

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ АЛТЕЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО

Исачкина А.С., Дитченко Т.И.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
ditchenko@inbox.ru*

Одним из подходов, позволяющих увеличить выход вторичных метаболитов в культурах растительных клеток и тканей, является проведение процедуры иммобилизации – заключение клеток в/на определенный носитель. Для крупных растительных клеток наиболее подходящим методом иммобилизации является включение в гель. Далее гранулы геля с включенными клетками помещают в питательную среду, либо пропускают среду через иммобилизованный объект. В результате значительно повышается устойчивость растительных клеток к механическому стрессу, замедляется их рост, но одновременно возрастает способность к синтезу продуктов вторичного метаболизма [1-2]. Таким образом, иммобилизация дает немало преимуществ по сравнению с обычным культивированием растительных клеток в суспензионной культуре. В то же время, необходимо 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, как правило, подбираются опытным путем, поскольку клеточные культуры разных видов растений по-разному реагируют на действие определенного вида носителя и его концентрации.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния параметров иммобилизации (концентрация альгината натрия и размер Са-альгинатных гранул) клеток суспензионной культуры алтея лекарственного на динамику внутриклеточного содержания фенольных соединений (ФС) и их экскрецию в среду инкубации.

Объектом исследований служила суспензионная культура алтея лекарственного, которая была получена из каллусов рыхлого типа. В работе использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов: 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, 2,0 мг/л β -индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина. Культивирование иммобилизованных в Са-альгинатные гранулы клеток, также как и свободных клеток, проводили в конических колбах на качалках ротационного типа в термостате в темноте при температуре 25°C.

Проведение процедуры иммобилизации включало использование альгината натрия в концентрациях 2 либо 3%, а также 0,25 моль/л раствора хлорида кальция. Для изучения характера влияния размера Са-альгинатных гранул клеточная суспензия, смешанная с альгинатом натрия, пропусклась через стерильные шприцы с разным диаметром отверстия. В результате были получены гранулы, диаметр которых составлял 0,6 и 0,4 см, соответственно.

Определение сухого веса клеток, содержания ФС производили через каждые 2–3 сут культивирования в течение всего ростового цикла, продолжительность которого составляла 12-14 сут для свободных клеток суспензионной культуры алтея лекарственного и 16-18 сут для клеток, иммобилизованных в Са-альгинатные гранулы. Для определения сухой массы иммобилизованных клеток и внутриклеточного содержания ФС производили их высвобождение из носителя, что достигалось растворением Са-альгинатного геля в 0,1 моль/л растворе цитрата натрия.

Установлено, что иммобилизация клеток суспензионной культуры алтея лекарственного с использованием 3%-го альгината приводила к существенному замедлению скорости ростовых процессов (практически в 4 раза) относительно контроля. При этом отмечалось изменение кинетики ростового цикла по сравнению со свободными клетками: более позднее наступление фазы экспоненциального роста, а также увеличение продолжительности стационарной фазы.

Содержание ФС в иммобилизованных клетках суспензионной культуры алтея лекарственного достоверно повышалось только в стационарную фазу ростового цикла. Иммобилизация приводила к стимуляции экскреции анализируемых вторичных метаболитов в среду инкубации клеток в 1,4-1,8 раза на протяжении всего цикла выращивания. Это свидетельствует о пригодности суспензионной культуры алтея лекарственного в качестве объекта для иммобилизации в Са-альгинатные гранулы, поскольку использование клеточных культур, которые не способны осуществлять эффективную экскрецию вторичных метаболитов в иммобилизованном состоянии малоэффективно для организации биотехнологического процесса получения и выделения целевых продуктов.

Суммарное содержание ФС в клетках и среде инкубации иммобилизованных клеток алтея лекарственного было достоверно выше по сравнению с контролем в лаг-фазу и стационарную фазу ростового цикла. На стадии экспоненциального роста клеток содержание ФС снижалось, что возможно связано с преобладанием в этот период биосинтетических процессов, относящихся к первичному метаболизму.

Концентрация Са-альгинатного геля (2 либо 3%) не оказывала влияния на степень подавления роста иммобилизованных клеток в лаг- и лог-фазу ростового цикла. В стационарную фазу гораздо более выраженное ингибирование прироста сухой биомассы иммобилизованных клеток отмечалось в случае использования 3%-го альгината.

Уменьшение концентрации Са-альгинатного геля от 3 до 2% не приводило к росту биосинтетического потенциала иммобилизованных клеток суспензионной культуры алтея лекарственного. В частности, не обнаружено достоверных различий в содержании ФС по сравнению с клетками, иммобилизованными в 3%-ный раствор альгината, и среде их инкубации на протяжении всего ростового цикла. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что использование 2%-го Са-альгинатного геля является неэффективным способом иммобилизации клеток исследуемой суспензионной культуры.

Исследования влияния размера Са-альгинатных гранул показали, что включение клеток в гранулы разного диаметра не сопровождалось изменением скорости прироста клеточной биомассы. Однако более высокое внутриклеточное содержание ФС в стационарную фазу ростового цикла было выявлено для клеток, иммобилизованных в крупные гранулы. Можно предположить, что данный эффект обусловлен увеличением числа физических контактов между клетками, что благоприятно отражается и на химических контактах, т.е. их биосинтетическом потенциале. Действительно, вторичный метаболизм в крупных агрегатах клеток с небольшим отношением площади к объему отличается от такового у изолированных клеток и мелких групп в результате действия градиентов концентрации газов, регуляторов роста, питательных веществ.

Установленные закономерности позволяют оптимизировать процедуру иммобилизации клеток суспензионной культуры алтея лекарственного в гранулы на основе Са-альгинатного геля.

Литература

1. Юрин В.М., Ромашко С.Н., Дитченко Т.И., Молчан О.В. Иммобилизация – эффективный прием повышения синтеза биологически активных веществ в суспензионной культуре растительных клеток // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2010. – Т. 5, Ч. 1. – С. 191–199.
2. Dörnenburg, H. Evaluation of immobilization effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes // *Process Biochemistry*. – 2004. – V. 39. – P. 1369–1375.