продуктов вторичного метаболизма. Однако в большинстве случаев состав среды, который необходим для максимального роста, отличается от состава, необходимого для образования вторичных метаболитов. В связи с этим на практике обычно применяется двухфазный способ культивирования. На первом этапе клетки выращивают на стандартной среде, т. е. создают оптимальные условия для роста и накопления биомассы, а на втором – их пересаживают на «продуцирующую» среду, после чего метаболизм клеток сдвигается в сторону синтеза продуктов вторичного метаболизма [4].

За последние годы на кафедре физиологии и биохимии растений получены стабильно растущие каллусные ткани и клеточные суспензии ряда лекарственных растений: эхинацеи пурпурной, шалфея лекарственного, сирени обыкновенной, каллизи душистой, пажитника греческого, катарантуса розового, барвинка малого и др. Представленные виды содержат различающиеся по химической структуре и физико-химическим свойствам группы вторичных метаболитов и характеризуются разнообразием фармакологических эффектов. При изучении влияния химических и физических условий культивирования на продукцию биологически активных веществ в клеточных культурах указанных лекарственных растений установлено следующее [5, 6]:

1. Применение гормональных эффекторов позволяет регулировать образование вторичных соединений в культивируемых растительных клетках, однако в каждом отдельном случае необходим поиск оптимальных условий. Действие фитогормонов специфично и зависит от вида растения, природы вторичного соединения и т. п. Тем не менее для каллусных культур эхинацеи пурпурной и шалфея лекарственного показано, что снижение концентрации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) либо полное ее исключение из состава питательной среды сопровождается существенным повышением уровня таких вторичных метаболитов, как фенолкарбоновые кислоты (ФК). Замена 2,4-Д на  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту также способствует возрастанию уровней накопления указанных соединений. Данная закономерность отмечается и в случае анализа содержания L-триптофана, а также триптамина – основного предшественника всех алкалоидов индольного ряда в каллусной культуре барвинка малого, а также активности фермента триптофандекарбоксилазы (ТДК) в каллусной ткани катарантуса розового.

2. Увеличение концентрации сахарозы в питательной среде до 4÷5 % способствует повышению содержания вторичных метаболитов: гидроксикоричных кислот (ГК) в каллусной культуре эхинацеи пурпурной, флавоноидов в каллусах пажитника греческого, ФК в каллусах шалфея лекарственного, фенольных соединений (ФС) в каллусных культурах сирени обыкновенной и каллизи душистой.

3. Снижение содержания либо полное исключение из состава питательной среды таких макроэлементов, как азот и фосфор, приводит к замедлению роста клеток, но позволяет активизировать процессы вторичного метаболизма. Эта закономерность проявляется при анализе содержания ФС в клеточных культурах сирени обыкновенной, ГК в каллусах эхинацеи пурпурной, флавоноидов в каллусах пажитника греческого.

4. Использование элиситоров, в частности салициловой и жасминовой кислот, позволяет повысить содержание таких метаболитов, как ФС, в каллусах шалфея лекарственного, ГК в каллусах эхинацеи пурпурной, а также водорастворимых сахаров в каллусах каллизии душистой.

5. Выраженное стимулирующее действие света на образование вторичных соединений в культуре клеток показано на примере ФК в каллусах шалфея лекарственного, флавоноидов в каллусах пажитника греческого, ГК в каллусных тканях эхинацеи пурпурной, ФС в каллусной культуре сирени обыкновенной. Существенное повышение активности ТДК обнаружено в каллусах катарантуса розового, культивируемых на свету, по сравнению с темнотой.

6. Температурные оптимумы для роста культуры клеток и биосинтеза вторичных метаболитов, как правило, не совпадают. В частности, оптимальными для роста каллусов эхинацеи пурпурной являются температуры 24÷27 °С, тогда как для накопления ГК – 21 °С. В случае каллусной культуры шалфея лекарственного наиболее благоприятной для роста считается температура 24 °С, тогда как стимуляция накопления ФК в наибольшей степени проявляется при снижении температуры до 18 °С.

7. Оригинальным приемом экзогенного физического воздействия, направленного на повышение степени дифференцировки растительных клеток в культуре *in vitro* и, следовательно, на образование вторичных метаболитов, является действие слабыми дозами электрического тока, что было установлено на примере каллусных культур катарантуса розового и эхинацеи пурпурной.

Новым развиваемым на кафедре подходом, способствующим увеличению выхода ценных метаболитов, является иммобилизация клеток и тканей растений. Как показано в ряде работ [7, 8], процесс иммобилизации оказывает значительное влияние на образование продуктов вторичного метаболизма. Биосинтез физиологически активных веществ в иммобилизованных клетках растений происходит с большей скоростью и более высокой активностью по сравнению с нативными.

В последние годы с помощью иммобилизованных препаратов удалось увеличить эффективность процессов, используемых в самых разных областях человеческой деятельности (медицина, энергетика, пищевая промышленность, микроэлектроника, утилизация отходов и т. д.) [9, 10].

Использование иммобилизованных клеток позволяет за счет более продолжительной стационарной фазы роста увеличить наработку биомассы, в свою очередь, низкая скорость роста способствует высокому выходу вторичных метаболитов благодаря взаимодействию клеток на/в носители между собой, преодолеть процесс агрегации и генетических изменений; также повышается механическая устойчивость [11].

В то же время практика применения иммобилизованных клеток основана главным образом на эмпирическом подходе. Условия иммобилизации и инкубации, материал носителя, процессы пермеаблизации клеток и другие процедуры подбираются опытным путем. Это зачастую не позволяет добиться оптимальных условий технологического процесса, рационально использовать потенциал иммобилизованной клетки. В этой связи возникла настоятельная потребность всестороннего изучения влияния процедуры иммобилизации на ход физиолого-биохимических процессов, протекающих в растительных клетках.

Целью проводимых на кафедре работ является выявление механизмов первичных мембранотропных эффектов и последующих изменений внутриклеточных процессов в клетках растений в условиях иммобилизации, а также разработка способов повышения содержания в них физиологически активных соединений.

В этом направлении с использованием различных растительных объектов в настоящее время установлены следующие закономерности [12–14]:

- включение клеток в Са-альгинатный гель повышает их жизнеспособность по сравнению с иммобилизованными в агаре и свободными клетками при хранении в различных условиях освещенности и температуры;
- альгинатные гели активируют транспорт нитратов и снижают входящие потоки калия по сравнению с суспендированными клетками;
- мембранотропные эффекты отрицательно заряженных полисахаридов выражаются в увеличении неселективной ионной проводимости плазматической мембраны и обусловлены взаимодействием с липидным бислоем;
- в процессе хранения отмечается изменение соотношения хлорофилла *a* и хлорофилла *b*. В наибольшей степени стабилизирующее влияние полисахаридных гелей (особенно агара) сказывается на состоянии фотосинтетических пигментов, в частности, на содержании хлорофилла *a*;
- включение растительных клеток в Са-альгинатные гранулы приводит к повышению содержания биологически активных веществ, стимуляции активности ключевых ферментов биосинтеза вторичных метаболитов, а также к более эффективной экскреции синтезированных продуктов в питательную среду.

Увеличение биосинтеза физиологически активных соединений иммобилизованными растительными клетками связано с изменением баланса первичного и вторичного метаболизма в сторону последнего и обусловлено воздействием целого комплекса различных факторов, на которые мы уже указывали.

Важным элементом в подготовке высококвалифицированных специалистов является обеспечение знаний в различных областях биотехнологии. В этой связи преподавателями кафедры для студентов-биотехнологов читается общий курс «Иммобилизованные клетки и ферменты», который связан с такими дисциплинами, как молекулярная биология, биохимия, биофизика, микробиология, физиология растений, физиология человека и животных. Целью курса является формирование у студентов знаний о приемах иммобилизации, физиолого-биохимических особенностях иммобилизованных препаратов и представлений об их промышленном использовании. На лабораторных занятиях по данной дисциплине студенты осваивают технику проведения процедуры иммобилизации растительных клеток в различные полисахаридные носители, определяют жизнеспособность и физиологическую активность полученных препаратов и таким образом приобретают практические навыки работы с иммобилизованными растительными клетками.

К биотехнологическому направлению относятся и научные исследования сотрудников кафедры в области разработки биологических методов для оценки состояния окружающей среды на основе электроальгологического анализа.

Используемые химические методы хотя и имеют определенное значение для выявления веществ в воздухе, воде, почве и т. д., но не дают полного представления о воздействии веществ на живые системы. Это связано с ограниченным количеством определяемых в среде химических соединений и малочисленностью величин предельно допустимых концентраций, трудоемкостью и дороговизной проведения химического анализа; возможным появлением более токсичных соединений в процессе биотрансформации и отсутствием оценки биологической полноценности тестируемой среды. Кроме того, продукты распада и сочѐтанного действия поллютантов могут оказаться токсичнее анализируемых исходных соединений [15].

В этой связи для осуществления эффективного экологического мониторинга необходимо создание экономичных высокоинформативных интегральных методов, позволяющих осуществлять контроль биологической безопасности среды и прогнозировать состояние экосистем. К таким методам относится биотестирование, суть которого заключается в регистрации реакции различных живых организмов (тест-объект), выращенных в контролируемых условиях, на действие проб среды.

Для решения указанной проблемы нами разрабатываются высокоинформативные интегральные приемы контроля качества воды и почв с использованием клеток харовой водоросли [15, 16]. Функционирование предлагаемой системы основано на регистрации электрофизиологических показателей (ответ в виде электрического сигнала) при действии проб, что позволяет осуществлять инструментальную регистрацию с выводом на монитор компьютера. Данная разработка характеризуется экологическим и экономическим эффектами, которые позволяют уменьшить затраты на проведение физико-химического анализа, а также повысить надежность оценок. При этом социальный эффект выражается в обеспечении обнаружения загрязнения на ранних этапах, что дает возможность своевременно наметать мероприятия, способствующие сохранению здоровья человека и окружающей среды.

Для повышения уровня подготовки будущих специалистов биологов-биотехнологов по вопросам, касающимся процедур биотестирования, преподаватели кафедры читают общий курс «Ксенобиология» для студентов 5-го курса очного и 6-го курса заочного отделений и проводят лабораторные занятия, на которых студенты осваивают методы качественного и количественного анализа отдельных ксенобиотиков, определения мембранотропной и других видов их биологической активности.

С целью обеспечения возможности для полноценной самостоятельной работы студентов, а также широкомасштабного внедрения информационных технологий в учебный процесс сотрудниками кафедры проведена значительная работа по созданию учебно-методических комплексов и наполнению учебными материалами Сетевой образовательной платформы (СОП) «e-University». По дисциплинам, закрепленным за кафедрой физиологии и биохимии растений, разработаны учебно-методические материалы для организации самостоятельной работы студентов, включающие программу курса (типовую или учебную); учебные материалы (учебные пособия, курсы лекций, ссылки на ресурсы в Интернете и т. п.); методические рекомендации к лабораторным занятиям; темы рефератов, эссе; тестовые задания для промежуточного либо итогового контроля, самоконтроля знаний студентов и др. Использование студентами информационных материалов, размещенных в СОП «e-University», безусловно, позволяет более рационально организовать изучение того или иного курса.

Таким образом, на кафедре физиологии и биохимии растений за последние годы создана учебно-методическая и научная база для подготовки специалистов по биотехнологии растений. При этом в качестве приоритетных направлений развития фитобиотехнологии выступают получение клеточных линий-продуцентов биологически активных веществ, создание препаратов иммобилизованных растительных клеток и ферментов, разработка высокоинформативных интегральных методов контроля состояния окружающей среды на основе использования в качестве тест-объектов растительных клеток. Интеграция в учебный процесс научных результатов, полученных сотрудниками кафедры при выполнении научно-исследовательских проектов в рамках Государственных программ прикладных и фундаментальных научных исследований («Биоинженерия и биобезопасность», «Биорациональные пестициды», «Фундаментальные основы биотехнологий» и др.), направлена на обеспечение высокого уровня профессиональной подготовки студентов.

1. Collinge M. // Trends Biotechnol. 1986. Vol. 4. P. 299.
2. Mulabagal V., Tsay H.-S. // International J. of Applied Science and Engineering. 2004. Vol. 2. P. 298.
3. Endreb R. Plant Cell Biotechnology. Berlin; Heidelberg, 1994.
4. Валиханова Г. Ж. Биотехнология растений. Алматы, 1996.
5. Юрин В. М., Дитченко Т. И., Шапчиц М. П., Ромашко С. Н. // Тр. БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. Мн., 2008. Т. 3. Ч. 2. С. 118.
6. Юрин В. М., Дитченко Т. И., Молчан О. В. и др. // Тр. БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. Мн., 2009. Т. 4. Ч. 2. С. 168.
7. Gontier E., Sangwan B.S., Barbotin J.N. // Plant Cell Reports. 1994. Vol. 13. P. 533.
8. Rosevear A., Lambe C.A. // Plant Cell Culture. Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology Series. 1985. Vol. 31. P. 37.
9. Иммобилизованные клетки и ферменты: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Вудворта. М., 1988.
10. Brodelius B., Mosbach K.D., Zenk M.H. // FEBS Letter. 1979. Vol. 103. P. 93.
11. Dögnenburg H. // Process Biochemistry. 2004. Vol. 39. P. 1369.
12. Рудковская Е. Е. Индуцированные полисахаридами изменения ионного транспорта через плазмалемму иммобилизованных растительных клеток: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Мн., 1998.
13. Юрин В. М., Молчан О. В., Ромашко С. Н., Дитченко Т. И. // Тр. БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. Мн., 2009. Т. 4. Ч. 1. С. 211.
14. Юрин В. М., Дитченко Т. И., Молчан О. В. и др. // Современные проблемы биохимии: Учеб. пособие / Под ред. А. П. Солодкина, А. А. Чиркина. Витебск, 2010. С. 336.
15. Юрин В. М. Основы ксенобиологии. Мн., 2001.
16. Юрин В. М. Биоэлектрогенез растений. Мн., 2008.

Поступила в редакцию 27.05.11.

**Владимир Михайлович Юрин** – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов – функционирование и регуляция транспортных процессов на плазматической мембране растительных клеток, молекулярно-мембранные механизмы действия пестицидов, скрининг химических соединений и экологический мониторинг, а также физиолого-биохимические основы функционирования иммобилизованных растительных препаратов и клеток. Автор более 550 научных работ, в том числе 4 монографий, более 10 учебных пособий и курсов лекций, нескольких научно-популярных книг. Имеет 7 авторских свидетельств. Создал республиканскую научную школу в области электрофизиологии и ксенобиологии.

**Татьяна Ивановна Дитченко** – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов – культивирование *in vitro* клеток и тканей растений для получения биологически активных веществ, электрофизиологический анализ воздействия пестицидов на ион-транспортные свойства плазмалеммы растительной клетки. Автор более 100 научных работ, в том числе 6 учебно-методических пособий.