

CELL AND TISSUE CULTURES OF HIGHER PLANTS: A PROMISING SOURCE OF VALUABLE CHEMICAL COMPOUNDS

Urazaliyev K.R.

*Kazakh Institute of Agriculture and Plant Growing
1 Erlepesov Str., Almalybak, Karasajskiy raiyon, Almatinskaya obl., 040909, Kazakhstan
kairatu@mail.ru*

ABSTRACT

A major feature distinguishing plants from bacteria and animals is the variety of synthetic processes in plants, which result in a broad range and variety of compounds, many of which are biologically active. Thus far, more than 30 000 such compounds have been identified across various chemical classes, and every year this number is increasing.

In recent years, plant cell and tissue culture has advanced to the extent that sufficient plant matter can be produced and economically important secondary compounds can be produced in amounts greatly exceeding that of their naturally occurring content in plants. The way in which these valuable chemical compounds are obtained, including plant cell and tissue culture methods, significantly impact the economic viability of the production of such compounds. To develop an economical production method, different techniques were compared: the use of immobilised cells and enzymes, semi-continuous and continuous systems, higher plant cells for biotransformation, and two-stage cultivation methods, and increased growth rates of the cultured cells and yields of secondary compounds from cultured tissue and cells. This comparative study was conducted by applying a variety of techniques, including chemical and physical mutagenesis, cloning of individual lines, the use of differentiated cultures, and optimisation of growth conditions, where the primary aim was to develop cheaper technologies for the production of secondary compounds from cultured cells and tissues of higher plants.

Keywords: secondary metabolites, cell and tissue culture, biologically active compounds.

УДК 581.143.6:582.823

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ЦЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Уразалиев К.Р.

*Казахский НИИ земледелия и растениеводства
ул. Ерлепесова, 1, Карасайский район, Алматинская область, 040909, Казахстан
kairatu@mail.ru*

АБСТРАКТ

Главное отличие растений от бактерий и животных – многообразие синтетических процессов, конечными продуктами которых является множество соединений самого разного химического строения, многие из которых биологически активны. Известны более 30 000 представителей различных химических классов веществ и каждый год число их увеличивается.

В последние годы получены культивируемые клетки и ткани растений, способные в значительных количествах накапливать необходимые экономически важные соединения вторичного обмена, в количествах, значительно превышающих их содержание в исходных растениях. Основную роль при выборе того или иного пути получения ценных химических соединений, в том числе и методами культуры клеток и тканей растений, играет экономическая эффективность.

Для увеличения конкурентоспособности используются различные приёмы: использование иммобилизованных клеток и ферментов, полунепрерывных и непрерывных систем, клеток высших растений для биотрансформации, двухэтапных методов культивирования, увеличение скорости роста культивируемых клеток и увеличение выхода вторичных соединений из культуры тканей и клеток. Для чего используются самые разнообразные приемы, включая химический и физический мутагенез, клонирование отдельных линий, использование дифференцированных культур, оптимизация условий выращивания и др. Все эти действия направлены в первую очередь на удешевление технологий получения вторичных соединений из культивируемых клеток и тканей высших растений.

Ключевые слова: вторичные метаболиты, культура клеток и тканей, биологически активные соединения.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении веков человечество полностью зависит от растений в качестве источника углеводов, белков и жиров для пищи и крова. Кроме того, растения являются ценным источником широкого диапазона вторичных метаболитов, которые используются в качестве лекарственных средств, агрохимикатов, ароматизаторов, отдушек, красителей, биопестицидов и пищевых добавок. Более 80% примерно из 30000 известных натуральных продуктов – это вещества растительного происхождения. Количество известных химических структур в растениях в четыре раза больше, чем в микробном царстве [1].

Из выявленных в 1985 году 3500 новых химических структур 2600 найдены в высших растениях. Во всем мире 121 отпускаемое по рецепту клиническое лекарство получено из растений. Обследования использования лекарственных растений американской общественностью показали увеличение от почти 3% в 1991 году до более чем 37% в 1998 году [1]. Американский рынок продаж растительных медикаментов увеличился примерно до 3 млрд. долл. США в год [2]. Даже сегодня 75% населения в мире полагается на растительные препараты в народной медицине. В США, где химический синтез доминирует в фармацевтической промышленности, 25% лекарственных препаратов основаны на химических веществах растительного происхождения. Растения будут продолжать предоставлять новые продукты как химическую основу для новых лекарственных препаратов в ближайшие столетия, потому что химия большинства видов растений еще полностью не изучена [3].

Биологически активные растительные соединения могут воздействовать различным образом на микроорганизмы, животных и человека. Это послужило основой их использования в медицине и создания из них лекарственных средств. Несомненными преимуществами получения лекарств из растений являются широкий спектр их биологической активности и экологическая безопасность изготовления, что особенно ценно в наше время. Природные молекулы растительного происхождения служат и еще долго будут служить моделями для синтеза полезных человеку соединений. В настоящее время, несмотря на огромные успехи химиков-синтетиков, из растений получают более трети лекарственных препаратов, структура многих из них настолько сложна (винбластин, сердечные гликозиды, кокаин, резерпин, хинин, колхицин, пилокарпин), что растения еще долго будут их единственным источником [4].

Несмотря на достижения в синтетической химии, мы по-прежнему зависим от биологических источников по ряду вторичных метаболитов, в том числе фармацевтические препараты [5]. Хорошим примером может быть аспирин (ацетилсалицилат), который является производным от салициловой кислоты, исходная молекула которой может быть выделена в больших количествах из многих растений (*Spiraea ulmaria*, *Betula lenta* и др.), но химически синтезируется в виде ацетил-производного. До химического синтеза вторичные метаболиты растений в течение долгого времени получали из выращиваемых в поле лекарственных растений. Достижения химического анализа и характеристика молекулярных структур помогли в точном раскрытии этих растений и корреляции с их жизнедеятельностью в контролируемых экспериментах. Несмотря на достижения в синтетической химии, мы по-прежнему зависим от биологических источников для ряда вторичных метаболитов, в том числе фармацевтических препаратов.

Благодаря большой биологической активности, вторичные метаболиты растений на протяжении веков использовались в традиционной медицине. В настоящее время они используются в качестве ценных соединений в фармацевтике, косметологии, тонкой химии.

Однако растения, произрастающие в конкретных экосистемах, трудно выращивать вне их экосистем. Бывает и так, что растения не выдерживают выращивания в полевых условиях из-за чувствительности к патогенам или другим условиям внешней среды. Это привело ученых и биотехнологов к мысли рассматривать культуры растительных клеток, тканей и органов в качестве альтернативного пути производства соответствующих вторичных метаболитов [6].

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Разработка основ метода культуры клеток и тканей растений имеет сравнительно короткую историю. Научное применение этого метода принято считать с исследований Габерландта, выполненных им в начале прошлого столетия [7].

Двести лет современная химия и биология описывали роль первичных метаболитов в основных жизненных функциях, таких как деление клеток и рост, дыхание, хранение и воспроизводство. В биологии понятие вторичных метаболитов ввел Коссел [6]. Важный шаг вперед был сделан Чапеком, который посвятил весь объем своей «Биохимии растений» тому, что он назвал «endproduct» [6]. В соответствии с ним, эти продукты можно получать из азотистого обмена, поэтому он назвал «вторичные модификации», такие как дезаминирование. По сравнению с основными веществами, обнаруженными в растениях, эти вторичные метаболиты вскоре были обнаружены при их низкой концентрации, часто менее 1% от общего количества углерода или хранящимися, как правило, в специальных клетках или органах. В середине 20-го века улучшение аналитических методов, таких как хроматография, привело к обнаружению все более новых из них, и это было основой для создания такой дисциплины как фитохимия. Бумажная хроматография показала, что некоторые из этих молекул были пигменты, другие вторичные соединения, возможно, участвующие в жизнедеятельности растений, были еще во многом загадочными, как заявил Чапек в

«endproducts». Благодаря улучшению биохимических методов и усилению молекулярной биологии, было наглядно продемонстрировано, что вторичные продукты играют большую роль в адаптации растений к окружающей среде. Эти молекулы в основном способствуют развитию растений, взаимодействию с экосистемами. Они были описаны как антибиотики, противогрибковые, противовирусные и, возможно, как фитоалексины или аллелопаты. Кроме того, они составляют важные УФ-поглощающие соединения, предотвращая серьезное повреждение листьев от света [8].

Вторичные соединения растений обычно классифицируются в соответствии с их биосинтезом [9]. Обычно принято делить их на три большие группы: фенольные соединения, терпеноиды и стероиды и алкалоиды. Хорошим примером из распространенной группы метаболитов могут служить фенольные соединения: потому что эти молекулы участвуют в синтезе лигнина, который является общим для всех высших растений (рис. 1). Однако другие соединения, такие как алкалоиды, гораздо реже распространены в растительном мире и намного более конкретно к определенным родам и видам растений. Это узкое распределение вторичных соединений составляет основу для хемотаксономии и химической экологии [6].

ВСТАВИТЬ Рис. 1

Растительная клетка отличается рядом уникальных особенностей, поэтому она может служить прекрасным объектом в решении многих проблем общебиологического значения: выяснений первичных процессов роста, дифференциации, взаимодействие между ядром и цитоплазмой, состояние генетической информации, её изменение и временной реализации и т.д. [7, 10]. Культивируемая растительная клетка обладает рядом фундаментальных систем, которые обеспечивают поток энергии, веществ, информации и выполнение других отправных функций. Таким образом, клетка способна преобразовывать энергию и выполнять различные виды работы (химическая, регуляторная, электрическая и др.), осуществлять обмен веществ, лежащий в основе структурообразования и выполнения специфических функций, сохранять, передавать и реализовать генетическую информацию, координирующую поведенческие реакции и фенотипическое проявление. Важнейшей основой решения ряда задач методом культуры тканей является, с одной стороны, возможность временного изменения экспрессии генетической информации клетки при вычленении ее из материнского организма и переносе в иные контролируемые физико-химические условия. С другой стороны, не исключается возможность мутагенного воздействия на клетку некоторыми факторами, в роли которых могут выступать, в частности, отдельные компоненты питательной среды, а также некоторые другие экстремальные условия выращивания.

Важным направлением, которое интенсивно разрабатывается в последние годы с помощью метода культуры тканей, является изучение способности растительной клетки к синтезу различных групп веществ вторичного обмена и управление этими процессами с целью получения нужного количества веществ, которые обладают различными полезными для человека свойствами.

Выражение «вещества вторичного обмена» следует понимать как условное, так как некоторые соединения из этой группы содержатся в растении в большом количестве и определяют специфику их метаболизма. В последнее время термин «вторичные соединения» объединяет вещества, не являющиеся жизненно необходимыми [11].

Многие из веществ вторичного происхождения широко используются в различных отраслях промышленности (таблица 1). В ряде случаев получить эти вещества в больших количествах обычными методами очень трудно. В настоящее время метод культуры тканей с каждым годом всё шире применяется для выращивания тканей растений, которые способны синтезировать наиболее ценные соединения вторичного метаболизма.

Культура клеток и тканей растений обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными технологиями получения лекарственных препаратов растительного происхождения. Основанием для использования культивируемых клеток высших растений в биотехнологии является их способность синтезировать традиционно используемые продукты растительного происхождения, создавать принципиально новые продукты, превосходящие традиционные или открывающие новые области применения, биотрансформировать дешевые предшественники в конечные ценные продукты. Использование клеточных культур высших растений облегчается возможностью использования в определенной степени методов и техники микробиологического производства [7].

Таблица 1. Фармацевтические препараты растительного происхождения, имеющие важное значение [1]**Table 1.** Pharmaceutical preparations of plant origin that are important [1]

Продукт Product	Применение Use	Вид растения Plant species	Цена (дол. США/кг) Cost (US\$ per kilogram)
Аймалицин	Гипотензивное	<i>Cath. roseus</i>	37,000
Артемизинин	Противомалярийное	<i>Artemisia annua</i>	400
Аймалин	-	<i>Ra. serpentina</i>	75.000
Ацинитин	-	<i>Acotinum spp.</i>	-
Берберин	Кишечные недуги	<i>C. japonica</i>	3250
Камптосецин	Противоопухолевое	<i>Camptotheca acuminata</i>	432,000
Капсаицин	Отвлекающее	<i>Ca. frutescens</i>	750
Кастаноспермин	Ингибитор гликозида	<i>Castanospermum australe</i>	-
Кодеин	Успокоительное	<i>P. somniferum</i>	17,000
Колхицин	Противоопухолевое	<i>Colchium autumnale</i>	35,000
Дигоксин	Сердечный стимулятор	<i>Di. lanata</i>	3000
Диосгенин	Стероидный	<i>Dioscorea deltoidea</i>	1000
Элиптицин	Противоопухолевое	<i>Orchrosia elliptica</i>	240,000
Эметин	-	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	1500
Форслолин	Бронхиальная астма	<i>Coleus forskolii</i>	-
Гинзенозиды	Оздоровительный тоник	<i>Panax ginseng</i>	-
Морфин	Успокоительное	<i>P. somniferum</i>	340,000
Подофиллоексин	Противоопухолевое	<i>Podophyllum petalum</i>	-
Хинин	Противомалярийное	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	500
Сангвинарин	Противобляшечный	<i>Sanguinaria Canadensis</i>	4,800
Шиконин	Антибактериальное	<i>L. erythrorhizon</i>	4500
Таксол	Противораковое	<i>Taxus brevifolia</i>	600,000
Винкристин	Антилейкемическое	<i>Cath. roseus</i>	2,000,000
Винбластин	Антилейкемическое	<i>Ctiih. roses</i>	1,000,000

Преимуществами клеточных и тканевых культур по сравнению с традиционным растительным сырьем являются возможность получения продукта независимо от климата, сезона, погоды, почвенных условий, оптимизация и стандартизация условий выращивания, перспективы полной автоматизации и компьютеризации процессов. При этом следует принять во внимание быстрое истощение промышленных запасов сырья дикорастущих растений, а также сложность их перевода на полевое выращивание.

Конкурентоспособность клеточных культур в отношении микроорганизмов определяется широким спектром синтезируемых ими веществ вторичного обмена. К ним можно отнести следующие классы экономически важных соединений: алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пептиды, натуральные красители, стероиды, пряности, инсектициды, витамины и др. [11-13].

Большая вариабельность геномов культивируемых клеток, далеко выходящая за рамки видовой изменчивости исходных растений, позволяет рассматривать культивируемые клетки не только как альтернативное сырье для получения традиционного продукта, но и как системы, способные к синтезу новых химических структур, т.е. как источник принципиально новых продуктов.

Наличие ценных метаболитов в растениях стимулировало интерес со стороны промышленности в области фармацевтики (как источников лекарств), агрохимикатов (природных фунгицидов и инсектицидов), питания, ароматизаторов и красителей, а также косметических средств (природные ароматы и масла). Большая часть рынка таких продуктов получена из растений, произрастающих в дикой природе или выращенных в поле. Основные вопросы в том, что эти растения нуждаются в сезонном периоде роста до уборки урожая. Другие вопросы здесь включают относительно короткий вегетационный период в регионах с умеренным климатом, болезни, вредители и высокие затраты на рабочую силу и оборудование. С другой стороны, полный химический синтез некоторых соединений возможен, но экономически не эффективен. Таким образом, альтернатива для экономически жизнеспособного и экологически устойчивого источника производства желаемых вторичных метаболитов представляет большой интерес. В этой связи культуры

растительных клеток могут быть привлекательной альтернативой как система производства, а также в качестве модельной системы, для изучения регулирования уровня естественного биосинтеза продукта в растениях, с тем чтобы в конечном счете повысить урожайность [14].

Первым примером серьезного использования культуры клеток растений как источника промышленного получения продуктов естественного синтеза является работа Рутге и Никелля, выполненная в 1956 году [11]. Несмотря на всю перспективность этой и аналогичных ей работ, прогресс в последующие десятилетия был невелик. Во многих случаях требуемое вещество или вообще не синтезировалось в культуре, или его выход был весьма незначительным. Стало почти аксиомой, что синтез вторичных продуктов маловероятен, пока в культуре не начнется интенсивное формирование дифференцированных тканей или даже органов. Однако факт регенерации из культур тканей растений, обладающих спектром веществ, качественно и количественно аналогичным исходному растению, показал, что при культивировании тканей способность к синтезу не пропадает, а просто не проявляется [12].

Биотехнология дает возможность эксплуатировать клетки, ткани органа или весь организм *in vitro* и генетически манипулировать ими, чтобы получить желаемые соединения (таблица 2). Поскольку мировое население быстро растет, происходит экстремальное уменьшение пахотных земель для удовлетворения потребностей населения планеты в продовольствии. Таким образом, для других целей, таких как производство фармацевтических препаратов и химических веществ из растений, доступная земля должна использоваться эффективно. Следовательно, целесообразно развивать современные технологии, ведущие к улучшению растений для более эффективного использования земли в соответствии с потребностями [15]. Должна быть отработана стратегия развития методов вегетативного размножения для ряда лекарственных растений. Криоконсервация клеток – важная область в сохранении биоразнообразия лекарственных растений. Разработка новых методов культуры клеток органов растений привела к производству растительных продуктов в больших масштабах. Это стало возможным благодаря объединению усилий клеточных биологов и инженеров-химиков. Кроме того, потребность в более безопасных лекарствах, без побочных эффектов, привела к большему использованию натуральных ингредиентов с доказанной безопасностью [6].

За некоторыми исключениями суспензионные и каллусные культуры клеток синтезируют специфические вторичные метаболиты в гораздо меньших количествах, чем целое растение, и часто эти продукты отличаются по структуре или содержатся в иных пропорциях, чем в растениях [12]. Хотя принятая оценка выхода продуктов, синтезируемых самими растениями в культурах клеток, удобна для сравнения, она весьма относительна, поскольку объемы синтеза обычно определяют в тех частях растений, в которых накапливается наибольшее количество этих продуктов и откуда их обычно извлекают, например, морфиновые алкалоиды из головок опийного мака. Если выход продукта усреднить на всё растение, то результат, естественно, получится гораздо ниже. Таким образом, оценивая выход продукта, необходимо учитывать это обстоятельство. За последние несколько лет число исследований о синтезе значительных количеств, специфических и необходимых вторичных соединений, в культуре постоянно возрастает. Кроме того, резко расширился круг веществ, получаемых в культуре всех типов. Следует отметить, во-первых, круг соединений, синтезируемых в культурах, свидетельствует об огромном синтетическом потенциале и разнообразии вторичного метаболизма в мире растений; во-вторых, относительно небольшое число их пригодно для использования в промышленности [11, 12].

ВСТАВИТЬ Таблицу 2

Особый интерес стали проявлять к суспензионным культурам, способным синтезировать специфические продукты в количествах, эквивалентных или превышающих содержание в исходных растениях, что очень важно для развития и повышения эффективности технологического процесса. В суспензии клеток гораздо легче повысить синтез с помощью метаболической инженерии, поскольку по сравнению с культивированием более организованных систем тканей это требует относительно простых биореакторов. Это, конечно, не означает, что для тканевых систем невозможно разработать широкомасштабные технологии. На самом деле, чем разнообразнее технологические процессы, осуществляемые при культивировании клеток и тканей растений, тем легче разработать промышленную технологию.

Хотя в настоящее время для значительного числа объектов удастся разредить два процесса: синтез вторичных метаболитов и морфологическое развитие, это вовсе не означает, что продуцирующие клетки в суспензионной культуре совсем не дифференцированы. Результаты исследования с суспензиями клеток *Papaver somniferum* [16] свидетельствуют о том, что максимальной продуктивности по опиатовым алкалоидам культура достигает тогда, когда в ней присутствует большое число специализированных клеток-млечников. Аналогичные данные получены и другими исследователями. Однако это не всегда так. Быстрорастущие суспензионные культуры клеток *Catarantus roseus* с высоким содержанием алкалоидов дифференцированы слабо. Такая же ситуация наблюдается и в некоторых других культурах, включая и клетки табака, синтезирующие большое количество никотина, а также клетки моркови, содержащие антоцианин [11].

В связи с приведенными выше данными по культуре *C. roseus* возникает следующий вопрос: во многих системах вторичные метаболиты накапливаются в значительных количествах лишь на стадии позднего экспоненциального роста или на стационарной фазе выращивания культуры. Ярким примером в данном случае является накопление фенольных соединений в культуре *Acer pseudoplatanus* [17]. Однако, по данным других исследований, проведенных с культурами *C. roseus*, в некоторых случаях синтез продукта сопутствует росту [11]. При этом синтез серпентина, одного из алкалоидов катарантуса, происходит параллельно росту культуры, определяемому по увеличению сырой массы.

Синтез больших количеств природных веществ клетками, культивируемыми в крупных емкостях, по-видимому – наиболее рациональный подход. В большинстве случаев накопление природного продукта происходит ближе к концу фазы логарифмического роста, когда деление и рост клеток замедляется. Слово «накопление» использовано намеренно; измерение природного продукта в массе клеток даёт мало информации о синтетическом потенциале клетки в определённое время и ещё меньше о степенях распада или скоростях кругооборота. Другими словами, истинная синтетическая способность клеток в определённые моменты цикла может быть гораздо выше, чем количество накопленного продукта, наблюдаемое в любой момент роста культуры. В клеточной популяции одни клетки синтезируют гораздо большее количество требуемых веществ, чем другие. В ряде случаев удалось изолировать клоны и получать линии клеток, обладающие повышенной биосинтетической способностью, по-видимому, стабильные. Кроме этого, имеется возможность использования мутагенов для получения высокопродуктивных линий, а также использования дешёвых предшественников для повышения выхода конечного продукта. В последние годы наблюдается большой прогресс в исследованиях по иммобилизации клеток растений на разные носители, включая агарозу, крахмал, полиакриламид, пенополиуретан и др. В ряде случаев было показано, что синтез продукта не только продолжался, но на первых этапах даже увеличился.

Несомненно, что мир растений, как источник различных соединений, обладает большим потенциалом. Трудней определить, в какой степени биотехнология растений заменит природный источник. За последние годы во многих областях биотехнологии клеток растений с прикладной ориентацией произошли значительные изменения. Это увеличение выхода продукта, улучшение методов отбора линий и их проверки, увеличение масштаба систем наращивания биомассы в новых типах ферментеров, а также успешное применение метода иммобилизации клеток и родственных технологий, правда, ещё в незначительных объёмах. Ключевой проблемой остаётся выход продукта, и несомненно, что двух-трехкратное увеличение выхода некоторых продуктов было бы экономически важным. Учитывая успехи, достигнутые за последние годы, такое увеличение синтеза конечного продукта кажется возможным.

НЕОБХОДИМОСТЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Культуры растительных клеток являются привлекательным альтернативным источником для производства ценных вторичных метаболитов, в отличие от целого растения (таблица 3) [1]. Растительные клетки являются биосинтетически тотипотентными, что означает: каждая клетка в культуре сохраняет полную генетическую информацию и, следовательно, имеет возможность производить весь диапазон химических веществ, обнаруженных в родительском растении. Преимущества этой технологии по сравнению с традиционным сельскохозяйственным производством следующие:

- не зависит от географических, сезонных колебаний и различных экологических факторов;
- производственная система обеспечивает непрерывную выдачу продукции, однородное качество и урожайность;
- возможность производить новые соединения, которые обычно не встречаются в родительских растениях;
- не зависит от политического вмешательства;
- быстрота производства;
- возможность биотрансформации для производства новых соединений из дешёвых предшественников.

ВСТАВИТЬ Таблицу 3

В основном первичный метаболит является результатом процессов, поддерживающих жизнедеятельность и рост клеток, и последовательно накапливается с увеличением сухой биомассы клеток. В противоположность этому вторичный метаболит не является жизненно необходимым продуктом и накопление этих соединений обычно происходит на более поздних стадиях [12]. Поэтому условия культивирования, способствующие быстрому росту, в редких случаях благоприятно сказываются на биосинтезе вторичных соединений. Следовательно, для получения необходимого продукта при

выращивании культур тканей и клеток растений необходимо стремиться к достижению оптимальных условий как для накопления биомассы, так и для биосинтеза и накопления вторичных соединений, т.е. необходимо достичь точного баланса между биомассой, образующейся в достаточном количестве, и выходом вторичного продукта, предотвращая его падение. В случае, когда накопление продуктов вторичного синтеза сопутствует увеличению биомассы, ключевой проблемой является достижение того, чтобы субстрат вносил как можно больший вклад в выход требуемого вещества относительно биомассы.

В последние годы достигнуты значительные успехи в наших представлениях о культуре тканей и клеток, а также в приготовлении и подборе ингредиентов среды культивирования. В основном эксперименты проводят по двум направлениям: первое – влияние состава среды и условий культивирования на формирование биомассы; второе – влияние состава среды и условий культивирования на синтез и накопление вторичных соединений. Кроме того, факторы, влияющие на культивируемые ткани и клетки, можно разделить на две группы: первая – факторы внешней среды, куда относится свет, температура, состав газовой фазы и др.; вторая – это состав питательной среды (макро- и микроэлементы, гормоны и др.), pH среды, предшественники. Многочисленные данные, имеющиеся в литературе, указывают на важную роль условий выращивания на рост культивируемых тканей [18, 19].

Одним из таких факторов является свет. Влияние света на рост культивируемых тканей изучено более досконально, чем действие других факторов. В основном свет оказывает стимулирующее влияние на рост культур клеток и тканей и на накопление в них вторичных соединений [20]. Хотя в литературе имеются данные противоположного характера. Так, в частности, свет подавлял образование алкалоидов у *Scopolia parviflora* [21] и никотина в каллусных тканях *Nicotiana tabacum* при высокой интенсивности [22]. Кроме того, имеются данные об отсутствии значительного влияния света на накопление вторичных метаболитов [23]. Наибольшее влияние свет оказывает на ростовые процессы в фототрофных культурах [24]. Кроме того, по всей видимости, свет может оказывать активирующее действие на ряд процессов или ферментов, участвующих в этих процессах прямым воздействием, или же опосредовано. Влияние света на синтез и накопление вторичных соединений также многообразно. Здесь также возможна прямая активация ряда ферментов, участвующих в биосинтезе вторичных соединений, или опосредованное влияние через фитохромную систему [18].

Что же касается других факторов внешней среды (температура, парциальное давление газов и их отношение в газовой фазе и др.), то их влияние на процессы роста и накопления вторичных соединений ещё слабо изучено. Сведения о температурном оптимуме для роста культур клеток, не говоря уже об образовании вторичных соединений в этих культурах, весьма ограничено. Это, вероятно, определяется традиционным подходом, когда исследование *in vitro* проводили при температуре около 25°C [12].

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Состав питательной среды является важнейшим средством оптимизации условий культивирования клеток и тканей высших растений. Несмотря на многочисленные попытки обоснования состава сред с позиции физиологии и биохимии, подбор оптимальной среды для каждого конкретного случая осуществляется с помощью эксперимента, направленного как на определение основных компонентов среды, так и на поиск их оптимального соотношения. За последние годы накоплен довольно большой опыт применения математических методов планирования эксперимента для подбора оптимального состава сред. Методы математического планирования позволяют в значительной степени сократить количество опытов и вариантов в экспериментах, что позволяет в значительной степени экономить время и материальные ресурсы. К настоящему времени имеется довольно большое количество методов математического планирования экспериментов по оптимизации состава питательной среды. В основной своей массе эти методы ранее были разработаны применительно к микробиологическому синтезу.

В последние годы появились работы о получении фотоавтотрофных культур, в принципе солнечную энергию можно рассматривать как альтернативный источник энергии взамен экзогенных углеводов. Использование фототрофных культур позволило бы в значительной степени снизить себестоимость конечного продукта. Более того, в ряде работ была показана зависимость накопления вторичных метаболитов от функционирования фотосинтетического аппарата и активности процессов фотосинтеза [24]. Кроме того, фотосинтезирующие культуры являются прекрасными модельными системами для изучения не только путей биосинтеза вторичных соединений, но также для изучения физиологических и биохимических механизмов первичного обмена, регуляции и экспрессии генома высших растений, процессов фотосинтеза и влияния различных стрессовых факторов и патогенов.

Фототрофные культуры широко используются как модельные системы для изучения различных механизмов и процессов, происходящих в клетке, хотя история получения этих культур совсем небольшая [25]. Способность культуры тканей растений к синтезу хлорофилла впервые отметил Готре в 1936 г. [26]. Эксперименты, проведённые Летчем и Стетлером в 1965 г. [27], а также работы других исследователей показали способность каллусных культур к фиксации CO₂. После получения впервые в 1967 г. Бергманом [28] фотоавтотрофной клеточной культуры *N. tabacum* исследования по этой проблеме привлекли большой интерес. Хотя изучение хлорофиллсодержащих культур представляет большой интерес и возможность синтеза хлорофилла культивируемых тканей была еще указана Готре [26], но лишь в середине 60-х годов

изучение фотосинтезирующих тканей высших растений начало усиленно развиваться. Хотя уже разработаны методы получения фотоавтотрофных культур для довольно большого числа видов растений, однако получение таких культур до сих пор является очень трудной задачей. К настоящему времени уже разработаны общие принципы получения фототрофных культур: уменьшение содержания сахарозы в среде, постоянное или периодическое освещение светом большой интенсивности, увеличение концентрации CO_2 , а также постепенная физиологическая адаптация культуры и селекция на фототрофность.

Многочисленные попытки получения фотоавтотрофных культур простым исключением сахарозы из питательной среды были безуспешны. При получении клеток, растущих фотоавтотрофно, необходимо постепенно изменять условия культивирования. Т.е. необходимо вместо углеводов давать CO_2 – как источник углерода и т.д. Другие факторы также могут оказывать влияние на развитие фототрофных свойств культивируемых клеток. Показано, что зеленение клеток и фотосинтетическая способность могут значительно различаться у эксплантов различного происхождения [16] в зависимости от источника углеводов [24, 29], от режима ростовых регуляторов [30], особенно кинетина, а также от взаимодействия этих факторов [31, 32]. Также необходимо проводить отбор клеток, обладающих наибольшей фотосинтетической активностью. Даже используя все эти рекомендации, не всегда удается получать фотоавтотрофные культуры [25, 33]. Было показано, что высокие уровни содержания углеводов, которые присутствуют в клетках и тканях, подавляют развитие хлоропластов и фотосинтетическую способность [27]. Хотя механизм такого действия ещё не выяснен, предполагается несколько возможных его вариантов. При получении фотоавтотрофных культур обычно постепенно уменьшают концентрацию углевода в среде, иногда их заменяют на менее усваиваемые углеводы, особенно в суспензионных культурах, во избежание осмотического шока. В связи с этим, возможно, более удобными являются фотогетеротрофные культуры, получение которых обычно является более легким процессом, и в то же время в ряде случаев такие культуры не уступают по фотосинтетической активности фотоавтотрофным культурам, а по скорости роста превосходят их.

Хотя получение фототрофных культур является достаточно трудной задачей, однако эта проблема привлекает всё большее внимание ученых в последние годы. Фототрофные культуры являются очень удобными и ценными объектами для научных исследований. Поэтому остро стоит вопрос о получении фототрофных культур, способных расти в промышленных ферментерах, изучении их особенностей и подбора условий для оптимального роста, особенно тех, которые способны в значительных количествах накапливать ценные вторичные соединения. В этом случае использование фототрофных культур дало бы несомненный экономический эффект, так как из среды исключается сахароза – наиболее ценный компонент, а источником углерода становится углекислый газ из воздуха. Особенно ценно использование фототрофных культур в тех случаях, когда синтез вторичных соединений положительно коррелирует с фотосинтетическими процессами, происходящими в клетках.

Этилен также оказывает очень разнообразное действие на культивируемые ткани растений, в том числе и потерю пигментации некоторыми зелёными тканями. Но в основном он ингибирует рост тканей и вызывает процессы старения. Влияние остальных факторов на культивируемые ткани и клетки растений почти не изучено.

Не менее важным при выращивании клеток и тканей растений являются так называемые внутренние факторы культивирования (компоненты среды, pH среды, плотность агара и др.). Оптимальный рост культур и клеток растений обычно происходит при начальных pH от 5 до 6. Однако при длительном культивировании сдвиги pH могут быть более значительными. Наибольшее влияние из всех факторов оказывают компоненты среды (макро- и микроэлементы, витамины, гормоны и др.).

В последние годы достигнуты значительные успехи в приготовлении и подборе ингредиентов среды культивирования. Природа и количество углеводов – первостепенный вопрос для производства клеточной биомассы. Имеется несколько сообщений об успешном фотоавтотрофном выращивании культур, но даже в этих случаях скорость роста была в основном низкой по сравнению с гетеротрофными, а тем более фотогетеротрофными культурами. Большинство культур растёт гетеротрофно, обычно используя в качестве источника углерода сахарозу, и в последние годы рядом авторов были изучены различные источники углерода по их способности поддерживать рост и синтез желаемых соединений. Это самые разнообразные соединения от глюкозы, фруктозы, галактозы и родственных моно- и дисахаридов до сложных неочищенных веществ типа черной патоки, молочной сыворотки, а также картофельного крахмала и крахмала из злаков. Также имеются данные, что концентрация углеводов может оказывать непосредственное влияние на выход вторичных соединений в культурах клеток. Исходно повышенные концентрации углеводов обычно приводят не только к увеличению скорости роста, но и к увеличению выхода вторичных метаболитов в некоторых культивируемых клетках и тканях.

В культуре клеток *Morinda citrifolia* из 14 исследуемых углеводов сахароза давала наибольший выход антрахинонов [34]. Однако образование соласодина полностью подавлялось при культивировании *Solanum aviculare* на средах с сахарозой и при самых высоких концентрациях глюкозы, а накопление стероидов в этой культуре почти не зависело от концентрации сахарозы в среде. В настоящее время сведения по действию углеводов на первичный метаболизм (не говоря уже о вторичном) в культуре клеток и тканей весьма ограничены. Изучение этих вопросов является весьма актуальной проблемой.

На сегодняшний день наиболее изучен вопрос о влиянии различных регуляторов роста растений на

синтез вторичных соединений и прирост биомассы. Варьируя концентрациями или набором гормональных веществ, часто можно оказывать значительное влияние на процесс синтеза и на скорость роста культур. За исключением привыкших и онкогенных культур, для роста и деления клеток культивируемых растений необходимо внесение в среду регуляторов роста. С другой стороны, снижая концентрации гормонов, добавляя менее активные ростовые вещества или же изменяя соотношение этих веществ, можно индуцировать рост через дифференцировку или морфогенез. В связи с тем, что образование вторичных соединений в культурах клеток растений зависит как от роста, так и от деления клеток, регуляторы роста играют важную роль в определении потенциальной продуктивности данной культуры. В литературе описано большое число примеров таких типов действия регуляторов роста на вторичный метаболизм [35]. Ростовые вещества оказывают наиболее сильное влияние на рост клеточных и тканевых культур и на синтез продуктов вторичного метаболизма из всех компонентов среды и являются эффективными пусковыми механизмами вторичного метаболизма.

В культурах клеток растений как состав, так и количества ауксинов, изначально присутствующих в среде или добавленных в процессе роста культуры, оказывают заметное влияние на первичный и вторичный метаболизм. В исключительных случаях тип гормонов и его концентрации оказывают слабое влияние или вовсе не влияют на выход вторичного метаболита. Считается, что 2,4-Д – наименее приемлемый ауксин для запуска вторичного метаболизма в культурах клеток растений, чем, например, ИУК или НУК. Несмотря на это, 2,4-Д очень широко применяется при культивировании клеток растений, с целью получения ценных химических соединений. В целом, уменьшение ауксинов приводит к увеличению выхода вторичных соединений [36, 37]. Есть лишь единичные данные об увеличении количества метаболитов при возрастании содержания ауксинов, например, в культурах клеток моркови максимум содержания каротиноидов и убихинонов индуцировался относительно высоким уровнем 2,4-Д [23].

Цитокинины по-разному влияют на процессы роста и накопления вторичных соединений. В каллусных тканях *Datura tatula* кинетин не оказывал заметного влияния на рост, а при высоких концентрациях подавлял образование алкалоидов. В культурах клеток относительно высокая концентрация кинетина вызывает образование алкалоидов [12]. По данным Шийо и Охта, в каллусных и суспензионных культурах *Nicotiana tabacum* кинетин в концентрации свыше 10^{-5} М полностью подавлял образование никотина [38].

В большинстве случаев ауксины вносят в среду культивирования совместно с цитокининами. Необходимо отметить, что совместное действие ауксинов и цитокининов на рост и образование вторичных соединений затруднено для оценки, особенно в связи с отсутствием данных по относительному содержанию этих регуляторов роста внутри культивируемых клеток. Однако не вызывает сомнения то, что одни комбинации фитогормонов могут оказаться эффективнее других. Влияние таких регуляторов роста, как гибберелловая кислота, абсцизовая кислота, этилен и другие на рост и процессы вторичного метаболизма в культурах клеток изучено очень слабо.

Несомненно, что макро- и микроэлементы питательной среды оказывают большое влияние не только на рост культивируемых клеток, но и накопление в них вторичных соединений. Однако их влияние на культивируемые клетки и ткани растений, особенно на вторичный метаболизм, изучен не достаточно. Повышенное содержание нитратов, калия, фосфора, аммония обычно приводит к поддержанию быстрого роста клеток, тогда как истощение или отсутствие некоторых из них становится фактором, лимитирующим рост и сопутствующим вторичному метаболизму. Однако имеются данные, что повышенные концентрации азота или фосфора в среде подавляют рост и накопление вторичных соединений в культуре. Недостаток фосфора в большей степени, чем других питательных веществ, стимулирует синтез вторичных метаболитов, однако в некоторых случаях вызывает некроз [39]. Примерно такое же влияние могут оказывать и все остальные компоненты среды.

Поэтому проблема подбора, концентрации и соотношения ингредиентов питательной среды для успешного роста культур клеток и тканей и изучение их влияния на рост и накопление вторичных соединений является наиболее острой на сегодняшний день. Эта проблема возникла с появлением культуры клеток и тканей, как отдельной отрасли биологической науки, и полностью не решена до настоящего времени. Сложность проблемы заключается в том, что для каждой культуры необходимо подобрать оптимальные условия, учитывая при этом влияние большого количества факторов. Простым подбором или перебором компонентов эту задачу не решить. Наиболее приемлемым инструментом здесь может быть метод математического планирования экспериментов, который значительно облегчает работу, сберегая время и материальные ресурсы. К настоящему времени разработано достаточное количество методик для оптимизации питательной среды для микроорганизмов, которые также можно использовать как для оптимизации роста культивируемых клеток растений, так и для оптимизации накопления в них вторичных соединений [40].

Для каждой культуры необходимо подобрать свои, наиболее оптимальные условия выращивания (физические факторы, питание, гормональный баланс и др.). Однозначно оценить влияние каждого фактора почти невозможно, да и не нужно. Необходимо выбрать наилучшее их сочетание. Особенно трудно это сделать с компонентами среды из-за их многочисленности и функциональной взаимозависимости. Например, никотин (при концентрациях 50 мг/л) вызывает образование корней в каллусных культурах *Nicotiana rustica*, хотя этот морфогенетический стимул снимается при определенном соотношении ауксинов и цитокининов [23]. Такие примеры не единичны.

Работа по оптимизации питательной среды должна идти в направлении создания наиболее благоприятной микросреды, окружающей клетку, подобную той, в которой находятся клетки, синтезирующие конечный продукт в целых растениях. Это, возможно, приведёт к увеличению выхода вторичных соединений, а также к подбору таких условий, которые бы увеличили скорость роста культивируемых тканей и клеток, что позволило бы существенно сократить ростовой цикл и значительно удешевило бы себестоимость конечного продукта. В настоящее время главным препятствием для широкомасштабного использования клеточных и тканевых культур для получения вторичных метаболитов является себестоимость целевого продукта. Для преодоления этих трудностей к настоящему времени разработан ряд мер, позволяющих в значительной степени удешевить продукты, получаемые биотехнологическим путём. Оптимизация является одним из наиболее удобных инструментов при решении этой задачи. Кроме того, возможны и другие способы: например, использование различных приемов (клеточная и тканевая селекция, клонирование, генно-инженерные манипуляции, использование химических и физических мутагенов и др.) для повышения выхода вторичных соединений в клеточных культурах. В то же время нельзя забывать и такой способ удешевления, как использование дешевых компонентов питательной среды типа крахмала, мелассы и др.

Таким образом, суммируя всё вышесказанное, можно сделать вывод, что для каждой культуры необходимо подобрать свои наиболее благоприятные условия выращивания и состав компонентов питательной среды. Т.е. проведение оптимизации условий выращивания является необходимым этапом исследований.

Наиболее доступным является простой перебор сочетания факторов. Такой метод очень надёжный, так как охватывает всё возможное разнообразие условий осуществления процесса. Однако требуемое для его осуществления число опытов весьма велико, что и исключает практическое использование этого метода в большинстве случаев. Однако в некоторых случаях, когда используется 1-2 фактора, этот метод может быть применим. Более совершенными и соответственно более сложными являются следующие методы: раздельная оптимизация каждого фактора при постоянном фоне, метод Гауса-Зейделя, метод Хука-Дживса, метод Пауэлла, метод Розенброка, симплекс-метод, метод Бокса-Уилсона, метод движения по градиенту и др. [14]

Рост и развитие клеточных культур в отличие от растений полностью зависят от условий культивирования. Для получения быстрорастущих тканевых культур необходимо проведение подбора наиболее оптимальных условий. В литературе имеются многочисленные данные, показывающие зависимость роста и накопления вторичных продуктов от трофических и гормональных факторов, а также от условий выращивания: pH среды, температуры, освещённости, парциального давления газов и других [7, 12].

СТРАТЕГИИ ПО УВЕЛИЧЕНИЮ ПРОИЗВОДСТВА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

В течение последнего десятилетия достигнут значительный прогресс при стимулировании образования и накопления вторичных метаболитов с использованием культур клеток растений, принятые стратегии для повышения вторичных метаболитов культур клеток растений были описаны подробно [1, 6, 14].

Есть целый ряд культур растительных клеток, производящих большее количество вторичного метаболита, чем у интактных растений (таблица 4). Тем не менее, все еще существуют проблемы в производстве вторичных метаболитов на клеточных культурах в результате нестабильности клеточных линий, низкого выхода продукта, медленного роста и проблем масштабирования [41]. Большой успех достигнут в производстве вторичных метаболитов с высокой добавленной стоимостью, таких как шиконин из клеточных культур *Lithospermum erythrorhizon*, берберин из *Coptis japonica* и сангвинарин из *Papaver somniferum*. Они производятся на промышленном уровне [1].

ВСТАВИТЬ Таблицу 4

В рамках такой стратегии основные усилия были посвящены развитию культур, полученных их элитной зародышевой плазмы. Это достигнуто путем отбора/скрининга зародышевой плазмы высокопродуктивных клеточных линий, как, например, в производстве таксола из клеточных культур *Taxus* [42]. С другой стороны, некоторые ограничивающие факторы могут играть решающую роль для успешного использования культур клеток растений в биотехнологии. Эти ограничивающие факторы могут включать качество и интенсивность света, температуру, длину периода культивирования, в том числе кинетику производства, концентрацию и источник основных лимитирующих питательных веществ, таких как фосфат, углерод и азот; и концентрацию и источники микроэлементов, витаминов и регуляторов роста растений [14].

Другой момент касается оптимизации условий культивирования клеток. Оптимизация осуществляется

по целому ряду компонентов состава среды и условий окружающей среды. Поскольку производство вторичных метаболитов можно проследить с помощью современных экспресс-методов, то отбирается среда, которая поддерживает хороший рост клеток и высокий выход вторичных метаболитов.

Скрининг клеточных культур на высокую производительность метаболита осуществляется на нескольких уровнях. В некоторых случаях высокопродуктивные клеточные клоны получают из одиночных клеток и затем используются для скрининга высокопродуктивных штаммов. Для быстрого отбора высокопродуктивных клеток применимы некоторые простые методы. Очень полезным может оказаться метод проточной цитометрии. Этот метод основан на том, что клетки содержат флуоресцентные продукты (например, тиофены) и, следовательно, можно разделить эти (отмеченные) клетки от других. Тем не менее, могут возникнуть некоторые проблемы со стабильностью клеточной линии, особенно в результате дифференцировки клеток или морфогенеза.

Поэтому проблема устойчивости клеточных линий в том, что они трудно развиваются в программах скрининга, оставляя данный вопрос на последний этап перед промышленным применением [43]. Флуоресцентные белки из широкого круга морских организмов начали революцию в изучении поведения клеток путем предоставления удобных маркеров для экспрессии гена и таргетирования белка в живой клетке и организме. Наиболее широко используемым из этих флуоресцентных белков является *зеленый флуоресцентный белок (GFP)*, впервые выделенный из медузы *Aequorea victoria*, может быть прикреплен практически к любому интересующему исследователя белку. Все чаще используются флуоресцентные белки, как неинвазивные маркеры в живой клетке, из-за их способности быть генетически слитым с белками, представляющими интерес для исследований места локализации, транспортировки и динамики. Мартин Чалфи, Осаму Симомура и Роджер У. Тсиен разделили Нобелевскую премию по химии за 2008 г. за открытие и развитие молекулярного зонда с использованием зеленого флуоресцентного белка. На сегодняшний день многие растительные клетки, а также другие организмы, отобраны с использованием GFP в качестве маркера для экспрессии генов.

С другой стороны, для высокопродуктивного отбора клеточных линий также может применяться культивирование клеток на среде, содержащей определенные добавки, такие как биосинтетические предшественники или токсичные аналоги [44]. Таким образом, невозможно использовать универсальную скрининговую платформу для культур клеток растений. Вместо этого должен быть использован специфический скрининг для конкретной культуры клеток растений, чтобы производить желаемые метаболиты (рис. 2).

Основной критерий успеха биотехнологии в будущем заключается в возможности биосинтеза необходимых метаболитов на крупных клеточных промышленных ферментерах. Хорошо известно, что биосинтез вторичных метаболитов растений может стимулироваться или подавляться биотическими и абиотическими факторами. Для того, чтобы изучить пути регуляции метаболизма растений, важно выявить факторы, которые контролируют накопление вторичных метаболитов в растениях. Таким образом, в настоящее время ученые проводят интенсивные исследования для выявления и применения факторов, которые могут в конечном счете увеличить биосинтетический потенциал растительных клеток. В таких исследованиях внимание должно быть приковано к накоплению и хранению желаемых вторичных метаболитов в растительных клетках. Вторичные метаболиты растений в тканевых культурах обычно хранятся внутри клеток, как, например, в вакуолях или межклеточных полостях. Таким образом, транспортировка играет важную роль в синтезе и хранении вторичных метаболитов [45].

ВСТАВИТЬ Рис. 2

В дополнение к описанной выше стратегии были успешно использованы новые подходы, основанные на генетической и метаболической инженерии [43]. Следовательно, развитие информационной базы на генетическом, клеточном и молекулярном уровнях в настоящее время является необходимым условием для использования растений или культур растительных клеток для биотехнологических процессов по следующим причинам. Во-первых, более глубокое понимание основных метаболических процессов может обеспечить ключевую информацию, необходимую для производства метаболитов с высокой добавленной стоимостью. Во-вторых, многие пути биосинтеза в растениях обширны и сложны, что требует нескольких ферментативных этапов для получения желаемого конечного продукта. Так, при проектировании вторичного метаболизма в клетках растений основная цель должна заключаться в повышении содержания желаемых вторичных соединений и понижении уровня нежелательных соединений и, наконец, внедрение синтеза новой продукции в конкретных растениях. Эти исследования должны сосредоточиться на регуляции метаболизма по установлению уровней промежуточных соединений и ферментов, которые катализируют синтез вторичных метаболитов (профилирование метаболических путей). Следующий шаг – это выбор цели для дальнейших исследований на уровне генов, ферментов и компартментов. Такие исследования по регулированию биосинтеза метаболита в конечном итоге может привести к получению трансгенных растений или культур клеток растений с улучшенной производительностью желаемых соединений. Помимо

практического применения, такие организмы и полученные знания будут представлять интерес в связи с исследованиями на адаптивные/функциональные роли вторичного метаболизма в растениях [14].

После выбора наиболее перспективных отдельных растений начинается работа по инициации каллусной культуры *in vitro*. Эта работа состоит в основном в определении среды, которая будет лучше всего приспособлена для культивирования. Это оптимизация среды по минеральному составу и органическим компонентам с особым вниманием к гормональным препаратам, которые регулируют механизмы дедифференциации/дифференциации. Проводимая в значительной степени эмпирически, эта работа в настоящее время облегчается за счет использования неполных факторных экспериментов или методов поверхности отклика и других методов математического моделирования процессов.

Известно, что полученные каллусы могут подвергаться соматональной изменчивости [46], как правило, во время нескольких циклов субкультивирования. Это очень важный период, когда выход вторичного метаболита часто меняется от одного цикла субкультивирования к другому. После определенного периода времени (от несколько недель до несколько лет) наступает генетическая стабильность и каждый каллус можно рассматривать как совокупность однородных клеток, как будто они получены из одной клонированной клетки. Имеется несколько работ, описывающих производство вторичных метаболитов недифференцированными клеточными культурами, которые были проведены из нестабилизированных клеточных линий. Этот аргумент, как правило, редко обсуждается в литературе, из-за нехватки маркеров для оценки состояния генетической стабильности культуры. В недавней работе, проведенной в лаборатории Боукье, было решено, что клеточная линия не может рассматриваться как стабильная, пока параметры роста не повторятся в течение трех последовательных стабильных циклов субкультивирования [6]. Ясно, что это условие необходимое, но недостаточное, чтобы сделать заключение о существовании генетической стабильности. Учитывая, что рост носит полигенный характер, считается, что это «лучше, чем ничего» для оценки конца беспорядочных явлений. Результаты показали, что все большее число из 217 каллусных линий имели стабильные параметры роста с течением времени [47]. В этих экспериментах 90% коллекций имели «стабильный рост» после 16 циклов субкультивирования (48 недель). Очень немногие авторы указывают время, необходимое для стабилизации клеточных культур.

Поскольку синтез вторичных метаболитов, как правило, выше в дифференцированных тканях, появляются попытки культивировать культуры побегов и корней для производства важных лекарственных соединений. Эти культуры органов относительно более стабильны. Культуры корней высших растений обычно имеют более медленный рост, и в них трудней собирать продукцию. Таким образом, должны быть найдены альтернативные методы для получения соединений из культуры корней. До сих пор нет никаких коммерческих процессов, использующих культуру корней для получения вторичных соединений, за исключением нескольких случаев использования системы культуры волосатых корней [1].

В последнее время трансгенные растения считаются экономически конкурентоспособным производством для получения различных чужеродных белков. К ним относятся рекомбинантные антитела, фрагменты антител, инвертазы и терапевтические белки, такие как человеческий интерлейкин (IL)-2, рицин и анти трипсина. Наиболее часто используемым растением для синтеза таких белков в суспензионных культурах является табак, хотя суспензионные культуры клеток риса были также использованы. Экспрессия этих гетерологичных белков в растениях имеет преимущество перед их экспрессией в микробной системе при получении полнометражных антител [48].

Тот факт, что полученные из растений антитела были одобрены для клинических испытаний, является обнадеживающим событием. Тем не менее, исследования крупномасштабного производства антител на заводах должны осуществляться путем разработки системы, с помощью легкой и эффективной последовательной переработки и крупномасштабного культивирования трансгенных растений в контролируемых условиях. Хранение антител в течение длительного времени может быть возможным при их экспрессировании в семенах [49].

Для увеличения выхода вторичных метаболитов в культивируемых клетках растений также применяются различные технологии, включая иммобилизацию, генетическую трансформацию, индуцированный мутагенез, культуру органов (бородатые корни и другие технологии и методы), которые не освещены полностью в данном обзоре.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

Предполагается, что использование культуры клеток растений для получения фармацевтически важных соединений могут промышленно использоваться только при сверхпроизводстве метаболитов или производстве новых соединений. Это не реализуется путем рутинного отбора клеточной линии или развития других показателей (рост/продукция). Таким образом, существует необходимость в изучении метаболических путей по его регуляции для избыточной экспрессии регуляторных генов лимитирующих этапов. Недавний прогресс в культуре клеток и тканей растений и генетическая трансформация с помощью *Agrobacterium* или прямой передачи гена делает возможным включение чужеродных генов в новые растения, с передачей желательных признаков генотипам. Таким образом, генетически модифицированные или просто модифицированные растения могут быть использованы как «зеленые биореакторы» для производства химических веществ с добавленной стоимостью.

Прогресс в генетических манипуляциях во многом зависит от:

- а) возможности полученных генов, кодирующих желательные признаки;
- б) надлежащего выравнивания экспрессируемого гена с его эндогенной подложкой и компартиментацией/транспортировкой своей продукции;
- в) успешной трансформации и воспроизводимой регенерации трансгенных растений;
- г) надлежащего сайта интеграции гена в сочетании с уровнем и паттерны экспрессии гена;
- е) оценки изменений метаболических путей [1].

Последние 15 лет дали большое количество результатов, касающихся биосинтетических путей, ведущих к получению вторичных метаболитов. Одновременно в начале 1990-х годов появилась новая дисциплина, называемая метаболической инженерией. Согласно Бейли [50], метаболической инженерией является: «улучшение клеточной активности, манипулирование ферментативными, транспортными и регуляторными функциями клетки с использованием технологии рекомбинантной ДНК». Во многих случаях этот подход опирается на выявление ограничения активности ферментов, для успешного синтеза метаболитов (метабономика). Такие шаги могут быть предприняты с целью лучшего использования генетической трансформации. Большинство стратегий, разработанных до сих пор, рассчитывали на введение генов, выделенных из более эффективных организмов, промоторы которых усиливают экспрессию генамишени, для придания растениям улучшенных признаков. Кроме собственных биосинтетических путей, растения также могут быть использованы в качестве организмов-хозяев для производства рекомбинантных белков. Это относится к так называемому «*Молекулярному фармингу*», когда технология использует выращенные в поле трансгенные растения.

Метаболическая инженерия растений рассматривает клетку как фабрику и добавляет или оптимизирует виды и количества метаболитов в клетке для какой-то конкретной цели. Другими словами, метаболическая инженерия это выяснение метаболического пути в растениях или бактериальных организмах с целью распознавания и использование этого пути для будущих модификаций конечных продуктов растений. Как правило, для перенаправления ферментативных реакций таким образом, чтобы улучшить производство дорогостоящих составляющих, для получения новых соединений в организме, в качестве посредника деградации токсичных соединений в окружающей среде или создания растений, устойчивых к факторам экологического стресса. Кроме того, метаболическая инженерия включает не только манипулирование эндогенных метаболических путей, но также передачу метаболических путей в новые организмы.

Основными целями метаболической инженерии в промышленности или сельском хозяйстве является стимуляция производства вторичных метаболитов, биосинтетических предшественников, полимеров, которые имеют растительное происхождение, и вывод новых растительных организмов, устойчивых к высокому содержанию соли или засухе. Не удивительно, что метаболические инженерные приложения в биотехнологии растений в последние годы достигли невероятных высот в сельском хозяйстве, промышленности и медицине.

Метаболическая инженерия становится мощной технологией для успешного осуществления биотехнологии клеток растений в будущем. Основные задачи метаболической инженерии: 1) анализ метаболических путей должен быть хорошо документирован и разъяснен; 2) должны быть рассмотрены вопросы расширения обмена веществ между желаемыми метаболитными путями для возможного прямого воздействия на развитие растений и продуцирование ценных компонентов; 3) необходимо изучить определение дальнейших элементов в сложной регулирующей сети (например, транскрипционные факторы и их связывание); и 4) должны быть разработаны строгие критерии для оценки риска и выгоды инженерных растений (рис. 3).

Комплексные исследования в нескольких направлениях могут помочь довести метаболическую инженерию из эпохи проб и ошибок до промышленного применения. Метаболические инженерные подходы могут быть определены в соответствии с несколькими различными направлениями. Первый соответствующий подход предполагает увеличение общего объема потока углерода в направлении желаемого вторичного метаболита. Кроме того, уменьшение потока через конкурентные пути является альтернативным способом увеличить биосинтез лучшего метаболита. Другие возможные направления включают введение бессмысленного гена конкурирующего фермента в точке ветвления, а также преодоление ограничения скорости действия, или блокирование конкурентных путей [14].

ВСТАВИТЬ Рис. 3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя культуры растительных клеток могут производить весь спектр вторичных метаболитов, есть всего несколько успешных примеров по производству в промышленных масштабах. Перспектива производства продуктов с высокой добавленной стоимостью, таких как анти-ВИЧ и противораковых соединений, очень

высока. Таким образом, есть смысл в научных разработках в этом направлении, для его коммерческого использования в некоторых направлениях фармацевтики. Продвижение знаний в биохимии растений, регулирование вторичных путей и способность экспрессии желаемых признаков на трансгенных растениях приведет к новым технологиям производства целого ряда фармацевтических и медицинских продуктов. Вакцины и антитела из растений уже быстро продвигаются с поля в лаборатории и фабрики, с инвестициями из транснациональных компаний. Они направлены для обеспечения защиты от заболеваний всех слоев общества, так как бедные люди были лишены дорогих схем иммунизации.

Те, кто может инвестировать в эти исследования, выиграют в эпоху процессов и патентов. Развивающиеся страны, которые по-прежнему отстают в исследованиях рекомбинантной ДНК, возможно, не смогут полностью развивать свои собственные технологии. Нации, богатые биоразнообразием и с базой знаний местной растительности, могут защитить свои растения и разработать методы культивирования, методики размножения *in vitro*, с созданием удобных инструментов, которые не будут требовать высоких уровней биотехнологии. Исследования производства вторичных метаболитов с помощью биотехнологии делают только первые шаги и, как ожидается, смогут обеспечить получение лечебных и профилактических препаратов по доступным ценам в интересах человечества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rao S.R., Ravishankar G. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // *Biotechnol. Adv.* – 2002. – Vol. 20, №2. – P. 101-153.
2. Glaser V. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 17, №1. – P. 17-18.
3. Payne G.F., Bringi V., Prince C.M.L. Shuler. Plant cell and tissue culture in liquid systems // *Biotechnology Techniques.* – 1992. – Vol. 6. – 287 p.
4. Пасешниченко В.А. Растения – продуценты биологически активных веществ // *Соросовский образовательный журнал.* – 2001. – Т. 7, №8. – С. 13-19.
5. Cox P.A., Balick M.J. The ethnobotanical approach to drug discovery // *Sci. Am.* – 1994. – P. 82-87.
6. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective // *Plant Sci.* – 2001. – Vol. 161, № 5. – P. 839-851.
7. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: Наука, 1999. – 160 с.
8. Li J., Ou-Lee T.M., Raba R., Amundson R.G., Last R.L. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation // *Plant Cell.* – 1993. – Vol. 5, №2. – P. 171-179.
9. Harborne J.B. Classes and function of secondary products from plants // *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products.* – London: Imperial College Press, 1999. – P. 1-25.
10. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
11. Фаулер М.В. Экономические аспекты промышленного культивирования клеток растений // *Биотехнология сельскохозяйственных растений.* – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 9-43.
12. Мэнтел С.Г., Смит Г. Факторы культивирования, влияющие на накопление вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей растений // *Биотехнология сельскохозяйственных растений.* – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 75-104.
13. Siahsar B., Mohammad R., Tavassoli A., Raissi A. Application of Biotechnology in Production of Medicinal Plants // *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sc.* – 2011. – Vol. 11, №3. – P. 439-444.
14. Kirakosyan A., Kaufman P.B. Recent Advances in Plant Biotechnology // *Use of Plant Cell Biotechnology.* – Boston, MA: Springer US, 2009. – P. 15-33.
15. Khan M.Y., Aliabbas S., Kumar V., Rajkumar S. Recent advances in medicinal plant biotechnology // *Indian J. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 8. – P. 9-22.
16. Morris P., Fowler M.W. Growth and alkaloid content of cell suspension cultures of *Papaver somniferum* // *Planta Med.* – 1980. – Vol. 39, №3. – P. 284-285.
17. Westcott R.J., Henshaw G.G. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. // *Planta.* – 1976. – Vol. 131, №1. – P. 67-73.
18. Jones R.W., Sheard R.W. Phytochrome, Nitrate Movement, and Induction of Nitrate Reductase in Etiolated Pea Terminal Buds // *Plant Physiol.* – 1975. – Vol. 55, №6. – P. 954-959.
19. White J.M., Pike C.S. Rapid Phytochrome-mediated Changes in Adenosine 5'-Triphosphate Content of Etiolated Bean Buds // *Plant Physiol.* – 1974. – Vol. 53, №1. – P. 76-79.
20. Davies M.E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose // *Planta.* – 1972. – Vol. 104, №1. – P. 50-65.
21. Tabata M., Yamamoto H., Hiraoka N., Konoshima M. Organization and alkaloid production in tissue cultures of *scopolia parviflora* // *Phytochemistry.* – 1972. – Vol. 11, №3. – P. 949-955.
22. Ohta S., Yatazawa M. Effect of light on nicotine production in tobacco tissue culture // *Agric. Biol. Chem.* – 1978. – Vol. 42, №4. – P. 873-877.

23. Ikeda T., Matsumoto T., Noguchi M. Effect of auxins on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture // *Phytochemistry*. – 1978. – Vol. 17, №11. – P. 1879-1883.
24. Dalton C.C., Peel E. Product formation and plant cell specialization: a case study of photosynthetic development in plant cell cultures // *Prog. Ind. Microbiol.* – 1983. – Vol. 7, №17. – P. 109-166.
25. Hanson A.D., Edelman J. Photosynthesis by carrot tissue cultures // *Planta*. – 1971. – Vol. 102, №1. – P. 11-25.
26. Gautheret R.J. La culture des tissus végétaux // *Technique et réalisation*. – Paris: Masson et Cie, 1959. – P. 863.
27. Laetsch W.M., Kortschak H.P. Chloroplast structure and function in tissue cultures of a c(4) plant // *Plant Physiol.* – 1972. – Vol. 49, №6. – P. 1021-1023.
28. Bergmann L. Growth of green suspension cultures of nicotiana tabacum var. “Samsun” with CO₂ as carbon source // *Planta*. – 1967. – Vol. 74, №3. – P. 243-249.
29. Edelman J., Hanson A.D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures // *Planta*. – 1971. – Vol. 98, №2. – P. 150-156.
30. Berlyn M.B., Zelitch I., Beaudette P.D. Photosynthetic characteristics of photoautotrophically grown tobacco callus cells // *Plant Physiol.* – 1978. – Vol. 61, №4. – P. 606-610.
31. Horn M.E., Sherrard J.H., Widholm J.M. Photoautotrophic Growth of Soybean Cells in Suspension Culture // *Plant Physiol.* – 1983. – Vol. 72. – P. 426-429.
32. Yamada Y., Sato F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells // *Plant Cell Physiol.* – 1978. – Vol. 19, №4. – P. 691-699.
33. LaRosa P.C., Hasegawa P.M., Bressan R.A. Photoautotrophic potato cells: Transition from heterotrophic to autotrophic growth // *Physiol. Plant.* – 1984. – Vol. 61, №2. – P. 279-286.
34. Zenk M.H., el-Shagi H., Schulte U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* // *Planta Med.* – 1975. – №S01. – P. 79-101.
35. Kurz W.G.W., Constabel F. Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals // *Adv. Appl. Microbiol.* – 1979. – Vol. 25. – P. 209-240.
36. Berlyn M.B., Zelitch I., Beaudette P.D. Photosynthetic Characteristics of Photoautotrophically Grown Tobacco Callus Cells // *Plant Physiol.* – 1978. – Vol. 61, №4. – P. 606-610.
37. Nettleship L., Slaytor M. Adaptation of *Peganum harmala* Callus to Alkaloid Production // *J. Exp. Bot.* – 1974. – Vol. 25, №6. – P. 1114-1123.
38. Shiiro I., Ohta S. Nicotine production by tobacco callus tissues and effect of plant growth regulators // *Agric. Biol. Chem.* – 1973. – Vol. 37, №8. – P. 1857-1864.
39. Peters J.E., Wu P.H.L., Sharp W.R., Paddock E.F. Rooting and the Metabolism of Nicotine in Tobacco Callus Cultures // *Physiol. Plant.* – 1974. – Vol. 31, №2. – P. 97-100.
40. Büchner S.A., Staba E.J. Preliminary chemical examination of digitalis tissue cultures for cardenolides // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1964. – Vol. 16, №11. – P. 733-737.
41. Ravishankar G.A., Venkataraman L.V., Prakash J., Pierik R.L.M. Role of plant cell culture in food biotechnology: current trends, limitations and future prospects // *Plant biotechnology: commercial prospects and problems: Intercept Limited, 1993.* – P. 255-274.
42. Kim B.J., Gibson D.M., Shuler M.L. Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures elicited with methyl jasmonate // *Biotechnol. Prog.* – 2005. – Vol. 21, №3. – P. 700-707.
43. Verpoorte R., Alfermann A.W. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* / ed. R. Verpoorte, A.W. Alfermann. – Kluwer Academic Publishers, 2000.
44. Verpoorte R., Heijden R. van der, Memelink J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production // *Transgenic Res.* – 2000. – Vol. 9, №4-5. – P. 323-343.
45. Kunze R., Frommer W.B., Flügge U.-I. Metabolic engineering of plants: the role of membrane transport // *Metab. Eng.* – 2002. – Vol. 4, №1. – P. 57-66.
46. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* – 1981. – Vol. 60, №4. – P. 197-214.
47. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants // *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* – 1998. – Vol. 53, №1. – P. 35-40.
48. Wilde D.C., Neve D.M., Rycke D.R., Bruyns A.M., Jaeger D.G. Intact antigen-binding MAK33 antibody and Fab fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* – 1996. – Vol. 114, №2. – P. 233-241.
49. Fiedler U., Conrad U. High-Level Production and Long-Term Storage of Engineered Antibodies in Transgenic Tobacco Seeds // *BioTechnology*. – 1995. – Vol. 13, №10. – P. 1090-1093.
50. Bailey J. Toward a science of metabolic engineering // *Science*. – 1991. – Vol. 252, №5013. – P. 1668-1675.

REFERENCES

1. Rao S.R., Ravishankar G. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 2002, vol. 20, no. 2, pp. 101-153.
2. Glaser V. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. *Nat. Biotechnol.*, 1999, vol. 17, no. 1, pp. 17-18.
3. Payne G.F., Bringi V., Prince C.M.L. Shuler. Plant cell and tissue culture in liquid systems. *Biotechnology Techniques*, 1992, vol. 6, 287 p.
4. Paseshnichenko V.A. Plants – producers of biologically active substances. *Soros Educational Journal*, 2001, vol. 7, no. 8, pp. 13-19.
5. Cox P.A., Balick M.J. The ethnobotanical approach to drug discovery. *Sci. Am.*, 1994, pp. 82-87.
6. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.*, 2001, vol. 161, no. 5, pp. 839-851.
7. Butenko R.G. Biology in vitro cells of higher plants and biotechnology on their basis. Moscow, Nauka, 1999, 160 p.
8. Li J., Ou-Lee T.M., Raba R., Amundson R.G., Last R.L. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell.*, 1993, vol. 5, no. 2, pp. 171-179.
9. Harborne J.B. Classes and function of secondary products from plants. *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. London: Imperial College Press, 1999, pp. 1-25.
10. Butenko R.G. Culture of isolated tissue morphogenesis and physiology of plants. Moscow, Nauka, 1964, 272 p.
11. Fowler M.V. Economic aspects of commercial cultivation of plant cells. *Biotechnology crops*. Moscow, Agropromizdat, 1987, pp. 9-43.
12. Mantel S.G., Smith G. Culture factors influencing the accumulation of secondary metabolites in plant cell cultures and tissues. *Biotechnology crops*. Moscow, Agropromizdat, 1987, pp. 75-104.
13. Siahsar B., Mohammad R., Tavassoli A., Raissi A. Application of Biotechnology in Production of Medicinal Plants. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sc.*, 2011, vol. 11, no. 3, pp. 439-444.
14. Kirakosyan A., Kaufman P.B. Recent Advances in Plant Biotechnology. Use of Plant Cell Biotechnology. Boston, MA, Springer US, 2009, pp. 15-33.
15. Khan M.Y., Aliabbas S., Kumar V., Rajkumar S. Recent advances in medicinal plant biotechnology. *Indian J. Biotechnol.*, 2009, vol. 8, January, pp. 9-22.
16. Morris P., Fowler M.W. Growth and alkaloid content of cell suspension cultures of *Papaver somniferum*. *Planta Med.*, 1980, vol. 39, no. 3, pp. 284-285.
17. Westcott R.J., Henshaw G.G. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta*, 1976, vol. 131, no. 1, pp. 67-73.
18. Jones R.W., Sheard R.W. Phytochrome, Nitrate Movement, and Induction of Nitrate Reductase in Etiolated Pea Terminal Buds. *Plant Physiol.*, 1975, vol. 55, no. 6, pp. 954-959.
19. White J.M., Pike C.S. Rapid Phytochrome-mediated Changes in Adenosine 5'-Triphosphate Content of Etiolated Bean Buds. *Plant Physiol.*, 1974, vol. 53, no. 1, pp. 76-79.
20. Davies M.E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. *Planta*, 1972, vol. 104, no. 1, pp. 50-65.
21. Tabata M., Yamamoto H., Hiraoka N., Konoshima M. Organization and alkaloid production in tissue cultures of *scopolia parviflora*. *Phytochemistry*, 1972, vol. 11, no. 3, pp. 949-955.
22. Ohta S., Yatazawa M. Effect of light on nicotine production in tobacco tissue culture. *Agric. Biol. Chem.*, 1978, vol. 42, no. 4, pp. 873-877.
23. Ikeda T., Matsumoto T., Noguchi M. Effect of auxins on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Phytochemistry*, 1978, vol. 17, no. 11, pp. 1879-1883.
24. Dalton C.C., Peel E. Product formation and plant cell specialization: a case study of photosynthetic development in plant cell cultures. *Prog. Ind. Microbiol.*, 1983, vol. 7, no. 17, pp. 109-166.
25. Hanson A.D., Edelman J. Photosynthesis by carrot tissue cultures. *Planta*, 1971, vol. 102, no. 1, pp. 11-25.
26. Gautheret R.J. La culture des tissus végétaux . Technique et réalisation. Paris: Masson et Cie, 1959, pp. 863.
27. Laetsch W.M., Kortschak H.P. Chloroplast structure and function in tissue cultures of a c(4) plant. *Plant Physiol.*, 1972, vol. 49, no. 6, pp. 1021-1023.
28. Bergmann L. Growth of green suspension cultures of *nicotiana tabacum* var. "Samsun" with CO₂ as carbon source. *Planta*, 1967, vol. 74, no. 3, pp. 243-249.
29. Edelman J., Hanson A.D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. *Planta*, 1971, vol. 98, no. 2, pp. 150-156.
30. Berlyn M.B., Zelitch I., Beaudette P.D. Photosynthetic characteristics of photoautotrophically grown tobacco callus cells. *Plant Physiol.*, 1978, vol. 61, no. 4, pp. 606-610.
31. Horn M.E., Sherrard J.H., Widholm J.M. Photoautotrophic Growth of Soybean Cells in Suspension Culture. *Plant Physiol.*, 1983, vol. 72, pp. 426-429.
32. Yamada Y., Sato F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant Cell Physiol.*, 1978, vol. 19, no. 4, pp. 691-699.

33. LaRosa P.C., Hasegawa P.M., Bressan R.A. Photoautotrophic potato cells: Transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiol. Plant.*, 1984, vol. 61, no. 2, pp. 279-286.
34. Zenk M.H., el-Shagi H., Schulte U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med.*, 1975, no. S01, pp. 79-101.
35. Kurz W.G.W., Constabel F. Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1979, vol. 25, pp. 209-240.
36. Berlyn M.B., Zelitch I., Beaudette P.D. Photosynthetic Characteristics of Photoautotrophically Grown Tobacco Callus Cells. *Plant Physiol.*, 1978, vol. 61, no. 4, pp. 606-610.
37. Nettleship L., Slaytor M. Adaptation of *Peganum harmala* Callus to Alkaloid Production. *J. Exp. Bot.*, 1974, vol. 25, no. 6, pp. 1114-1123.
38. Shiio I., Ohta S. Nicotine production by tobacco callus tissues and effect of plant growth regulators. *Agric. Biol. Chem.*, 1973, vol. 37, no. 8, pp. 1857-1864.
39. Peters J.E., Wu P.H.L., Sharp W.R., Paddock E.F. Rooting and the Metabolism of Nicotine in Tobacco Callus Cultures. *Physiol. Plant.*, 1974, vol. 31, no. 2, pp. 97-100.
40. Büchner S.A., Staba E.J. Preliminary chemical examination of digitalis tissue cultures for cardenolides. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1964, vol. 16, no. 11, pp. 733-737.
41. Ravishankar G.A., Venkataraman L.V., Prakash J., Pierik R.L.M. Role of plant cell culture in food biotechnology: current trends, limitations and future prospects. *Plant biotechnology: commercial prospects and problems*: Intercept Limited, 1993, pp. 255-274.
42. Kim B.J., Gibson D.M., Shuler M.L. Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures elicited with methyl jasmonate. *Biotechnol. Prog.*, 2005, vol. 21, no. 3, pp. 700-707.
43. Verpoorte R., Alfermann A.W. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* / e. R. Verpoorte, A.W. Alfermann. Kluwer Academic Publishers, 2000.
44. Verpoorte R., Heijden R. van der, Memelink J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res.*, 2000, vol. 9, no. 4-5, pp. 323-343.
45. Kunze R., Frommer W.B., Flügge U.-I. Metabolic engineering of plants: the role of membrane transport. *Metab. Eng.*, 2002, vol. 4, no. 1, pp. 57-66.
46. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 1981, vol. 60, no. 4, pp. 197-214.
47. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, 1998, vol. 53, no. 1, pp. 35-40.
48. Wilde D. C., Neve D.M., Rycke D.R., Bruyns A.M., Jaeger D.G. Intact antigen-binding MAK33 antibody and Fab fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, 1996, vol. 114, no. 2, pp. 233-241.
49. Fiedler U., Conrad U. High-Level Production and Long-Term Storage of Engineered Antibodies in Transgenic Tobacco Seeds. *BioTechnology*, 1995, vol. 13, no. 10, pp. 1090-1093.
50. Bailey J. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, vol. 252, no. 5013, pp. 1668-1675.

ЖОҒАРҒЫ ӨСІМДІКТЕРДІҢ ТОРШАЛАРДЫҢ ЖӘНЕ КЕЗДЕМЕЛЕРДІҢ МӘДЕНИЕТІ – БАҒАЛЫ ХИМИЯ ҚОСУЛАРДЫҢ ПЕРСПЕКТИВАЛЫ КӨЗІ

Уразалиев Қ.Р.

*Қазақ Егіншілік және Өсімдік шаруашылығы Ғылыми Зерттеу Институты
040909, Ерленесов көш., 1, Алмалыбақ ауылы, Карасай ауданы, Алматы облысы, Қазақстан*

ТҮЙІН

Өсімдіктердің бактериялар мен жануарлардан басты айырмашылығы – олардың синтетикалық үрдістерінің әртүрлілігі, қорытынды жемісі әртүрлі химиялық құрылыстардың көптеген байланысуларынан тұратындығы және олардың көпшілігі биологиялық белсенді болуында. Қазіргі уақытта заттардың әртүрлі химиялық кластарының 30 мыңнан астам түрі бар екені белгілі және жыл сайынғы физико-химиялық талдаулардың, бөліп алу әдістерінің дамуының арқасында олардың саны көбею үстінде.

Соңғы жылдары өсімдіктің жасанды ортадан пайда болған жасушалары мен тіндері алынып отыр. Олардың екінші рет байланысуы барысында қажетті экономикалық маңызды байланыстарды жоғары дәрежеде жинақтау қабілеттігі мол. Яғни, жинақтау көлемі жағынан бастапқы өсімдіктен жоғары болғаны белгілі болған. Мұндай жасанды орта кең көлемді, өнеркәсіпте жасанды ортаны пайдалануға жоғары нарықтық тиімділік әкелуге қабілетті. Бағалы химиялық байланыстардың, сондай-ақ өсімдіктердің жасанды ортадан алынған жасушалары мен тіндерін алу әдістеріне нарықтық тиімділік үлкен маңызды ықпалын тигізеді. Әзірше осы тиімділік биотехнологиялық

жолдарды кең көлемде қолдануға негізгі кедергі көзі болып отыр. Осы әдістің бәсекеге қабілеттілігін арттыру үшін әртүрлі тәсілдер қолданылуда; жасушалар мен ферменттерді бірге қолдану, жартылай үздіксіз және үздіксіз жүйелерді қолдану, биотрансформациялауға мықты деп танылған өсімдіктердің жасушаларын қолдану, екі сатылы жасанды орта әдісін қолдану, жасанды ортадан алынған жасушалардың өсу қарқындылығын арттыру, жасанды ортадан алынған жасушалармен тіндердің екінші рет байланысуын күшейту. Оларға әртүрлі әдістер қолданып, химиялық және физикалық өзгерістерді пайдалану, бөлек тізбектерді көбейту, дифференциалданған жасанды ортаны пайдалану, өсіру жағдайларын тиімді жасау т.б. Осы айтылған шаралар бірінші мақсатта мықты деп танылған өсімдіктердің жасанды ортадан алынған жасушалары мен тіндерінің екінші рет байланысуын алу жолындағы технологиялардың қолжетімді болуына арналып отыр.

Негізгі сөздер: екінші рет метоболит, жасуша мен тіннің жасанды ортасы, биологиялық белсенді байланыстар.

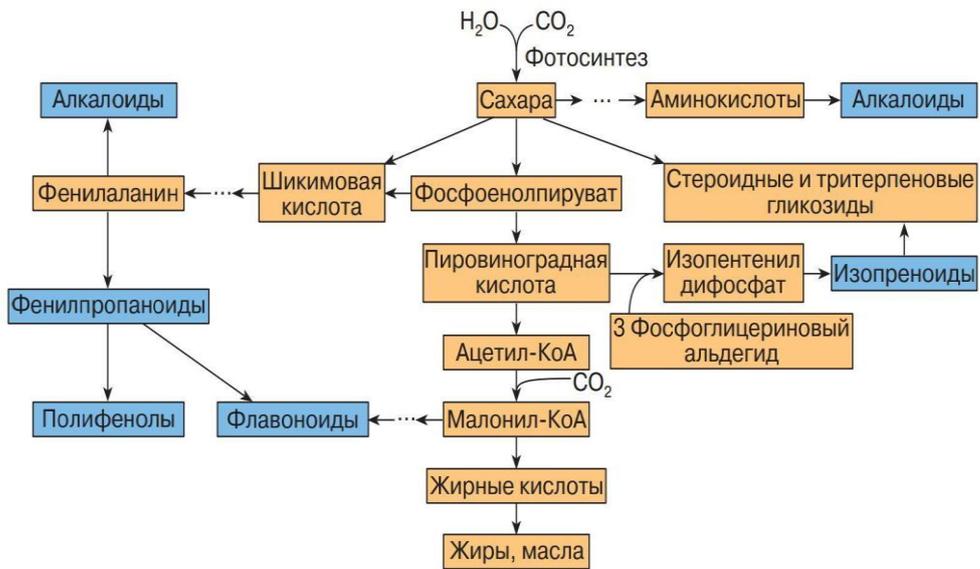


Рис. 1. Схема путей биосинтеза основных классов вторичных метаболитов из первичного обмена (названия классов вторичных метаболитов выделены голубым цветом) [4]

Fig. 1. Scheme of the biosynthesis pathways of the main classes of secondary metabolites from the primary exchange (names of classes of secondary metabolites are marked in blue) [4]

Таблица 2. Группы натуральных продуктов, выделенные из тканевых и суспензионных культур высших растений [1]

Table 2. Group of natural products that have been extracted from the tissue and suspension cultures of higher plants [1]

Фенилпропаноиды Phenylpropanoids	Алкалоиды Alkaloids	Терпеноиды Terpenoids	Хиноны Quinones	Стероиды Steroids
Антоцианины	Акридины	Каротины	Антрохиноны	Сердечные гликозиды
Кумарины	Беталаины	Монотерпены	Бензохиноны	
Флаваноиды	Хинолизидины	Сесквитерпены	Нафтохиноны	Производные прегненолона
Производные гидроксициннамоила	Фуранокумарины	Дитерпены		
	Харрингтонины	Тритерпены		
Изофлаваноиды	Изохинолины			
Лигнаны	Индолы			
Феноленоны	Пурины			
Проантоцианидины	Пиридины			
Стилбены	Тропановые алкалоиды			
Таннины				

Таблица 3. Пищевые добавки из культур клеток растений [1]

Table 3. Food supplements from plant cell cultures [1]

Тип продукта Product type	Вид растения Plant species	Ссылка Reference
Красители		
Антоцианины	<i>V. vinifera</i>	Pepin et al. (1995)
	<i>Euphorbia spp.</i>	Yamamoto et al. (1982)
	<i>D. carota</i>	Rajendran et al. (1994)
	<i>Pe. frutescens</i>	Zhong and Yoshida (1995)
Беталаины	<i>B. vulgaris</i>	Klebnikov et al. (1995)
	<i>Cheno. ruhrnim</i>	Berlin et al. (1986)
Кроцин	<i>Crocus sativus</i>	Sujata et al. (1990)
Кроцетины	<i>Gardenia jasmonoides</i>	George and Ravishankar (1995)
Каротеноиды	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Fosket and Rad in (1983)
Антрахиноны	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	Robbins and Rhodes (1986)
	<i>M. citrifolia</i>	Kieran et al. (1995)
Нафтохиноны	<i>L. erythrorhizon</i>	Sim and Chang (1993)
Ароматизаторы		
Ванилин	<i>Va. planifolia</i>	Dornenburg and Knorr (1946)
Чеснок	<i>Allium sativum</i>	Ohsumi et al. (1993)
Лук	<i>Allium cepa</i>	Collin and Masker (1988)
Басмати	<i>Oryza sativa</i>	Suvamalatha et al. (1994)
Цитрусовый аромат	<i>Citrus spp.</i>	Cresswell (1990)
Какао аромат	<i>Theabromo cacao</i>	Townsley (1972)
Острая пищевая		
Капсаицин	<i>Ca. frutescens</i>	Lindsey and Yeoman (1984)
	<i>Ca. annuum</i>	Johnson et al. (1990)
Подсластители		
Стевиозида	<i>Stevia rebaudiana</i>	Swanson et al. (1992)
Глицирризин	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hayashi et al. (1988)
тауматин	<i>Thaumatococcus danielli</i>	van der Wel and Ledebouer (1989)
Эфирные масла		
Масло мяты	<i>Mentha piperata</i>	Chung et al. (1994)
Масло ромашки	<i>Ma. chamomilla</i>	Kireeva et al. (1978)
Масло жасмина	<i>Jasmine officinale</i>	Banthrope (1994)
Анисовое масло	<i>Pim. anisum</i>	Eimst (1989)

Таблица 4. Вторичные метаболиты с высоким выходом [2]

Table 4. Secondary metabolites with high yields [2]

Продукт	Вид растения	Выход (% с.в.)	Ссылка
Product	Plant species	Yield (% D.W.)	Reference
Розмарин	<i>Sa. officinalis</i>	36,0	Hippolyte et al. (1992)
Розмарин	<i>Col. blumei</i>	21,4	Ulbrich et al. (1985)
Антрахиноны	<i>M. citrifolia</i>	18,0	Zenk et al. (1975)
Шиконин	<i>L. erythrorhizon</i>	12,4	Fujita (1988)
Берберин	<i>Th. minus</i>	10,6	Kobayashi et al. (1988)
Джетроризин	<i>Berberis wilsonae</i>	10,0	Breuling et al. (1985)
Антоцианины	<i>Pe. frutescens</i>	8,9	Zhong et al (1994)
Берберин	<i>C. japonica</i>	7,5	Matsubara et al. (1989)
Диосгенин	<i>Dios. deltoidea</i>	3,8	Sahai and Knuth (1985)
Сангвинарин	<i>P. somniferum</i>	2,5	Park et al. (1992)
Серпентин	<i>Cath. roseus</i>	2,2	Zenk et al. (1977)

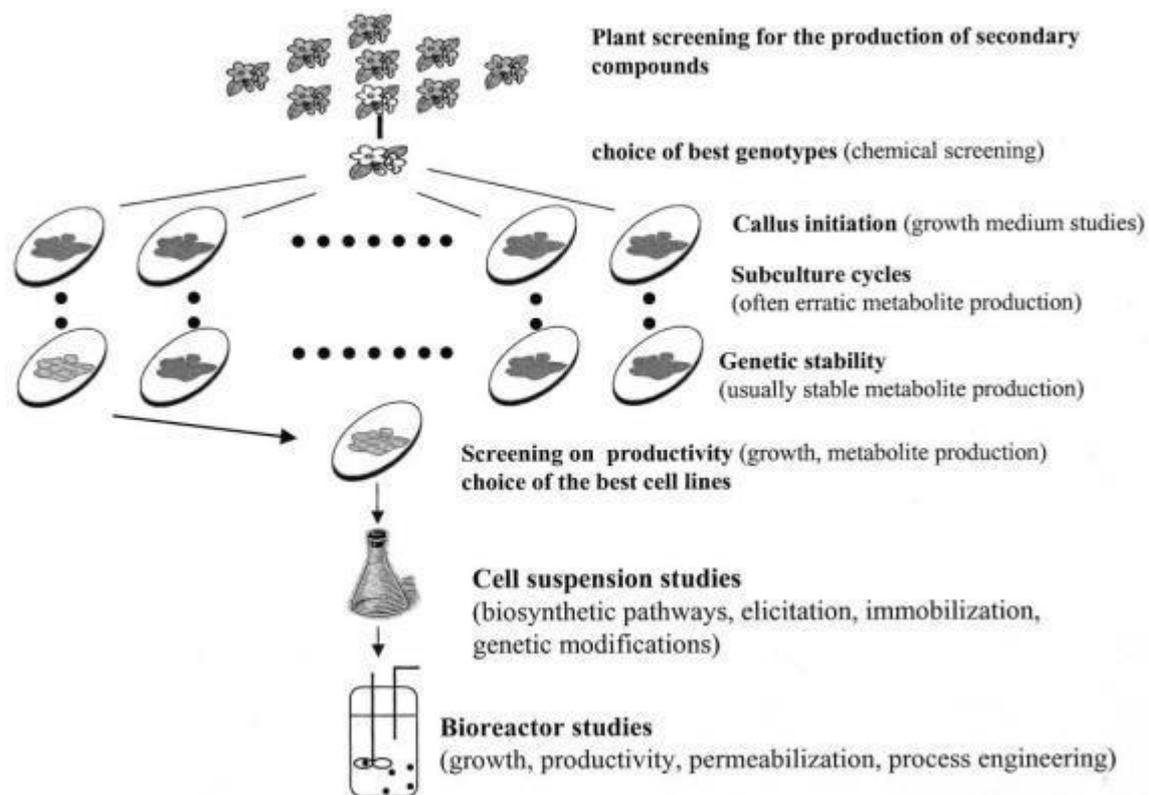
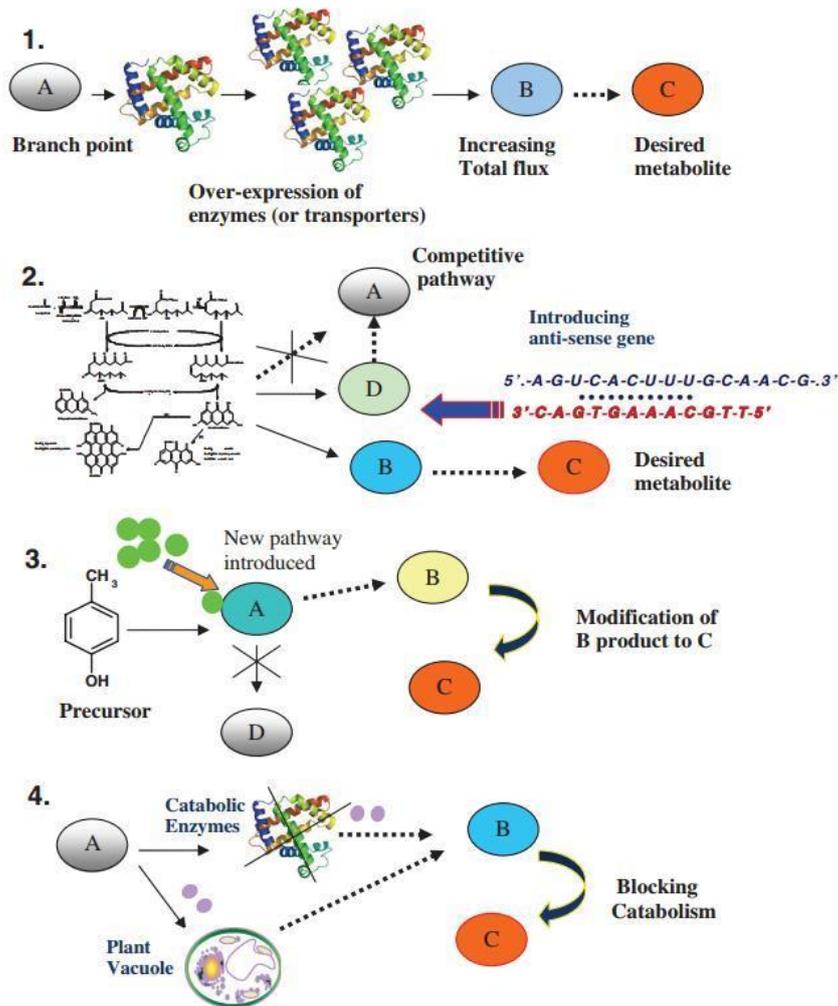


Рис. 2. Основные этапы производства вторичных метаболитов из растительной клетки [6]

Fig. 2. The main stages of the production of secondary metabolites by plant cell [6]



1 – увеличение общего потока углерода в точке ветвления; 2 – снижение потока на основе конкурентных путей или введения антисмыслового гена конкурирующего фермента; 3 – регулирование желаемой доходности метаболита или путем определения конкурентного пути и адресности лимитирующих этапов или путем внедрения нового пути; 4 – блокирование катаболизма или за счет увеличения переноса веществ вакуоли или подавлением катаболических ферментов [15].

Рис. 3. Подходы в метаболической инженерии

1 – increase the overall carbon flux in the branch point; 2 – reduction of the flow paths through competitive or introducing antisense gene of a competing enzyme; 3 – the regulation of the desired metabolite or profitability by identifying and targeting a competitive way limiting steps or by introducing a new way; 4 – blocking catabolism or by increasing the transport of substances vacuoles or suppression of catabolic enzymes [15]

Fig. 3. Metabolic engineering approaches