МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УО «ПОЛЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биотехнологии

РЕФЕРАТ

на тему: Иммобилизованные растительные клетки

подготовила

студентка 4-го курса

группы 1031411 А.В. Колб

ПИНСК 2013

Содержание

Введение

. Методы иммобилизации растительных клеток

.1 Включение в гель

.2 Адсорбция

.3 Ковалентное связывание

. Жизнеспособность иммобилизованных растительных клеток

.1 Окрашивание

.2 Дыхание

. Способность иммобилизованных растительных клеток к биосинтезу

.1 Биоконверсия

.2 Синтез из предшественников

.3 Синтез de novo

Заключение

Список использованных источников

Введение

Изолированные растительные клетки, как и клетки микроорганизмов, можно культивировать in vitro в колбах на качалках или в ферментерах, а возможность использования культур растительных клеток для получения биопрепаратов уже давно общепризнана. Из примерно 30 000 известных природных соединений более 90% можно обнаружить в высших растениях. Культивируемые растительные клетки тотипотентны, т. е. в принципе в них может экспрессироваться вся генетическая информация, и, следовательно, любое вещество, находящееся в интактном растении, можно получить, культивируя клетки данного растения. В настоящее время многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, выделяют из тканей возделываемых или дикорастущих растений. Эти вещества имеют сложное химическое строение, и поэтому их трудно получить каким-либо другим способом. Возможности получения некоторых важных видов растительного сырья ограничены уже сегодня или могут стать ограниченными в ближайшем будущем. В связи с этим настоятельно необходимы поиски и разработка альтернативных источников. Одним из таких источников являются культуры растительных клеток; за последнее десятилетие в этой области достигнуты значительные успехи. Так, недавно в Японии был впервые внедрен промышленный способ получения природного соединения (шиконина), основанный на культивировании растительных клеток.

Однако для промышленного использования культур растительных клеток с целью получения широкого спектра органических соединений необходимо решить ряд основных проблем. Растительные клетки в культуре значительно отличаются от клеток микро организмов, поэтому новейшие способы ферментации, разработанные для последних, в большинстве случаев не годятся для культивирования растительных клеток. Более того, характерные для растительных клеток медленный рост, способность к агрегации, низкий выход и генетическая нестабильность затрудняют их использование в крупных масштабах. Преимущества иммобилизованных биокатализаторов широко признаны в настоящее время, и в течение последних лет проводились исследования с целью установить, распространяются ли эти преимущества на иммобилизованные растительные клетки. Изучался биосинтез различных соединений в модельных системах, подобранных таким образом, чтобы они включали различные виды биосинтеза: синтез de novo из простых источников углерода (например, сахарозы), синтез из добавленных к питательной среде предшественников или биоконверсия (например, гидроксилирование). Для сохранения биосинтетической активности большое значение имеет жизнеспособность клеточных препаратов, поэтому применялись различные методы иммобилизации и изучалась жизнеспособность и биосинтетическая активность полученных препаратов.

. Методы иммобилизации растительных клеток

Растительные клетки достаточно чувствительны к изменениям окружающей среды, и, следовательно, для иммобилизации могут быть использованы только наиболее мягкие методы.

Установлено, что для крупных чувствительных растительных клеток самым подходящим из широко используемых методов иммобилизации является включение в гель. Известны также примеры иммобилизации растительных клеток методами адсорбции и ковалентной сшивки. Иммобилизацию растительных клеток проводят в стерильных условиях, поскольку растительные клетки растут относительно медленно и, следовательно, очень чувствительны к заражению быстро растущими клетками микроорганизмов. В связи с этим используемый для иммобилизации носитель должен выдерживать соответствующую обработку, например автоклавирование.

.1 Включение в гель

Для иммобилизации растительных клеток путем включения в гель можно использовать несколько различных методик. Конечная концентрация иммобилизованных клеток в препарате может варьировать в широких пределах (от нескольких процентов до 50% (по весу) и выше). Оптимальную концентрацию клеток нужно определять отдельно для каждого конкретного случая. Для иммобилизации клеток различных типов, в том числе растительных, широко используют альгинат кальция. Условия включения в гель альгината кальция очень мягкие, полимер можно стерилизовать автоклавированием, и кроме того, процесс иммобилизации обратим, что достигается добавлением агента, связывающего кальций (например, ЭДТА или лимонной кислоты). Конечная концентрация альгината в препарате иммобилизованных клеток может быть разной в зависимости от типа используемого альгината. Стабильность геля возрастает с увеличением концентрации полимера, но при высоких концентрациях альгината суспензия альгинат/клетки становится очень вязкой, что может затруднить процесс образования гранул.

х-Каррагинан представляет собой полисахарид, содержащий сульфоэфирные группы (сульфированы более 20% остатков сахара) и не растворимый в холодной воде. Однако при нагревании он растворяется, а при последующем охлаждении образует гель. Температура образования и качество геля зависят как от концентрации полимера, так и от количества и типа присутствующих в растворе катионов (например, K+, NH4+, Ca2+ или Ba2+).

Агар и агароза (очищенный препарат агара) образуют гели при охлаждении горячего раствора. Для понижения температуры гелеобразованпя агарозу можно химически модифицировать введением гидроксиэтильных групп. Оптимальная температура геле-образования при иммобилизации растительных клеток 25-30 °С. Преимуществом геля агарозы является то, что он стабилен в отсутствие противоионов. В последнее время для иммобилизации клеток микроорганизмов широко применяют полиакриламид. Однако некоторые вещества, используемые при радикальной полимеризации акриламида, токсичны для растительных клеток. Были разработаны методы, позволяющие уменьшить токсичность акриламида и других реагентов, что позволило получить жизнеспособные растительные клетки, иммобилизованные в полиакриламидном геле .

Для иммобилизации биокатализаторов можно использовать предполимеры уретана с концевыми функциональными изоцианатными группами. При смешивании таких предполимеров с каким-либо водным раствором, например клеточной суспензией, гель образуется в течение нескольких минут. В присутствии воды предполимеры уретана реагируют друг с другом с образованием карбаматных связей. Иммобилизованные данным способом клетки Lavandula vera использовали для получения пигмента.

Для иммобилизации растительных клеток можно использовать мембраны различной конфигурации. Впервые иммобилизация растительных клеток данным методом была продемонстрирована на полых трубчатых реакторах. Растительные клетки наносят на наружную поверхность полой трубки и через нее с относительно высокой скоростью прокачивают обогащенную кислородом питательную среду. При изучении модельной системы было показано, что в полом трубчатом реакторе иммобилизованные клетки Glycine max продуцируют фенольные соединения с постоянной скоростью в течение 700 ч.

.2 Адсорбция

Иммобилизация с помощью адсорбции на твердых носителях является очень мягким методом. Однако до настоящего времени его не использовали для иммобилизации растительных клеток. Для адсорбции растительных протопластов использовали микроносители . Растительные протопласты, адсорбированные на поперечно-сшитом декстране, сохраняли свою жизнеспособность.

.3 Ковалентное связывание

Метод ковалентного связывания клеток микроорганизмов с твердым носителем применяют достаточно редко. Что же касается его использования в случае растительных клеток, то известен только один пример ковалентной сшивки клеток Solanum aviculare с нерастворимой матрицей из полифениленоксида. Носитель активировали глутаровым альдегидом, и после удаления избытка глутарового альдегида гель добавляли к суспензии растительных клеток. Иммобилизованные клетки использовали в колоночном реакторе для получения стероидных гликозидов в течение 11 суток.

иммобилизация растительный клетка

2. Жизнеспособность иммобилизованных растительных клеток

В большинстве случаев необходимо, чтобы растительные клетки после иммобилизации сохраняли жизнеспособность. Это особенно важно, когда в процесс синтеза de novo вовлечены все пути метаболизма клетки.

.1 Окрашивание

Окрашивание флуоресцеиндиацетатом (ФДА) часто используют для определения жизнеспособности клеток. После адсорбции ФДА клетками при наличии эстеразной активности он деацетилируется и становится флуоресцирующим. Окрашенные клетки рассматривают с помощью микроскопа, снабженного УФ-источником света.

Выраженное в процентах отношение клеток, находящихся в данный момент времени на какой-либо стадии митоза, к их общему числу в популяции называют митотическим индексом (МИ). По его изменению в течение инкубации можно судить о жизнеспособности клеток. Удобным красителем для окраски хромосом после фиксации является карбол-фуксин

.2 Дыхание

О жизнеспособности клеток судят по их дыханию, которое можно измерять в течение инкубации через различные промежутки времени. Измерения проводят с помощью кислородного электрода Кларка по следующей стандартной методике. Клетки, суспендированные в среде (сырой вес 100-200 мг), или соответствующее количество иммобилизованных клеток (общий объем 5 мл) инкубируют при 25 °С. G помощью самописца регистрируют потребление кислорода, определяют сухой вес клеток (см. ниже) и рассчитывают удельную скорость дыхания.

Очень часто дыхание иммобилизованных клеток менее интенсивно, чем дыхание такого же количества суспендированных в среде клеток, что объясняется диффузионными затруднениями внутри полимерной сетки.

3. Способность иммобилизованных растительных клеток к биосинтезу

В клетках высших растений протекает множество химических реакций, которые можно использовать для синтеза сложных органических соединений. Наряду с реакциями биоконверсии, такими как гидроксилирование, метилирование и т. д., в растительных клетках осуществляется синтез органических соединений de novo из более простых соединений углерода. Иммобилизованные растительные клетки, сохранившие жизнеспособность, по-видимому, обладают такой же биосинтетической активностью, как и суспендированные в среде. Ниже приведены примеры, иллюстрирующие способность иммобилизованных растительных клеток к биосинтезу.

.1 Биоконверсия

12-β-Гидроксилирование производного дигитоксина с образованием производного дигоксина представляет промышленный интерес. Эту реакцию способны осуществлять как суспендированные в среде, так и иммобилизованные клетки Digitalis lanata в периодическом или непрерывном режимах. Клетки Digitalis, иммобилизованные в альгинатном геле могут быть использованы для гидроксилирования метилдигитоксина в метилдигоксин в периодическом режиме в течение 180 суток (если каждые трое суток гранулы геля с иммобилизованными клетками переносить в свежую среду). В данном случае время использования иммобилизованных клеток значительно превышает соответствующее время для клеток, суспендированных в среде; следовательно, с помощью иммобилизованных клеток удается получить более высокий выход продукта на единицу биомассы.

Культивируемые клетки Catharanthus roseus разных линий синтезируют различные индолсодержащие алкалоиды, такие как аймалицин, серпентин и катарантин. Конечным ферментом биосинтеза аймалицина является катенаминредуктаза. Для превращения катенамина в изомеры аймалицина использовали клетки С. roseus, включенные в агарозный гель и обработанные специальным веществом, повышающим проницаемость клеточных мембран.

.2 Синтез из предшественников

Если для какого-либо соединения известен путь биосинтеза и доступны вещества-предшественники, то его выход можно существенно увеличить, добавляя эти предшественники в питательную среду. Путь биосинтеза изомеров аймалицина в клетках С. roseus детально изучен, и отдаленными предшественниками этих изомеров являются триптамин и секологанин.

.3 Синтез de novo

При синтезе de novo сложных органических веществ из простых органических соединений с помощью культивируемых растительных клеток используется большая часть путей клеточного метаболизма. Поэтому синтез de novo осуществим только в том случае, если клетки жизнеспособны. В настоящее время известны лишь несколько примеров синтеза de novo сложных органических соединений с помощью иммобилизованных растительных клеток. Очевидно, сама по себе иммобилизация практически не влияет на биосинтетическую активность клеток. Ниже описаны два примера синтеза de novo: индолсодержащих алкалоидов и антрахинонов.

Индолсодержащие алкалоиды, такие как аймалицпн и серпентин, удалось получить с помощью клеток С. roseus, включенных в альгинатный и полиакриламидный гели. Для получения этих алкалоидов были отобраны специальные линии клеток.

Антрахиноны синтезируются различными культурами растительных клеток. Быдо описано получение антрахинонов с помощью включенных в альгинатный гель клеток Morinda citrifolia. Было установлено, что в одинаковых условиях иммобилизованные клетки М. citrifolia синтезируют в 10 раз больше продукта, чем клетки, суспендированные в среде.

Заключение

Первое сообщение об иммобилизации растительных клеток в гранулированных полимерах появилось в 1979 г., и с тех пор количество подобных работ все растет. Считают, что с помощью иммобилизации можно частично или даже полностью преодолеть ряд основных затруднений, препятствующих крупномасштабному использованию растительных клеток.

Иммобилизованные растительные клетки могут быть использованы только для получения веществ, синтез которых не связан с ростом клеток, т. е. веществ, продуцируемых клетками в стационарной фазе. За счет более длительной стационарной фазы, наблюдаемой у иммобилизованных растительных клеток, можно решить ряд проблем, связанных с замедлением роста клеток (наработкой биомассы).

При культивировании растительных клеток происходит их агрегация, причем размеры агрегатов сильно варьируют, что затрудняет как перемешивание культуры, так и процессы массопереноса. Такого рода затруднения можно частично преодолеть с помощью иммобилизации, поскольку при этом агрегация не мешает, а, наоборот, помогает. Относительно гомогенный препарат гранул геля, содержащих клеточные агрегаты, получить нетрудно.

При длительном культивировании, сопровождаемом многократными пересевами, культуры растительных клеток часто претерпевают значительные изменения. Так, линии клеток, отобранные по признаку высокой продуктивности по определенному веществу, во многих случаях утрачивают эту способность. Данная проблема может быть до некоторой степени решена путем иммобилизации, поскольку у иммобилизованных клеток наблюдается удлинение стационарной фазы, а наработка продукта происходит, когда клетки находятся в неделящемся состоянии, т. е. в период наименее вероятного возникновения генетических изменений.

Проблему низкой механической устойчивости растительных клеток удается решить путем включения клеток в защитную полимерную матрицу, благодаря чему упрощается конструкция реактора. Еще одно преимущество иммобилизованных растительных клеток - это возможность индуцированной экскреции веществ, накопленных внутри клетки, с помощью периодической пермеабилизации, что может оказаться полезным для дальнейшей разработки технологии культивирования растительных тканей. При этом биомассу можно использовать многократно в течение достаточно длительного времени.

Результаты применения иммобилизованных растительных клеток, полученные к настоящему времени, весьма обнадеживают. По-видимому, иммобилизация представляет собой перспективный метод, с помощью которого удастся частично или полностью решить проблемы, связанные с использованием культур растительных тканей для получения сложных органических соединений.

Список использованных источников

1. Zenk М. Н. In: Frontiers of Plant Tissue Culture (Thorpe T.A., ed.), International Association for Plant Tissue Culture, p. 1, 1978.

. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals (Staba E.J., ed.), CRC Press, Boca Raton FL, 1980.

. Yamada Y., Fujita Y.In: Handbook of Plant Cell Culture, vol. 1 (Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V. and Yamada Y., eds.), p. 717, Macmillan Publishing Co., New York, 1983.

. Brodelius P.In: Adwances in Biochemical Engineering, vol. 10 (Ghose T. K., Fiechter A. and Blakebrough N., eds.), p. 76, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978.

. Methods in Enzymology, vol. 46 (Mosbach K., ed.), Academic Press, New York, 1976.

. Brodelius P., Mosbach К. In: Advances in Applied Microbiology, Vol. 28, (Laskin A. 1., ed.), p. 1, Academic Press, New York. 1982.

. Brodelius P. In: Immobilized Cells and Organelles, vol. 1 (Matthiasson B., ed.), p. 27, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983.

. Brodelius P. Ann. N. Y. Acad. Sei., 413, 383 (1983).

. Brodelius P., Nilsson K. FEBS Lett., 122, 312 (1980).

. Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S., Linse L.. Schroder U., Jeppsson U., Larsson P-O., Mosbach K., Brodelius P. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 319 (1983).

. Freeman A., Aharonowitz Y. Biotechnol. Bioeng., 23, 2747 (1981).

. Rosevear A. European Patent Application, 81304001.1, 1981.

. Galun E., Aviv D., Dantes A., Freeman A. Planta Med., 49, 9 (1983).

. Lambe C A., Rosevear A. Proceedings of Biotech 83, London, May 4-6, 1983, p. 565, 1983.