

РАЗДЕЛ 6. БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ

ТЕМА 11 БИОХИМИЯ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

- 1 Предшественники биосинтеза вторичных метаболитов.
- 2 Пути биосинтеза основных классов вторичных метаболитов.
- 3 Модификации вторичных метаболитов (гликозилирование, гидроксилирование, метоксилирование, метилирование).
- 4 Энзимология вторичного метаболизма

1 Предшественники биосинтеза вторичных метаболитов.

Пути синтеза большинства вторичных метаболитов установлены достаточно хорошо. В настоящее время интенсивно изучается энзимология вторичного метаболизма. На основании имеющейся информации можно сформулировать некоторые закономерности биосинтеза этих соединений. Предшественниками синтеза служит относительно небольшое количество первичных метаболитов. Многие группы вторичных метаболитов могут синтезироваться несколькими путями.

Биогенетические предшественники большинства алкалоидов – это аминокислоты орнитин, лизин, фенилаланин, тирозин, триптофан и другие. Все они, кроме антраниловой кислоты, являются протеиногенными. Никотиновая кислота синтезируется из триптофана или аспарагиновой кислоты. Образование этих веществ тесно связано с общим обменом азота клетки. Для большинства алкалоидов показано, что схемы их синтеза унифицированы, т.е. имеют сходную последовательность реакций. В процессе биосинтеза молекула аминокислоты практически полностью включается в структуру алкалоида.

К настоящему времени известно два пути образования фенольных соединений – шикиматный (через шикимовую кислоту) и ацетатно-малонатный. Основной путь шикиматный, это практически единственный способ формирования ароматического кольца. В качестве исходных соединений для синтеза выступают фосфоенолпируват (ФЕП) и эритрозо-4-фосфат. При их конденсации возникает семиуглеродная кислота (2-кето-3-дезоксид-7-фосфоарабогептановая), которая затем циклизуется в 5-дегидрохинную кислоту.

Лигнины и лигнаны имеют общих фенилпропаноидных предшественников – это синаповый, кониферилловый и п-кумаровый оксикоричные спирты. Однако биосинтез лигнанов связан с избирательным стереоспецифическим образованием димеров в отличие от формирования оптически неактивных лигнинов.

Синтез колоссального числа изопреноидов происходит из единственного предшественника – изопентенилдифосфата. Под действием фермента изопентенилдифосфатизомеразы, которая сдвигает двойную связь, ИПДФ превращается в диметилаллилдифосфат (ДМАДФ).

Вещества, участвующие во вторичном обмене, образуются в реакциях углеводного и белкового обменов, а продукты распада используются как субстраты для синтеза белковых молекул и других соединений.

2 Пути биосинтеза основных классов вторичных метаболитов.

Образование алкалоидов тесно связано с общим обменом азота клетки. Для большинства алкалоидов показано, что схемы их синтеза унифицированы, т.е. имеют сходную последовательность реакций. В процессе биосинтеза молекула аминокислоты практически полностью включается в структуру алкалоида. Синтез алкалоидов разных групп включает одинаковые типы реакций: декарбоксилирование, окислительное дезаминирование, альдольная конденсация, но для каждой группы алкалоидов эти реакции осуществляют «собственные» ферменты. На первом этапе синтеза происходит декарбоксилирование аминокислоты при участии соответствующей декарбоксилазы.

Образовавшиеся биогенные амины подвергаются окислительному дезаминированию с участием аминоксидаз. Полученные в результате аминокальдегиды или аминокетоны в результате серии последовательных реакций образуют ключевые гетероциклические соединения. Затем происходит модификация базовой структуры с участием разнообразных реакций – гидроксилирования, метилирования и др. В формировании окончательной структуры алкалоида могут принимать участие дополнительные углеродные единицы, например, ацетат (в виде ацетил-СоА) или монотерпеновая единица (для сложных индольных алкалоидов). В зависимости от сложности алкалоида его биосинтез включает от трех-четырех до десяти-пятнадцати реакций. Для целого ряда алкалоидов не только установлена схема синтеза, но охарактеризованы и выделены ферменты. Оказалось, что некоторые ферменты синтеза не очень специфичны (в качестве субстратов могут использовать различные соединения), однако в цепочке синтеза обязательно присутствуют высокоспецифичные ферменты, которые используют только один субстрат (или ряд очень близких субстратов) и выполняют очень специфичную реакцию. Например, при синтезе изохинолинов гидроксилирование базовой структуры по каждому положению выполняют разные ферменты. По мере продвижения к заключительным этапам синтеза сродство ферментов к субстрату обычно повышается.

Если при синтезе алкалоидов сходная цепочка превращений используется для различных исходных соединений (аминокислот), то синтез колоссального числа изопреноидов происходит из единственного предшественника – изопентенилдифосфата (ИПДФ). Под действием фермента изопентенилдифосфатизомеразы, которая сдвигает двойную связь, ИПДФ превращается в диметилаллилдифосфат (ДМАДФ). Далее ИПДФ присоединяется к ДМАДФ по двойной связи и образуется C₁₀-соединение – геранилдифосфат. Он служит источником всех монотерпеноидов.

Затем к геранилдифосфату присоединяется еще один ИПДФ и образуется C₁₅-соединение фарнезилдифосфат – исходное вещество для синтеза сесквитерпеноидов. Далее фарнезилдифосфат может либо присоединить еще одну молекулу ИПДФ с образованием геранилгеранилдифосфата (C₂₀-соединение – источник дитерпеноидов), либо димеризоваться с образованием сквалена (C₃₀-соединение – исходное соединение для всех тритерпеноидов).

Наконец, геранилгеранилдифосфат может димеризоваться с образованием фитоина – C₄₀-соединения, источник тетратерпеноидов. Кроме того, к геранил-

геранилдифосфату может последовательно присоединиться большое количество ИПДФ, формируя в конечном итоге полиизопrenoиды – каучук и гуттаперчу. В результате описанных реакций образуется полный гомологический ряд C_5 -соединений разной длины.

Далее эти алифатические молекулы могут «свернуться» в циклические структуры, причем количество циклов, их размер и типы сочленения могут быть самыми разными.

Синтез базовых изопrenoидных структур осуществляют всего два типа ферментов – пренилтрансферазы, которые «наращивают» длину изопrenoидов, и циклазы, которые формируют соответствующий циклический скелет молекулы. При этом каждый тип структуры формирует специфическая циклаза. Так как типов циклических структур изопrenoидов довольно много, то и количество циклаз должно быть внушительным. К настоящему времени их известно более ста. После формирования базовой структуры (или одновременно с этим), происходит ее модификация и «оснащение» функциональными группами.

Долгое время считалось, что во всех организмах исходное соединение для образования изопrenoидов – ИПДФ – формируется единственным способом, а именно из мевалоновой кислоты, которая в свою очередь синтезируется из трех молекул ацетил-СоА.

Недавно было установлено, что разные организмы используют различные способы синтеза ИПДФ. В клетках животных и грибов все изопrenoиды синтезируются по «классическому» мевалонатному пути. Целый ряд микроорганизмов, в том числе многие цианобактерии и зеленые водоросли, используют другой вариант образования ИПДФ. В этом случае его предшественником является 1-дезоксиксилулозо-5-фосфат, который синтезируется из пирувата и глицеральдегид-3-фосфата. Такой путь синтеза был назван «альтернативным», или «немевалонатным». Оказалось, что растения используют оба варианта образования изопrenoидов: в цитозоле синтез идет по классическому пути, а в пластидах – по альтернативному. При этом возможно не только дублирование синтеза изопrenoидов в разных компартментах клетки, но и разделение по типу синтезируемых структур.

Тритерпеноиды (включая стероиды) синтезируются в цитозоле из мевалоната, тогда как дитерпеноиды (включая фитол хлорофилла) и тетратерпеноиды (прежде всего каротиноиды) – в пластидах по альтернативному пути.

Моно- и сесквитерпены, вероятно, могут образовываться разными вариантами в зависимости от структуры молекулы и вида растения. На последнем этапе синтеза образуется цианогенный гликозид за счет гликозилирования α -гидроксинитрила при помощи УДФ-глюкозы. Синтез обычно осуществляет комплекс ферментов: например, для дуррина этот комплекс состоит из четырех ферментов. Гены ферментов клонированы. Трансгенное по двум генам растение арабидопсиса приобрело способность к синтезу цианогенных гликозидов.

Синтез беталаинов начинается от тирозина, который гидроксилируется и образуется диоксифенилаланин (ДОФА). ДОФА служит источником для двух фрагментов молекулы бетацианинов – беталамовой кислоты и цикло-ДОФА.

Объединение этих двух соединений приводит к формированию бетацианинов. При синтезе бетаксантинов беталамовая кислота конденсируется с пролином.

Серосодержащие вторичные метаболиты обычно синтезируются из серосодержащих аминокислот.

Шикимовая кислота почти всегда служит предшественником при биосинтезе производных нафтохинона. Вторым компонентом в этом биосинтезе является α -кетоглутаровая кислота, а важным промежуточным продуктом ее конденсации с шикимовой кислотой - о-сукцинилбензойная кислота. Далее следует циклизация с образованием уже типичных нафтохиноновых структур, где ароматическое кольцо построено на базе шикимовой кислоты, хиноидная же часть молекулы – из некарбоксильных С-атомов α -кетоглутаровой кислоты. У представителей семейства Rubiaceae сходным путем образуются и антрахиноновые производные. Дополнительное шестичленное углеродное кольцо их молекулы синтезируется путем конденсации нафтохинонового производного с диметилаллильной формой «активированного изопрена» – изопентенилдифосфата. Продукт конденсации, подвергаясь окислительной циклизации, превращается в антрахинон.

Ацетатно-малонатный путь синтеза фенольных соединений широко распространен у грибов, лишайников и микроорганизмов. У растений он является минорным. При синтезе соединений по этому пути ацетил-СоА карбоксилируется с образованием малонилацетил-СоА. Затем происходит каскад аналогичных реакций, в результате наращивается углеродная цепь и возникает поли- β -кетометиленовая цепочка. Циклизация поликетидной цепи приводит к образованию различных фенольных соединений. Таким способом синтезируются флороглюцин и его производные, некоторые антрахиноны.

В структуре флавоноидов кольцо В формируется по шикиматному пути (из оксикоричной кислоты), тогда как кольцо А – по ацетатно-малонатному. В клетке работают два шикиматных пути синтеза флавоноидов – один в пластидах, другой в цитозоле. В этих компартментах находится полный набор изоферментов шикиматного пути, а также ферментов фенольного метаболизма, в том числе ФАЛ и халконсинтазы.

Таким образом, в растительной клетке существует две параллельные цепочки синтеза фенольных соединений (аналогично изопреноидам. К настоящему времени известно два пути образования фенольных соединений – шикиматный (через шикимовую кислоту) и ацетатно-малонатный.

Основной путь шикиматный, это практически единственный способ формирования ароматического кольца. В качестве исходных соединений для синтеза выступают фосфоенолпирuvat (ФЕП) и эритрозо-4-фосфат. При их конденсации возникает семиуглеродная кислота (2-кeto-3-дезоксид-7-фосфарабогептановая), которая затем циклизуется в 5-дегидрохинную кислоту. Из дегидрохинной кислоты образуется шикимовая кислота, которая имеет шестичленное кольцо, одну двойную связь, и ее легко перевести в соединения ароматического ряда. Из шикимовой кислоты возможно образование оксibenзойных кислот – п-оксibenзойной, протокатеховой, галловой. Однако основной путь использования шикимовой кислоты – образование через префеновую кислоту

ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина. Фенилаланин (возможно, в ряде случаев и тирозин) – основной предшественник синтеза фенольных соединений.

Дезаминирование фенилаланина осуществляет фермент фенилаланинам-миаклиаза (ФАЛ). В результате образуется коричная кислота, гидроксильное которой приводит к образованию пара-кумаровой (оксикоричной) кислоты.

После дополнительного гидроксильного и последующего метилирования из нее образуются остальные оксикоричные кислоты. Оксикоричные кислоты представляют центральное звено синтеза всех фенольных соединений клетки. Орто-кумаровая кислота является предшественником кумаринов. После ряда реакций укорочения алифатической части молекулы образуются C_6-C_2 - и C_6-C_1 – соединения – это второй путь образования оксикоричных кислот (первый – непосредственно из шикимовой кислоты). Оксикоричные кислоты могут образовывать различные конъюгаты, прежде всего с сахарами, однако основная масса оксикоричных кислот активируется путем взаимодействия с CoA. Два магистральных пути использования CoA-эфиров оксикоричных кислот – синтез лигнинов и синтез флавоноидов. Для синтеза лигнинов CoA-эфиры оксикоричных кислот восстанавливаются до спиртов, которые выступают в качестве мономеров синтеза. При синтезе флавоноидов CoA-производное оксикоричной кислоты взаимодействует с тремя молекулами малонил-CoA с образованием халкона. Реакцию катализирует фермент халконсинтаза.

3 Модификации вторичных метаболитов (гликозилирование, гидроксильное, метоксилирование, метилирование).

Анализ химической структуры вторичных метаболитов дает возможность выделить в большинстве случаев определенную «базовую» структуру, на основе которой образуются многочисленные варианты. Наибольшее распространение получили следующие пути возникновения различных вариантов:

- модификации базовой структуры: присоединение либо замена функциональных групп, изменение степени окисленности молекулы. В качестве функциональных групп обычно используются гидроксильные, метильные либо метоксильные группы;

- образование конъюгатов – присоединение к базовой структуре «унифицированных блоков». В качестве последних чаще всего выступают различные сахара (моно- или олигосахариды), органические кислоты или некоторые группы вторичных метаболитов;

- конденсация нескольких одинаковых или различных базовых структур (например, образование пренилированных фенольных соединений).

Для разных групп вторичных метаболитов характерны разные типы изменения структуры. Например, для алкалоидов характерно метоксилирование, но не гликозилирование; для изопреноидов, наоборот, типично гликозилирование, но не метоксилирование; у фенольных соединений наблюдаются оба типа этих модификаций.

Многие модификации (в частности, гликозилирование) значительно изменяют биологическую активность молекулы. Очень часто гликозилирование

является универсальным способом перевода активной (функциональной) формы вторичного метаболита в неактивную (запасную).

Поскольку вторичные метаболиты, как правило, отличаются высокой биологической активностью, а, следовательно, могут вызвать повреждения цитоплазмы, у растений должны существовать механизмы, обезвреживающие их. В растениях имеются два основных пути защиты от химически активных веществ: компартментация в пространственно разделенных клеточных органеллах и химическая модификация до относительно безвредных соединений.

Модификации вторичных метаболитов происходят при их синтезе. Для фенольных соединений характерно образование гликозидов, метилирование и метоксилирование. За счет гидроксильных и карбоксильных групп фенольные соединения могут связываться с сахарами, органическими кислотами, растительными аминами, алкалоидами.

Основными реакциями при биосинтезе подавляющего числа алкалоидов являются декарбоксилирование и окислительное дезаминирование или переаминирование аминокислот и диаминов, первичное метилирование, трансметилирование, а также циклизация алифатических соединений-предшественников до гетероциклических структур.

Особую роль в образовании алкалоидов играют реакции метилирования. Оно часто происходит на стадии ациклического соединения и предшествует циклизации, направляя ее. Метильные группы, введенные в молекулу алкалоида, стабилизируют ее. Кроме того, метилированные аналоги менее токсичны, чем алкалоиды, не имеющие метильных групп. В молекулах алкалоидов метилироваться могут кислород и азот, образуя группы ($-\text{OCH}_3$) и ($=\text{N}-\text{CH}_3$). Метильные группы переносятся с помощью ферментов метилтрансфераз.

Первым в молекуле метилируется кислород с образованием метоксильной группы ($-\text{OCH}_3$), затем азот ($=\text{N}-\text{CH}_3$). Метильные группы переносятся с помощью ферментов метилтрансфераз, донором метильных групп выступает S-аденозилметионин. Кроме стабилизации молекулы алкалоидов, метилирование уменьшает их токсичность, увеличивает разнообразие модифицированных форм.

Гликозилирование – ферментативный процесс, в ходе которого происходит присоединение остатков сахаров к органическим молекулам. В процессе гликозилирования образуются гликозиды.

Многие модификации (в частности, гликозилирование) значительно изменяют биологическую активность молекулы. Очень часто гликозилирование является универсальным способом перевода активной (функциональной) формы вторичного метаболита в неактивную (запасную).

Углеводная (гликозильная) часть молекулы, или гликон, является циклической формой сахаров, а неуглеводная часть носит название агликон, или генин.

Агликоны и сахара соединены между собой гликозидной связью.

По размеру цикла углеводного остатка гликозиды делятся на пиранозиды (шестичленный или пирановый гликозильный цикл) и фуранозиды (пятичленный или фурановый гликозильный цикл).

Сахарные компоненты, входящие в состав гликозидов, в основном, относятся к моносахаридам.

Чаще всего встречаются глюкоза, рамноза и галактоза. Группа гликозидов, содержащих глюкозу, называется глюкозидами.

Стероидные алкалоиды, как правило, находятся в растениях в виде гликозидов, что послужило причиной их второго названия –гликоалкалоиды. Разнообразие строения гликоалкалоидов обусловлено прежде всего вариациями углеводной части соединения.

Метилирование – это введение в органические соединения метильной группы $-CH_3$ вместо атома водорода, металла или галогена. Частный случай алкирования. Метилирование в терминальном положении приводит к удлинению углеродной цепи в молекуле на 1 атом.

Метилирование алкалоидов часто происходит на стадии ациклического соединения, направляя циклизацию; донором метильной группировки, как правило, выступает метионин. Первым в молекуле метилируется кислород с образованием метоксильной группы ($-OCH_3$), затем азот ($=N-CH_3$). Метильные группы переносятся с помощью ферментов метилтрансфераз, донором метильных групп выступает S-аденозилметионин. Кроме стабилизации молекулы алкалоидов, метилирование уменьшает их токсичность, увеличивает разнообразие модифицированных форм.

4 Энзимология вторичного метаболизма

Изучение энзимологии вторичного метаболизма привело к открытию удивительно большого количества различных ферментов, участвующих в этом процессе.

Модификация вторичных метаболитов – источник их поразительного разнообразия. Модификация происходит прежде всего в реакциях замещения (их осуществляют ацилтрансферазы), метилирования, гликозилирования. В геноме арабидопсиса обнаружены гены 43 различных ацилтрансферазы. Несколько структурно близких ацилтрансфераз используют в качестве субстратов ацил-СоА, в их активном центре содержится консервативный гистидин. Гены ацилтрансфераз в геноме собраны в кластеры. Метилтрансферазы представляют собой суперсемейство ферментов, в которое входят О-, С-, N-, S-метилтрансферазы.

Они используют в качестве метилирующего субстрата S-аденозинметионин (SAM) и осуществляют метилирование фенолпропаноидов, флавоноидов, алкалоидов, поликетидов, сахаров. С-, N-, S-метилтрансферазы структурно (и, видимо, эволюционно) не связаны, тогда как О-метилтрансферазы имеют сходную первичную структуру и консервативный SAM-связывающий мотив.

Гликозилирование осуществляют гликозилтрансферазы, причем существуют три типа ферментов: О-, С-, S-гликозил-трансферазы. Гликозилирование существенно изменяет свойства молекулы, прежде всего увеличивает ее растворимость и снижает токсичность.

Окислительно-восстановительные превращения кардинально изменяют свойства молекулы. Эти реакции катализируют окислительно-восстановительные (редокс) ферменты вторичного метаболизма – «метаболические волшебные палочки». У растений обнаружили более 300 цитохром-Р450-оксигеназ и более 100 диоксигеназ; при этом следует учесть, что диоксигеназы обычно мультисубстратны и образуют несколько продуктов.

ТЕМА 12 ФИЗИОЛОГИЯ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

- 1 Клеточные аспекты выделительной деятельности растений.
- 2 Внутритканевая секреция.
- 3 Внешняя секреция.
- 4 Выделение вторичных метаболитов при экстремальных воздействиях.

1 Клеточные аспекты выделительной деятельности растений.

Основные физиологические функции клетки сосредоточены в цитоплазме с включенными в нее органеллами. Эта активная часть клетки ограничена от оболочки плазмалеммой, а от вакуоли – тонопластом. Если в процессе метаболизма возникает избыток какого-либо соединения (который может привести к нарушениям нормально протекающих реакций), то избыточные метаболиты эвакуируются путем диффузии или активного механизма через плазмалемму или тонопласт. В первом случае секретируемое соединение попадает в свободное (лежащее вне объема, ограниченного плазмалеммой) пространство клетки, во втором – в вакуоль.

Таким образом, из сферы активного метаболизма выводятся вещества, которые могли бы нарушить клеточный гомеостаз. Внутриклеточная секреция – эволюционно обусловленный путь удаления избытка метаболитов. Она возникла, по-видимому, в связи с развитием наземного образа жизни, приведшего к появлению массивных форм растений, что ограничило способность клеток выделять продукты обмена в окружающую среду.

Появилась тенденция к сохранению побочных продуктов внутри самих клеток – в вакуолях или в свободном пространстве клетки.

Выделяемые в секреторном процессе вещества разнообразны по своей химической природе. Это – прежде всего продукты первичного обмена – углеводы, белки, гормоны, необходимые для роста и развития. Кроме того, в цитоплазме и органеллах синтезируются продукты вторичного обмена, которые, как полагают, возникают в результате разбалансированного роста, приводящего к появлению избыточного количества интермедиатов, на накопление которых организм отвечает превращением их до вторичных соединений.

Вторичные метаболиты представлены в растениях огромным количеством индивидуальных соединений, хотя они образуются на немногих путях обмена веществ и их биогенетическими предшественниками является небольшое число веществ – шикимат, мевалонат, ацетил-КоА, коричная кислота и аминокислоты.

В растениях имеются два основных пути защиты от химически активных веществ. Один из них – компартментация в физически разделенных специфиче-

ских органеллах. Другой путь состоит в химической модификации до относительно безвредных соединений (что также не исключает изолирование образующихся модифицированных веществ в определенных компартментах клетки). Продуктами внутриклеточной секреции в большинстве случаев являются соединения, образованные в процессе фотосинтеза, и основное место их синтеза – мембраны хлоропластов, хотя некоторые из вторичных метаболитов образуются и в других органеллах: эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и его везикулах, микросомах, лейкопластах. Основным компартментом растворимых в воде соединений является вакуоль, а для газообразных и липофильных экскретов такую же функцию выполняет свободное пространство клетки.

Прежде чем выделиться из цитоплазмы, секретируемые вещества преодолевают цитоплазматические мембраны – плазмалемму, если вещество выделяется в свободное пространство клетки, или тонопласт при транспорте в вакуоль. Чаще всего выделение осуществляется особой формой транспорта – экзоцитозом, который относится к активным формам выделения.

В растениях путем экзоцитоза выделяются частицы и макромолекулы, которым трудно преодолеть барьер, создаваемый плазмалеммой или тонопластом.

Различают внешнюю (экстраклеточную) и внутреннюю секрецию. Внутренняя секреция осуществляется в свободное пространство клетки (пространство между плазмалеммой и клеточной оболочкой) или в вакуоль (через тонопласт).

При экстраклеточной секреции в зависимости от специализации возможны три вида секреции: мерокриновая, апокриновая и голокриновая.

Секреция в свободное пространство клетки. Свободным пространством клетки обычно считают часть клетки вне объема, ограниченного плазмалеммой. Однако оболочка и плазмалемма являются единым комплексом и с трудом отделяются друг от друга. Поэтому выведение веществ через плазмалемму есть по сути дела секреция в свободное пространство – между клеточной стенкой и плазмалеммой. Некоторое расстояние между клеточной стенкой и плазмалеммой (периплазматическое пространство) реально появляется только в результате секреторной деятельности клетки, когда за плазмалемму изливается содержимое пузырьков Гольджи, и в этих случаях действительно плазмалемму от оболочки отделяет иногда значительное пространство, занятое секретом.

Секреция в свободное пространство является первым этапом выведения секрета из любой клетки. Этот процесс особенно заметен у специализированных секреторных клеток.

Примером секреции специализированными клетками в свободное пространство может служить процесс выделения монотерпенов. Синтез этих веществ осуществляется в больших лейкопластах амебоидной структуры, которые имеют только несколько внутренних мембран и их строма лишена рибосом. Вокруг лейкопластов имеется обертка из эндоплазматического ретикулула, связанная с мембранами лейкопластов, что позволяет терпеноидам переходить из мест их синтеза – пластидной наружной оболочки – к месту их аккумуляции – свободному пространству клетки. Фенолы также секретируются в свободное пространство клетки.

Секреция в вакуоль. Вакуоль является местом накопления водорастворимых соединений, которые попадают в нее из цитоплазмы. Мембрана дает избирательной проницаемостью, и в вакуоли концентрируются вещества только определенного типа. С физиологической точки зрения вещества, заполняющие вакуоль, принадлежат к двум разным категориям. С одной стороны – это вещества, ценные для растения, которые сохраняются и могут вновь включаться в процесс обмена веществ.

С другой стороны, в вакуолярном соке содержатся и вторичные продукты обмена – флавоноиды, алкалоиды и др., накопление которых обусловлено ограниченной способностью клетки выделять их наружу. Таким образом, центральная вакуоль клетки является своеобразной секреторной системой, в которую выводятся из сферы активных превращений вещества различной химической природы. Состав веществ, секретируемых цитоплазмой в вакуоль, сильно изменяется в зависимости от видовых особенностей растений, фазы развития и местонахождения клеток (корень, лист и другие органы).

Вакуоль выполняет ряд функций (осморегуляция, поддержание тургора, запасание ассимилятов и секреция). Секреторная функция становится преобладающей в зрелой клетке, когда в вакуоли накапливаются нереализованные продукты обмена. Транспорт секретируемых веществ через тонопласт осуществляется с помощью активных механизмов – экзоцитоза и пиноцитоза.

Фенольные соединения, по-видимому, могут синтезироваться и в вакуоли, и в хлоропластах. При попадании в вакуоль происходит их гликозилирование за счет присоединения сахарного остатка, с помощью которого ослабляется токсичность фенольных соединений. Кроме того, переход агликона в гликозид повышает растворимость фенольных соединений в воде и одновременно снижает их растворимость в липидах биомембран, затрудняя обратный выход фенольных соединений из вакуоли через тонопласт.

Кроме фенолов, в пластидах (хлоропластах и лейкопластах) синтезируются алкалоиды, терпены, некоторые углеводороды, многие из которых также могут накапливаться в вакуоли.

Хотя большинство вторичных продуктов запасается в нецитоплазматических компартментах живых клеток, липофильные вещества могут образовывать капли липидов внутри цитоплазмы. В них могут аккумулироваться каротиноиды, смолы и эфирные масла. В таких каплях могут быть растворены и другие липофильные вещества, например, алкалоиды. Подобные капли часто есть и в вакуолях.

Секреторная функция свойственна любой растительной клетке. Однако в растениях имеются и специализированные клетки (идиобласты), в которых секреторная функция становится основной. В специализированных секреторных клетках накапливаются минеральные соли, эфирные масла, смолы, танины и другие соединения. По внешнему виду и расположению в тканях идиобласты могут быть пигментированными (содержат фенолы или алкалоиды), склерейдными, кристалл-содержащими.

Идиобласты могут быть заполнены разнообразными органическими веществами. Такие клетки включают слизи или масла, обогащены фенолами (тан-

нинами, антоцианами, флавоноидами), алкалоидами, белками, терпеноидами и др.

Обычными типами секреторных клеток являются идиобласты, накапливающие производные фенолов (танины, антоцианы, флавоноиды). В масляных идиобластах обычно присутствуют различные терпены в смеси с другими соединениями, чаще всего с углеводородами, спиртами, кетонами и комплексом веществ в виде смол. Особенно широко распространены идиобласты, содержащие эфирные масла.

Масляные идиобласты отличаются от несекретирующих клеток крупным ядром, сильно развитым агранулярным эндоплазматическим ретикулулом, который принимает участие в биосинтезе терпенов. В терпеноидных клетках много митохондрий, снабжающих энергией процессы синтеза и выделения секрета в вакуоль. Для таких клеток также характерно развитие пластидного аппарата, состоящего из многочисленных лейкопластов.

Для некоторых групп растений характерно накопление в идиобластах алкалоидов; идиобласты являются также местом накопления стероидных гликозидов, которые широко распространены в растениях.

Идиобласты, содержащие полиизопрен гутту, часто встречаются в коре стебля *Eucommia ulmoides*. Эти структуры образуются из меристематических клеток коры. Частицы гутты синтезируются и аккумулируются в цитоплазме, где одновременно с этим деградируют органеллы.

Из других видов секреторных клеток известны идиобласты, содержащие сесквитерпеновые лактоны, которые особенно распространены в растениях из семейства Magnoliaceae.

2 Внутритканевая секреция.

К внутренним секреторным структурам относятся внутритканевые вместилища и ходы (каналы – вместилища, принимающие вытянутую форму). Внутритканевые каналы являются вместилищами разнообразных секретов. В зависимости от происхождения их делят на схизогенные и лизигенные. Схизогенные вместилища представляют собой межклеточники, заполненные выделившимся веществом и окруженные живыми эпителиальными клетками. К ним относятся смоляные ходы.

Лизигенные структуры возникают на месте группы клеток, которые распадаются после накопления веществ, например, вместилища эфирных масел. Развитие секреторных каналов идет различными путями у разных растений или даже у различных органов одного и того же растения. В некоторых тканях секреторные каналы развиваются сначала схизогенно, потом, на поздних стадиях, – лизигенно, тогда как в других тканях только лизигенно или только схизогенно.

Внутренними секреторными структурами являются и млечники, которые представляют собой живые клетки, содержащие в вакуолях млечный сок. Следует отметить, что в одних и тех же растениях, за исключением семейства Anacardiaceae, структуры и млечных и смоляных ходов не встречаются.

Секреция смол. Смолы встречаются млечниках и в смоляных ходах различных частей растений. Смоляные ходы широко распространены в семействах Umbelliferae, Araliaceae, Compositae, Coniferae, Anacardiaceae. Они появляются как нормальный элемент древесины у родов Pinus, Picea, Larix, Pseudotsuga или развиваются только в результате повреждения (роды Abies, Cedrus, Tsuga, Pseudolarix). У хвойных смоляные ходы располагаются в древесине и коре ствола, ветвей, хвое и чешуек шишек. В древесине вертикальные и горизонтальные ходы соединяются между собой, образуя переплетающуюся сеть.

Заполняющие смоляные хода секреты представляют собой слаболетучие продукты растений, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. Они стабильны, инертны, аморфны и являются сложными смесями главным образом терпеноидов, флавоноидов и липидов. Особенно широко распространены в смолах производные дитерпенов – циклические кислоты, получившие название смоляных кислот.

В составе смол присутствуют также флавоноиды, которые могут превращаться в лигнаны. Часто в смолах присутствуют жирные кислоты, некоторые из которых напоминают воска. В составе смол найдены соединения, которые характерны только для отдельных семейств. Так в смоляных ходах растений семейства Asteraceae обнаружены бензопираны и бензофураны, соотношение между которыми (бензопиран/бензофуран) варьирует от 1:1 до 1:10. Некоторые из этих соединений биологически активны и являются репеллентами благодаря токсичности для травоядных насекомых. Основой этого действия являются пиран и фуран, а также ароматические кольца. Другие компоненты смол, например, трахилобановая и кауреновая кислоты, способны уничтожать личинки различных насекомых, или подобно производным пирана и фурана защищать растения от поедания травоядными животными.

Смола синтезируется в эпителиальных клетках, окружающих смоляной ход. Секреторные полости смоляных каналов должны быть хорошо изолированы от путей газовой диффузии, поскольку у некоторых видов в секрете есть терпены, способные легко окисляться, если внутренность листа открыта.

Вопрос о месте синтеза смол внутри секреторных клеток не может считаться окончательно решенным. Предполагается, что смолы синтезируются в лейкопластах, окруженных эндоплазматическим ретикулулом, от которого отходят капли. Однако есть сведения, что на ранних стадиях развития смоляного хода осмофильные капли, свидетельствующие о синтезе смолы, наблюдаются не только в пластидах, но и в эндоплазматической сети, пузырьках Гольджи, митохондриях, на ядерной мембране и в цитоплазме.

Образовавшийся секрет – смола транспортируется к плазмалемме в везикулах аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулула с последующим экзоцитозом (гранулокриновая секреция). Возможны также и другие пути секреции. Смола в канале смоляного хода находится под большим напором (до 10 атм и более), обусловленным секреторным давлением, которое, очевидно, вызывает выделение терпенов из каналов, вскрываемых при механическом повреждении.

Млечный сок. В отличие от смоляных ходов вместилища млечного сока представляют собой живые клетки. Млечники обнаружены у 12 500 видов растений, принадлежащих к 900 родам и 20 семействам, в основном класса двудольных. Присутствие млечников в природных условиях легко распознается по вытеканию латекса при повреждении ткани растений. Латекс в млечниках находится под давлением, которое, например, у *Hevea brasiliensis* достигает 10 атм., что и обуславливает его интенсивное истечение.

Млечная клетка приобретает секреторную функцию с самого начала своего образования. Продолжительность функционирования млечников у разных видов растений разная, но, как правило, короче, чем жизнь самого растения.

Млечный сок, который вытекает при перерезке млечников, является эмульсией.

Дисперсионной средой служит вода (50-82 %), а дисперсионной фазой – глобулы веществ, нерастворимых в воде – полиизопреновые углеводороды, тритерпенолы и стеролы, жирные и ароматические кислоты, каротиноиды, фосфолипиды, белки и другие вещества. Глобулы этих веществ взвешены в клеточном соке, поэтому эмульсия похожа на молоко.

Основу латекса у семейства *Euphorbiaceae* составляют многочисленные терпеноиды. Кроме того, в млечном соке часто встречаются тритерпены, такие как эуфол и ситостерол. Среди полиизопреновых углеводородов латекса часто встречаются смолы, каучук, гутта.

Секретция камеди и эфирных масел. Внутритканевая секретия камеди и эфирных масел представляет важный аспект функционирования многих растений и часто определяется как защитное приспособление.

Всего камедь найдена в 40 родах из 30 семейств покрытосеменных, и есть примеры среди голосеменных растений. Камеденосные каналы образуются разными способами у разных видов. Они бывают схизогенными или лизигенными, иногда развиваются сначала схизигенно, потом на поздних стадиях лизигенно.

Камеди, заполняющие протоки, представляют собой сложные природные продукты, которые часто видоспецифичны. Чаще всего это – комплекс из полисахаридов и терпенов или смесь флавоноидов, терпенов и жирных кислот. Особенностью таких комплексов является их способность набухать в воде, образуя гели и (или) коллоидные растворы.

У большинства растений, как считают, камеди образуются в результате физиологических нарушений или различных болезней, при которых наступает разрушение оболочек и клеточного содержимого (главным образом крахмала, а также углеводов, встречающихся в клеточных оболочках). Это явление называется также гуммозом. Камедь может скапливаться не только в камедевых ходах, но и клетках ксилемы. На воздухе камеди густеют и забивают рану, предотвращая обезвоживание и препятствуя проникновению патогенов.

Эфирные масла. Масляные протоки характерны для семейств *Calycanthaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Simarubaceae*, *Winteraceae*. Они развиваются в листьях, как, например, у *Eremophila*, где эти протоки могут занимать до 13 % среза листа, или других частях растений.

Кроме обычных терпенов, в составе эфирного масла встречаются соединения, относящиеся к другим группам химических соединений, а иногда и редкие видоспецифические вещества. Количество индивидуальных соединений бывает высоко и достигает нескольких десятков. Особенно часто в секретах встречаются кумарины, которые растворены в эфирных маслах.

О биологическом значении секрета масляных протоков известно очень мало. Считают, что эфирные масла с растворенными в них соединениями обладают аллелопатическим действием и подавляют прорастание семян других видов растений, тем увеличивая конкурентноспособность семян эфиромасличных растений.

3 Внешняя секреция.

Внешняя секреция осуществляется специализированными секреторными клетками, которые располагаются на поверхности растения. К ним относятся железистые волоски, солевые железки, железки насекомоядных растений, осмофоры и гидатоды. Секреторные клетки осуществляют биосинтез и выделение эфирных масел, терпеноидов, флавоноидов, жирных кислот, слизей и других соединений и часто экскретируют их смеси. Кроме того, они могут выделять различные водные растворы. Морфология железистых клеток зависит от продуктов, которые они аккумулируют.

Выделение эфирных масел. К внешним секреторным структурам, осуществляющим синтез и выделение эфирных масел, относятся железистый эпидермис и железистые волоски разной степени сложности. Кроме того, синтез компонентов эфирных масел может происходить, очевидно, и в клетках, не входящих в состав специализированных структур.

Железистые волоски располагаются только на надземной части растения. Железистая поверхность, выделяющая терпены, характерна для некоторых соцветий и рыльца пестика многих цветков. Количество эфиромасляных железок, находящихся на листе, является наследственно обусловленным признаком. Возникнув при дифференциации трихом листа количество желез затем не меняется. Однако на дифференцировку трихом влияет ряд условий и среди них баланс гормонов.

Продуцируемый железистыми клетками секрет – эфирное масло – представляет собой смесь веществ. Всего из эфирных масел выделено около 1000 органических соединений. Среди них насыщенные, и ненасыщенные, ароматические терпеновые, сесквитерпеновые моно- и бициклические углеводороды и их кислородные производные – спирты, альдегиды, кетоны, простые и сложные эфиры, кислоты, лактоны, а также гетероциклические соединения.

Большинство исследователей считают, что все этапы биосинтеза терпенов протекают в самих секреторных клетках. Внутриклеточная компартментация синтеза терпенов может осуществляться в разных участках клетки. Предполагается, что этот биосинтез осуществляется на мембранах агранулярного ретикулюма, который обеспечивает необходимую поверхность для размещения ферментов биосинтеза. При этом допускается участие гиалоплазмы и матрикса органелл. Получены также данные о синтезе терпенов в специализированных

пластидах, где обнаружен фермент фитоенсинтаза. Такими пластидами являются большие лейкопласты амебоидной структуры, которые имеют только несколько внутренних мембран и их строма лишена рибосом.

Поскольку мембрана лейкопласта связана с эндоплазматическим ретикуломом, терпеноиды могут проходить из мест их синтеза – наружной пластидной оболочки – к месту их аккумуляции – экстраплазматическому пространству, расположенному между целлюлозной оболочкой и кутикулой.

Синтезированные компоненты эфирного масла выделяются из секреторных клеток через плазмалемму и оболочку. Проникновение через плазмалемму происходит по эккриновому типу путем мономолекулярного транспорта, или, как полагают, оно может происходить по гранулокриновому типу. Из периплазматического пространства эфирное масло удаляется при разрыве кутикулы, после чего может образоваться новая кутикула и накапливается новая капля секрета. При благоприятной температуре эфирные масла через клеточную оболочку и кутикулу диффундируют в газообразной форме. Для испарения в воздух летучих низкомолекулярных терпенов, способных проникать сквозь пропитанные водой стенки клеток, ни целлюлозные клеточные стенки, ни кутикула не являются препятствием. Об этом свидетельствует не только испускание цветками ароматов, но и воздействие паров эфирных масел некоторых растений на сопутствующие им организмы.

Секреция смол. Смолы представляют собой смеси веществ, включая терпеноиды, флавоноиды и жирные вещества. От эфирных масел они отличаются составом терпеноидов. Если в эфирных маслах содержатся низкомолекулярные терпеноиды (главным образом монотерпены C_{10} и сесквитерпены C_{15}), то в смолах присутствуют как летучие, так и нелетучие высокомолекулярные терпеноиды (главным образом, C_{20}). Смолы образуются в специализированных железистых волосках или на внутренней поверхности смоляных каналов. Смолистые вещества, содержащие флавоноиды, также выделяются железками почек древесных растений. Показано, что смолы синтезируются в пластидах.

Секреция фенолов. Хотя изопреноиды и составляют основные метаболиты трихом цветковых растений, но существуют и другие вторичные соединения, которые присутствуют в железистых волосках некоторых растений. К их числу относятся фенольные вещества. Информации о них меньше, чем о терпенах, хотя фенолы, возможно, самые обычные компоненты желез.

Фенолы находятся в трихомах в виде водорастворимых гликозидов в клеточном соке, но липофильные их агликоны могут экскретироваться железистыми волосками в составе смолистых и масляных секретов в наружную среду. В этом случае они аккумулируются на поверхности растения в виде компонентов листовых смол или тонких мелких кристаллов. Фенольные соединения часто обнаруживают в выделениях корней, чему посвящена специальная литература, поскольку обсуждается их роль в аллелопатических взаимоотношениях растений в фитоценозе.

Секреция алкалоидов. Алкалоиды обычно накапливаются в клеточном соке растений, где образуют соли с определенными органическими кислотами, такими, как троповая, атроповая и тигликовая кислоты, или этерифицируются

спиртами (тропин, нортропин, скопин). В ряде случаев алкалоиды аккумулируются в железистых волосках и выделяются из них в окружающее пространство.

Экскреция алкалоидов растениями может иметь значение как одна из форм удаления избытка токсичных азотистых веществ- продуктов обмена. Кроме того, общеизвестна функция секретлируемых алкалоидов как репеллентов и аттрактантов. Экскреция алкалоидов важна для защиты растений от атаки насекомых.

4 Выделение вторичных метаболитов при экстремальных воздействиях.

Выделительная деятельность растений в экстремальных условиях происходит при различных повреждениях организма, если сила внешнего фактора превышает порог нормальной адаптации или изменения внешнего фактора слишком резкие, чтобы осуществлялись механизмы, поддерживающие гомеостаз. Среди множества описанных процессов фитостресса имеет место растением выделение вторичных метаболитов.

Ранение, инфекция и другие экстремальные воздействия часто нарушают нормальный синтез терпеноидов. Деградация растительных клеток приводит к изменению качественного и количественного состава этих соединений. Они могут стимулировать заживление раны или повышать устойчивость к заболеванию. Озон, как и повышенная концентрация CO₂, усиливает выделение летучих терпенов.

В растительном мире одним из значительных источников летучих терпеновых соединений является живица хвойных. Ранения, которые часто наблюдаются в естественных условиях под действием повреждающих факторов, но которые особенно значительны при подсочке, вызывают обильное выделение этих веществ. Например, смоляные монотерпеновые и дитерпеновые кислоты образуются у сосны при ее поранении или инокуляции грибами. В условиях стресса в смоле изменяется содержание α - и β - пиненов, каурена, фелландрена, мирцена, абиетиновой кислоты. Количество и состав выделяющихся терпенов является показателем устойчивости растений к стрессам. В смоле смоляных ходов хвой *Picea abies* L, поврежденных в результате загрязнения воздуха, изменяется содержание монотерпеновых и сесквитерпеновых углеводородов, спиртов, кетонов. Особенно резко изменяется отношение α -пинен/ β -пинен. В поврежденной хвое содержание β -пинена увеличивается примерно в 4 раза.

В физиологически активных тканях высших растений фенольные соединения находятся в вакуолях в виде гликозидов. Если растительная клетка подвергается действию факторов, вызывающих стресс, то разрушение или увеличение проницаемости тонопласта приводит к выходу фенольных соединений в цитоплазму, где они окисляются до соответствующих хинонов. В окислении принимает участие фенолаза – медьсодержащий фермент. Он может окислять, например, хлорогеновую, кофейную кислоты, катехол, *p*-кумариновую кислоту, тирозин. Образующиеся хиноны – очень сильные окисляющие агенты, которые реагируют с α -амино- и тиоловыми группировками белков. Кроме того, они мо-

гут подвергаться полимеризации с образованием коричневых и черных продуктов. Реакция полимеризации может протекать и неэнзиматически.

Стрессовые условия не только способствуют освобождению и преобразованию уже имеющихся в клетке фенольных соединений, но и стимулируют фенольный метаболизм, при котором увеличивается синтез производных кофейной и хинной кислот. Среди них – коричная (циннамовая), хлорогеновая, изохлорогеновая кислоты. Эти соединения присутствуют и в интактных тканях, но их накопление стимулируется стрессами. Засуха в комбинации с другими стрессами может значительно увеличить концентрацию хлорогеновой и изохлорогеновой кислот в растениях.

Поскольку в настоящее время алкалоиды более не рассматриваются как отбросы растений, и признается существование тесной связи между обменом белков и аминокислот, с одной стороны, и образованием алкалоидов – с другой, изменение количества алкалоидов при стрессах является показателем изменения азотного обмена растений. Действие стрессовых факторов на накопление и выделение алкалоидов было экспериментально проверено рядом авторов. Механическое повреждение ткани способствует освобождению алкалоидов, которые могут оказывать сильное физиологическое действие на живые организмы, будь то животные, микробы или растения.

Среди азотсодержащих продуктов стрессовых выделений растений встречаются сульфоксиды аминокислот и белки. При повреждении тканей лука *Allium cepa* и чеснока *Allium sativum* появляются характерные для этих видов запахи, обусловленные летучими цистеин-сульфоксидами, которые обладают фунгицидной и бактерицидной активностью.

К группе стрессовых метаболитов относятся фитоалексины – соединения, которые аккумулируются в ответ на разнообразные травмы растительной ткани и играют ведущую роль в устойчивости растений к болезням.

ТЕМА 13. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

1 Общие представления о качественном и количественном анализе растительного материала.

2 Характеристика избранных методов, используемых при изучении вторичных метаболитов растений.

3 Определение основных групп вторичных метаболитов.

1 Общие представления о качественном и количественном анализе растительного материала.

При изучении вторичных метаболитов в растительном материале используют как качественный, так и количественный анализ.

Качественный анализ позволяет установить присутствие того или иного компонента или группы компонентов в исследуемом материале. Такой анализ всегда предшествует количественному определению, и его результаты являются ориентировочными. В качественном анализе могут применяться как группо-

вые реакции. так и реакции на индивидуальные соединения. Первые позволяют обнаружить группу химически близких веществ, например, алкалоиды в целом, вторые – конкретное искомое вещество. Групповых реагентов известно значительно больше, чем индивидуальных. Реакции с применением групповых реагентов могут давать ложноположительные результаты. Групповые реагенты имеют разную степень чувствительности к исследуемым веществам. Поэтому при качественном анализе растительного сырья необходимо применять несколько групповых реагентов, чтобы уменьшить вероятность ложноположительных и избежать ложноотрицательных результатов.

Качественный анализ может быть применен в качестве экспресс-теста для приблизительной оценки содержания искомого вещества, что бывает необходимо в токсикологии или селекции растений. Кроме того, качественные реакции применяются для гистохимического определения локализации искомых веществ в клетках и тканях растений.

Качественный анализ не требует сложного и дорогостоящего оборудования, проводится на часовых стеклах в капле раствора или с применением специальных индикаторных бумаг. В основе качественного анализа лежат реакции образования окрашенных соединений или осаждения.

Количественный анализ – это совокупность физических, химических и физико-химических методов исследования, позволяющих с требуемой точностью определять в анализируемом образце содержание отдельных компонентов.

При использовании физических методов анализа содержание вещества определяют по присущим ему физическим свойствам (например, определение сахарозы рефрактометрическим методом или определение глюкозы поляриметрическим методом).

При использовании химических методов анализа количество вещества определяют после его химического превращения. Детекция результата производится визуально (например, объемные методы анализа).

Физико-химические методы направлены на определение содержания веществ после их химической модификации с помощью соответствующего оборудования (например, спектрофотометрия или газовая хроматография).

Количественный анализ основан на точном измерении массы и объема определяемых веществ, продуктов их химических превращений или расходуемых реактивов, вступающих в реакции с определяемыми веществами. Методы количественного анализа позволяют определить точное содержание искомого вещества в растительном материале, а не только установить факт его присутствия.

В количественном анализе химического состава растительного материала применяют те же методы, что и в аналитической химии. Условно их можно разделить на две группы – классические методы химического анализа и современные физико-химические методы.

К первой группе можно отнести титриметрические (объемные), гравиметрические и колориметрические методы анализа.

Ко второй группе относятся газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), масс-спектрометрия (МС) и их комбинации (ВЭЖХ – МС, ГЖХ – МС), метод ядерного, протонного магнитного резонанса (ЯМР и ПМР) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Классические методы анализа являются более дешевыми, но, как правило, обладают меньшей чувствительностью, чем современные физико-химические методы. Поэтому в последние годы все более широкое применение находят физические и физико-химические методы, обладающие многими преимуществами по сравнению с химическими методами. Возникновение новых методов анализа и идентификации веществ позволило выявить тысячи различных метаболитов вторичного происхождения и установить их химическую структуру.

2 Характеристика избранных методов, используемых при изучении вторичных метаболитов растений

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Метод основан на способности веществ с разной силой связываться с сорбентом. При этом разделение происходит в очень тонком слое сорбента, нанесенного на нейтральный носитель. В качестве сорбента чаще всего используют силикагель, оксид алюминия или микрокристаллическую целлюлозу, в качестве подложки – стекло, алюминиевую фольгу или полимерную пленку.

Достоинствами данного метода являются: относительная дешевизна, простота в исполнении, быстрота разделения. При проведении ТСХ не требуется такого сложного и дорогостоящего оборудования, как для некоторых других видов хроматографии.

Метод служит не только для качественного определения состава исследуемых смесей, но и для количественного определения веществ. Содержание компонентов в пробе может быть определено как по площади пятна, так и после элюирования веществ из области пятна.

Идентификация индивидуального вещества проводится по значению R_f (коэффициент распределения), специфичной флуоресценции или после специфичного окрашивания.

Коэффициент распределения – это величина, характеризующая степень связывания компонентов разделяемой смеси с носителем. Экспериментально ее вычисляют как отношение расстояния от линии старта до середины пятна исследуемого вещества к расстоянию, пройденному фронтом растворителя. Этот коэффициент индивидуален для каждого вещества в определенной системе растворителей и для конкретного сорбента. Он может зависеть от температуры и влажности воздуха, поэтому ориентироваться только на R_f при идентификации веществ нельзя. Обязательным является использование вещества (так называемого свидетеля) и сравнение R_f , полученного для свидетеля опытным путем, с табличным. При необходимости для веществ, определяемых на хроматограмме, вносят поправки.

При применении пластин, обработанных флуоресцентным красителем, вещества, которые не флуоресцируют в ультрафиолетовом (УФ) свете, могут быть обнаружены в виде темных пятен на светящемся фоне.

Газовая хроматография (ГХ) – метод разделения летучих, термостабильных соединений. Подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, имеющую большую поверхность. В качестве подвижной фазы можно использовать водород, гелий, азот, аргон и углекислый газ. Наиболее часто используют азот как более доступный и дешевый. Газ-носитель обеспечивает перенос разделяемых компонентов по хроматографической колонке и не взаимодействует ни с разделяемыми веществами, ни с неподвижной фазой.

Различают два варианта метода: газо-адсорбционную. Когда неподвижной фазой служит твердый носитель, и газо-жидкостную хроматографию, когда неподвижной фазой является вязкая, нелетучая жидкость, нанесенная на инертный носитель. В качестве детектора чаще всего используют пламенно-фотометрический детектор (ПФД) или масс-спектрометрический детектор (МС).

Можно отметить достоинства газовой хроматографии:

- широкие границы применимости;
- возможность определения анализируемых соединений с высокой точностью;
- быстрота анализа;
- широкий выбор сорбентов и неподвижных фаз;
- возможности для варьирования условий разделения.

Жидкостная хроматография (ЖХ) – метод, в котором в качестве подвижной фазы для разделения веществ используется жидкость.

В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа различных по составу подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого количества возникающих на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку многие вещества не обладают летучестью или неустойчивы при высоких температурах. Таким образом, с помощью ЖХ можно разделять и те вещества, которые делят с помощью ГХ, и другие, для которых ГХ не подходит. В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре, однако при работе с белками хроматографию проводят при низких положительных температурах.

Система для **ВЭЖХ** состоит из нескольких блоков: насоса дозатора колонки, детектора и регистрирующего устройства. Наиболее распространенным детектором в адсорбционной ВЭЖХ является спектрофотометрический. В процессе элюирования веществ в микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемых веществ. Такие детекторы измеряют поглощение света в ультрафиолетовой или видимой областях спектра.

Кроме спектрофотометрического детектора широкое распространение получило применение флуориметрического детектора. Принцип его действия

закljučается в измерении флуоресцентного излучения, испускаемого веществом после поглощения возбуждающего света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Многие соединения способны флуоресцировать при облучении ультрафиолетовым светом, например, флавоноиды. Однако наиболее важной областью применения флуориметрического детектора является идентификация ароматических полициклических углеводов.

Масс-спектрометрия является исключительно важным аналитическим методом для идентификации молекул. Он основан на том, что для ионизации молекул используют ионный удар (химическую ионизацию). При ионизации молекулы в вакууме образуется группа характеристических ионов, число которых пропорционально количеству поступающего вещества. Одновременно с записью хроматограммы в любой ее точке, обычно на вершине хроматографического пика, может быть зарегистрирован масс-спектр (зависимость интенсивности ионного тока от массы иона). Масс-спектрометр, в отличие от других спектроскопических детекторов, регистрирует не излучение или поглощение энергии молекулами или атомами вещества, а позволяет определить отношение массы молекул к заряду.

Схема устройства масс-спектрометра включает в себя инжектор (дозатор) проб, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов. Сначала проба впрыскивается в ионизатор, где молекулы образца ионизируются. Затем ионы образца анализируются и регистрируются. Чтобы предотвратить столкновение с молекулами газа, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов обычно работают в вакууме.

Масс-спектрометрия в настоящее время редко используется как самостоятельный метод анализа. Чаше этот метод используется для идентификации результатов жидкостной или газовой хроматографии. Сочетание ГХ или ВЭЖХ и масс-спектрометрии – один из наиболее эффективных методов анализа сложных смесей в объектах окружающей среды.

3 Определение основных групп вторичных метаболитов.

Определение монотерпенов, дитерпенов и сесквитерпенов. Монотерпены и дитерпены являются душистой основой эфирных масел. Для выделения эфирных масел из растительного сырья применяют перегонку с водяным паром или экстракцию в этанол с последующей отгонкой этанола.

Состав эфирных масел определяют органолептически (по специфическому аромату). Кроме того, эфирные масла можно отличить от жирных масел, нанеся каплю исследуемого соединения на фильтровальную бумагу. Эфирные масла высыхают, не оставляя следов. С помощью данной пробы устанавливают примесь липидов в эфирных маслах.

Качество эфирного масла можно оценить растворением его пробы в избытке 70 % этанола. Чистое эфирное масло полностью в нем растворимо. Примесь углеводов в нем проявляется в виде плавающих на поверхности капель, а примесь жирных масел – в виде нерастворимой фазы на дне пробирки.

Количество эфирных масел в растительном материале определяют гравиметрическим методом после их перегонки с водяным паром и осушения безводным хлоридом кальция. Недостатком данного метода является его длительность и потребность в большом количестве растительного материала (примерно 1 кг сырья).

Химический состав монотерпенов и дитерпенов, входящих в состав эфирных масел, определяют с применением методов газовой хроматографии или в сочетании газовой хроматографии с масс-спектрометрией.

Определение каротиноидов. Пробоподготовка. Выделение каротиноидов. Каротиноиды являются липофильными соединениями, поэтому их экстракцию проводят в метанол, этанол, ацетон, хлороформ, гексан, петролейный эфир. Однако вместе с каротиноидами в экстракт переходят липиды и хлорофиллы, мешающие определению каротиноидов. Для устранения мешающих соединений необходимо провести омыление хлорофиллов и липидов добавлением в этанольный экстракт спиртового раствора КОН. Омыление проводят при нагревании на водяной бане. При таких условиях омыления может произойти частичное окисление каротиноидов, поэтому реакцию проводят в атмосфере азота, добавляя аскорбиновую кислоту для предотвращения их окисления.

Суммарное содержание каротиноидов в экстракте легко определить спектрофотометрическим методом по поглощению в синей области спектра. При этом невозможно определить качественный состав извлеченных веществ.

Спектрофотометрические методики являются достаточно простыми и быстрыми. Одно из главных их достоинств состоит в том, что присутствие хлорофиллов не мешает определению каротиноидов.

Качественный состав компонентов можно оценить, снимая спектры поглощения экстракта и идентифицируя компоненты по максимуму поглощения.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – наиболее быстрый и дешевый способ определения индивидуальных компонентов в смеси каротиноидов и полуколичественной оценки их соотношения.

Хроматографию проводят на пластинках с силикагелем в разных системах растворителей. Если проводится ТСХ суммарной фракции пигментов без предварительного омыления, то хроматографию проводят в двух направлениях. В первой системе растворителей отделяют каротиноиды от хлорофиллов. Часто в этом случае в качестве растворителя используют бензин, бензол или петролейный эфир. После первого разделения проводят второе, в перпендикулярном направлении. В этом случае используют другую систему растворителей – смесь гексана с диэтиловым эфиром или ацетоном, что приводит к хорошему разделению каротиноидов.

Качественный состав каротиноидов и их количество определяют после элюирования пятен с пластин и их спектрофотометрии. При этом по максимумам поглощения определяют принадлежность пятна к конкретному соединению, а по поглощению света с длиной волны 440 нм – относительное или абсолютное (после пересчета по формулам) содержание компонента.

ВЭЖХ каротиноидов. Данный метод позволяет надежно определять качественный и количественный состав каротиноидов. Однако при его использова-

нии необходимо тщательно освободить экстракт от хлорофиллов, так как они вызывают загрязнение и порчу хроматографических колонок. Желательно перед ВЭЖХ каротиноидов провести очистку препарата на предколонке с обращенной фазой.

Определение стерина. Стерины входят в состав неомыляемого компонента липидной фракции, а также могут встречаться в гликозилированной форме. Для выделения стерина используют следующий алгоритм: общую липидную фракцию экстрагируют смесью хлороформ:метанол (3 :1), после чего к экстракту добавляют дистиллированную воду, что приводит к разделению экстракта на хлороформную и водно-спиртовую фракцию. В водно-спиртовой фракции находятся гликозиды стерина. Для выделения агликонов необходимо провести их экстракцию из водной фракции в водонасыщенный *n*-бутанол. Далее бутанол выпаривают, а остаток растворяют в 1 Н растворе соляной кислоты в 80 % этаноле. Раствор гидролизуют при температуре не выше 40 °С без доступа воздуха. После окончания гидролиза кислоту нейтрализуют, разводят смесь водой и экстрагируют агликоны стерина в диэтиловый эфир.

Для выделения свободных стерина из липидной фракции используют хлороформную фазу, которую высушивают, после чего растворяют в 10 % растворе КОН в 70 % этаноле, добавляют аскорбат и омыляют на водяной бане. После окончания омыления экстракт разводят водой, нейтрализуют щелочь разбавленной соляной кислотой и экстрагируют стерина в диэтиловый эфир.

Эфирную фракцию высушивают и хранят без доступа воздуха в эксикаторе на холоду. Перед анализом ее растворяют в хлороформе.

Для спектрофотометрического определения суммы стерина используют несколько реакций:

а) реакция с реактивом Либермана-Бурхарда. Хлороформный раствор неомыляемой фракции липидов смешивают с равным объемом реактива, состоящего из уксусного ангидрида с добавлением концентрированной серной кислоты. При этом развивается окрашивание от зеленого до голубого, в зависимости от типа стерина. Концентрацию стерина определяют спектрофотометрическим или колориметрическим методом.

Недостатком данного метода является то, что в экстракте могут находиться мешающие компоненты, которые дают ложно-положительную реакцию. Для избавления от данных артефактов рекомендуется перед проведением реакции провести разделение компонентов с помощью ТСХ и элюировать зону, соответствующую стандарту стерина. Обычно каротиноиды перемещаются с фронтом растворителя, нестероидные компоненты, реагирующие с реактивом, остаются на старте, а стерина находятся в средней части хроматограммы;

б) реакция стерина с формальдегидом и серной кислотой. В данной реакции развивается окрашивание вишневого цвета. Концентрацию стерина определяют спектрофотометрически;

в) определение концентрации стерина по поглощению в УФ-спектре. Данный метод дает ненадежные результаты, так как имеется множество соединений, которые также поглощают свет в УФ-области и мешают анализу.

Газо-жидкостная хроматография стеринов. Метод является наиболее точным и распространенным при анализе стеринов. Однако стерины обладают низкой летучестью, поэтому для эффективной газо-жидкостной хроматографии этих липидов необходимо провести их модификацию путем метилирования диазометаном или борирования.

Определение простых фенолов. Фенолы обладают достаточно высокой растворимостью в воде, однако для полного их извлечения необходимо использовать водно-спиртовые растворы. Сначала проводят экстракцию 70 % этанолом или метанолом. После этого экстракт упаривают в атмосфере азота до водной фракции. Водную фракцию подкисляют 1 М соляной или фосфорной кислотой до pH 3. Далее прибавляют диэтиловый эфир. В кислой среде фенолы переходят в протонированную форму и в таком виде лучше растворяются в эфире, чем в воде. Вместе с фенолами в эфирную фракцию переходят пигменты и липиды. Отбирают эфирную фракцию и добавляют к ней 5 % раствор гидрокарбоната натрия. Фенолы переходят в натриевые соли – феноляты, которые не растворимы в эфире, но растворимы в воде. В эфирной фракции остаются мешающие компоненты (пигменты и липиды). Эту фракцию отбрасывают. Далее раствор гидрокарбоната натрия подкисляют до прекращения выделения пузырьков углекислого газа. В кислой среде феноляты вновь протонируются до свободных фенолов. Затем к раствору добавляют новую порцию эфира. В эфир переходят свободные фенолы, а в растворе остаются примеси, включая ионы натрия. Эфирную фракцию отбирают и высушивают. Сухой остаток растворяют в этаноле или в воде и используют в дальнейшей работе.

Спектрофотометрическое определение фенолов. К спиртовому или водному раствору добавляют последовательно реактив Фолина-Чокальтеу и 20 % раствор карбоната натрия. Через час развивается синяя окраска. Оптическую плотность раствора определяют спектрофотометрически при 725 нм. В некоторых случаях происходит помутнение раствора. Тогда необходимо провести центрифугирование образца, а потом – спектрофотометрию.

Хроматография на бумаге является одним из распространенных способов хроматографического разделения веществ, в том числе фенолов.

Для определения индивидуальных фенолов на хроматограмме ее высушивают, просматривают в УФ-свете. При этом фенолы флуоресцируют пятнами различного цвета, чаще всего синего и голубого. Далее хроматограмму выдерживают над 25 % раствором аммиака. При этом может наблюдаться изменение цвета флуоресценции и появление новых пятен. На заключительном этапе хроматограмму обрабатывают спиртовым раствором хлорида алюминия или хлорида железа (III). Фенолы проявляются в виде серо-зеленых пятен на белом фоне или синих и красных пятен на желтом фоне. Идентификацию проводят по значениям R_f , флуоресценции и цвету пятна после обработки реактивом. Пятна, соответствующие отдельным фенолам, можно элюировать с хроматограммы и провести количественное определение с реактивом Фолина-Чокальтеу.

Определение кумаринов. Экстракцию кумаринов проводят так же, как при выделении простых фенолов.

Качественной реакцией на кумарины является реакция взаимодействия с гидроксидом натрия. К исследуемой пробе добавляют раствор гидроксида натрия, нагревают, оценивают развитие окраски в пробе. В присутствии кумаринов развивается желтая окраска.

Количественное определение кумаринов основано на спектрофотометрическом анализе окрашенного продукта взаимодействия кумаринов с п-нитроанилином, диазотированной сульфаниловой кислотой. В данной реакции образуется продукт вишнево-красного цвета.

Определение флавоноидов. Сухой растительный материал обрабатывают четыреххлористым углеродом или низкокипящим петролейным эфиром. Данная операция приводит к удалению восков и смол, что облегчает экстрагирование флавоноидов. Далее проводят экстракцию этиловым или метиловым спиртом.

Для получения чистых препаратов флавоноидов к экстракту добавляют раствор основного или среднего ацетата свинца. При этом выпадает осадок от ярко-желтого до красного цвета. Осадок центрифугируют, промывают, ресуспендируют в этаноле. Свинец в пробе осаждают пропусканием экстракта через раствор сероводорода. При этом образуется чистый препарат флавоноидов, которые можно перекристаллизовать.

Спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов. Метод основан на батохромном сдвиге: в результате реакции растворы приобретают более яркую желтую или зеленоватую окраску. Наиболее часто для спектрофотометрического определения флавоноидов используют спиртовой раствор хлорида алюминия, или борно-лимонный реактив. Особое внимание следует обратить на то, что растворы флавоноидов окрашены сами по себе и могут менять интенсивность окраски в зависимости от pH. Поэтому при спектрофотометрировании в качестве раствора сравнения надо использовать исходный раствор образца при том же значении pH, что и исследуемый образец после реакции.

Наличие бледно-желтой окраски дает возможность определения содержания флавоноидов по поглощению в ультрафиолетовой области спектра. Кроме того, возможно определение их качественного состава путем сравнения спектров поглощения в УФ-области.

Хроматографическое разделение флавоноидов и идентификация функциональных групп. Для разделения смеси флавоноидов и их идентификации может быть применима как хроматография на бумаге, так и ТСХ на силикагеле. Рекомендуется использовать систему растворителей н-бутанол:уксусная кислота : вода (в соотношении 4:1:5). Пятна флавоноидов обнаруживаются в ультрафиолетовом свете.

Известен ряд реактивов для обработки хроматограмм и определения состава флавоноидов:

-реактив Вильсона (раствор борной и безводной лимонной кислоты в безводном метаноле). После обработки реактивом хроматограмму просушивают при 110 °С. Зелено-желтая флуоресценция в УФ-свете показывает наличие 5-оксифлавонов. 5-окси- и 5-метоксифлавонолов. Желтая флуоресценция говорит о присутствии 5-окси- и 5-метоксихалконов:

-реактив Мартини-Беттолло (раствор пятихлористой сурьмы в четыреххлористом углероде). Желтая и оранжевая окраска указывает на наличие флавонов, изофлавонов, флавонолов, флавононов. Красная и фиолетовая окраска говорит о присутствии халконов.

Определение антоцианов. Антоцианы легко экстрагируются 70-80 % этанолом или метанолом. При этом экстрагируются как свободные антоцианы, так и их гликозиды. В том случае, когда нет необходимости в изучении гликозидированных форм, экстракцию проводят в спирт содержащий 0,1 М соляную кислоту. Некоторые авторы советуют экстрагировать антоцианы подкисленным спиртом при нагревании на водяной бане для полного гидролиза гликозидов. После этой процедуры необходимо развести раствор водой и провести переэкстракцию антоцианов в изоамиловый спирт. При этом достигается не только более высокая чистота препарата, но и происходит концентрирование антоцианов.

Спектрофотометрическое определение антоцианов. Концентрацию антоцианов определяют по поглощению в видимом свете. Иногда бывает достаточно произвести экстракцию водным раствором соляной кислоты. Если концентрация антоцианов низкая, то их можно сконцентрировать переэкстракцией с использованием изо амилового спирта.

Спектрофотометрия в кислой среде является обязательным условием, так как при этом большинство антоцианов имеет близкие максимумы поглощения.

Качественный состав антоцианов может быть определен путем сравнения максимумов поглощения отдельных компонентов экстракта после хроматографического разделения.

Хроматографию антоцианов проводят в тех же условиях, что и хроматографию других флавоноидов. При этом антоцианы обнаруживают по собственному окрашиванию.

Самым эффективным и точным методом определения антоцианов в настоящее время является ВЭЖХ – МС.

Определение дубильных веществ. Для определения дубильных веществ используют качественные реакции:

- реакция Стиасни – с 40 % раствором формальдегида и концентрированной HCl. Конденсированные дубильные вещества образуют осадок кирпично-красного цвета:

- реакция с бромной водой. К 2-3 мл испытуемого раствора прибавляют по каплям бромную воду до появления в растворе запаха брома. В присутствии конденсированных дубильных веществ образуется оранжевый или желтый осадок;

- при окрашивании солями трехвалентного железа или железо-аммонийными квасцами дубильные вещества гидролизуемой группы, являющиеся производными пирогаллола, дают черно-синий цвет, а дубильные вещества конденсированной группы, являющиеся производными пирокатехина, – черно-зеленый цвет;

- с раствором желатина дубильные вещества дают осадок, растворимый в избытке желатина:

- катехины дают красное окрашивание с ванилином (в присутствии концентрированной HCl или 70 % H_2SO_4 ;

- свободная эллаговая кислота дает красно-фиолетовую окраску при добавлении нескольких кристаллов нитрита натрия и трех-четырех капель уксусной кислоты:

- реакция с 10 % раствором среднего ацетата свинца (одновременно добавляют 10 % раствор уксусной кислоты) – образуется белый осадок. Осадок, не растворимый в уксусной кислоте, дают дубильные вещества гидролизуемой группы, а растворимый в уксусной кислоте – дубильные вещества конденсированной группы.

Для количественного определения дубильных веществ используют гравиметрический, титриметрический и спектрофотометрический методы.

Гравиметрический метод основан на способности желатина осаждать дубильные вещества из раствора. Существенным недостатком данного метода является возможность растворения осадка при избытке желатина. Этот эффект используется в другом методе определения дубильных веществ – титриметрическом (желатиновом).

Определение алкалоидов. Поскольку алкалоиды представляют в большей мере разнородную по химической природе группу, то нет универсальной методики их экстракции из растительного сырья и очистки. Чаще всего при экстракции алкалоидов используют их основные (базофильные) свойства. На первом этапе растительное сырье замачивают и растирают в растворе уксусной, лимонной или соляной кислот. При этом алкалоиды переходят в растворимые в воде соли. В раствор также переходят углеводы и минеральные вещества. После фильтрования раствор нейтрализуют аммиаком (сильные основания использовать не рекомендуется, так как это приводит к образованию фенолятов, мешающих дальнейшей очистке алкалоидов). В слабощелочной среде алкалоиды переходят из солей в свободную форму. Из раствора их экстрагируют диэтиловым эфиром, хлороформом или бензолом. Органический экстракт упаривают. Сухой остаток используют для дальнейших определений.

Качественные реакции на алкалоиды. Как уже было отмечено, алкалоиды – это сборная группа вторичных веществ, включающая соединения с разными функциональными группами. Поэтому не существует общих методов качественного и количественного анализа алкалоидов. В качественном анализе применяют от 5 до 10 общих реакций на алкалоиды. В количественном анализе применяют те же реагенты, что и в качественном. Алкалоиды определяют в виде их нерастворимых соединений гравиметрическим методом либо в форме окрашенных производных.

Йод-калий йодид (реактив Вагнера) образует с алкалоидами осадки от светло-коричневого до темно-бурого цвета.

Висмут-йодид с йодидом калия (реактив Драгендорфа) с алкалоидами в солянокислой или сернокислой среде дает аморфные осадки оранжево-красного цвета (теобромин образует кристаллический осадок).

Фосфорно-молибденовая кислота (реактив Зонненшейна) вызывает образование осадка уже в очень разбавленных (нейтральных или кислых) растворах

солей алкалоидов и является одним из самых чувствительных реагентов. Осадки окрашены в светло-желтый или буро-желтый цвет и часто изменяют окраску на синюю или зеленую в результате восстановления молибденовой кислоты. Некоторые из осадков растворяются в растворе аммиака, иногда с характерной синей окраской, например, в присутствии берберина и кониина, и зеленой – в присутствии бруцина и кодеина.

Калий-йод-меркурат (реактив Майера) дает с большинством солей алкалоидов в нейтральной или слабокислой среде беловатые или желто-белые осадки: не осаждает колхицин, кофеин и соланин.

10 % раствор таннина (свежеприготовленный) с большинством солей алкалоидов образует в нейтральной и в слабокислой среде желтоватые осадки, растворимые в спирте, уксусной кислоте и растворах аммонийных солей.

1 % водный раствор пикриновой кислоты осаждает большинство солей алкалоидов в виде пикратов желтого цвета в аморфном или кристаллическом состоянии. Большинство алкалоидов осаждается из разведенных сернокислых растворов. Аконитин, атропин, кокаин и гиосциамин частично осаждаются только из более концентрированных сернокислых растворов.

ТЕМА 14. БИОТЕХНОЛОГИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ

1 Типы культур клеток и тканей растений.

2 Использование культуры клеток и тканей для получения вторичных метаболитов.

3 Биотехнологии вторичных метаболитов на основе культур клеток и тканей растений.

1 Типы культур клеток и тканей растений.

Термин «культура клеток, тканей и органов растений» применяется к следующим асептически выращиваемым частям растения: изолированным зародышам, изолированным органам (кончики корней, меристемы побегов, листовые примордии, части молодых цветков и плодов), каллусной ткани, суспензионной культуре, культуре протопластов.

Эксплант (лат. *explanto* – вырываю что-нибудь, растущее с корнем) – группа клеток, отделенная от материнского организма. У двудольных растений, эксплантами могут являться, например, части гипокотилей, стеблей, корней, семядоли, пыльники и прочее. При культивировании эксплантов на питательных средах различного состава, можно наблюдать каллусогенез или органогенез (образование корней, побегов и пр.)

Набор объектов растительного происхождения, которые можно перевести в культуру *in vitro*, достаточно широк. Как правило, большинство исследований проводится с эксплантами разных органов, тканей и клеток семенных растений. Это можно объяснить большой ролью в жизни человечества покрыто- и голосеменных растений. Среди них наиболее удобными объектами для культивирования являются двудольные травянистые растения, затем следуют однодольные

травянистые виды и зерновые культуры. Труднее создать условия для стабильных *in vitro* культур древесных растений, особенно голосеменных.

В качестве объектов, используемых для культивирования *in vitro*, также могут выступать мхи, лишайники и папоротники. Многоклеточные водоросли трудны для поддержания их в культуре, хотя они, несомненно, перспективны в качестве источников фитопродуктов для медицины, пищевой промышленности и других биотехнологий. Большое внимание биологи отводят выращиванию микроводорослей.

В настоящее время нет такого высшего растения, из которого нельзя получить культивируемые клетки и ткани. Однако выращиваемые поверхностным способом на агаризованной питательной среде каллусные ткани и растущие в жидкой питательной среде суспензионные клеточные культуры требуют создания разных условий для роста в случае различных таксонов.

В основе метода культуры клеток и тканей растений лежит уникальное свойство растительной клетки – *тотипотентность*.

Тотипотентность – это способность клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма.

В отличие от животных в природных условиях у растений тотипотентность могут проявлять и специализированные клетки, например, при заживлении ран. В этом случае на раневой поверхности растения в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит развитие *каллуса* (лат. «мозоль»). Образование каллуса можно наблюдать при прививках в местах срастания привоя и подвоя. Каллус первоначально состоит из недифференцированных клеток.

Однако в природных условиях растения ряда систематических групп тотипотентность не проявляют. Ввиду высокой специализации клеток многие однодольные растения утратили способность к раневой реакции и вегетативному размножению.

Метод культуры клеток и тканей растений в настоящее время широко используется для решения ряда теоретических и практических задач биологии. Это обусловлено тем, что данный метод имеет следующие преимущества:

- простота клеточных моделей;
- отсутствие коррелятивных взаимодействий и контроля со стороны других тканей, органов, целого организма, что позволяет проследить состояние клетки на уровне первичных элементарных процессов в ответ на любые воздействия;
- возможность быстро получать достаточную массу в асептических условиях;
- контролируемые по многим параметрам условия выращивания.

2 Использование культуры клеток и тканей для получения вторичных метаболитов.

Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения. Растения отличаются от бактерий и особенно

животных поразительным многообразием синтетических процессов. Количество биологически активных соединений, синтезируемых растениями, огромно. Все они, как правило, относятся к продуктам вторичного (специализированного) обмена. Вторичные метаболиты характеризуются таксономической специфичностью. Основное их назначение заключается в обеспечении биохимической адаптации растений к существованию в биоценозах. Так, среди вторичных метаболитов обнаружены соединения с аллелопатическими, инсектицидными, фунгицидными, бактерицидными свойствами, а также фитоалексины и вещества, подобные гормонам животных.

Особый интерес для человека представляют те биологически активные соединения, которые могут быть использованы в медицине, технике, пищевой и парфюмерной промышленности, сельском хозяйстве.

Если для получения ценных БАВ традиционно использовались целые организмы (микроорганизмы, растения, животные), то современная биотехнология нацелена на клеточные технологии, основанные на культивировании свободных и иммобилизованных клеток.

Как альтернативные источники БАВ растительного происхождения клеточные культуры обладают следующими преимуществами:

- получение экологически чистых продуктов независимо от климата, сезона, погоды;
- создание клеточных линий-сверхпродуцентов путем генетических манипуляций;
- сохранение пула генов редких и исчезающих растений-продуцентов;
- возможность оптимизировать и стандартизировать условия выращивания;
- возможность автоматизации процессов.

На рисунке показаны основные аспекты применения культур клеток растений в качестве продуцентов БАВ.

Благодаря усилиям многих исследователей накоплено немало ценной информации о способности культивируемых растительных клеток синтезировать многие традиционные экономически важные продукты: терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, необычные пептиды и специализированные белки, натуральные красители, стероиды, пряности, инсектициды, воски, витамины. Также доказана возможность культур клеток осуществлять биотрансформацию, то есть синтезировать некоторые БАВ из дешевых и доступных их предшественников. Эти «полупродукты» вторичных метаболитов не могут быть преобразованы химическим или микробиологическим путем, и только благодаря активности ферментов клеток растений в культуре происходит их превращение в ценный конечный продукт.

Перевод клеток в условия *in vitro* может также приводить к синтезу совершенно новых соединений с принципиально другим механизмом действия. Например, японские исследователи добились успехов в получении таких новых БАВ, как необычные пептиды, антиканцерогенные соединения, убихинон-10 и др.

Популяциям культивируемых *in vitro* растительных клеток присущи определенные особенности протекания процессов вторичного метаболизма.

Важной их характеристикой является степень стабильности в отношении синтеза, транспорта и депонирования физиологически активных соединений. Высокая биосинтетическая способность может сохраняться в течение всего времени существования популяции. Однако известны примеры постепенного (в течение нескольких лет) увеличения числа клеток со сниженным синтезом метаболитов. В случае полной «нестабильности» клетки в популяции очень быстро теряют способность к синтезу вторичных метаболитов, что связано с прекращением *in vitro* экспрессии генов, участвующих в образовании БАВ.

В растительном организме синтез метаболитов, их транспорт и отложение в запас зачастую разделены во времени и осуществляются в разных органах растения. Например, алкалоид никотин, который синтезируется в корнях табака, а уже оттуда поступает в листья, где и накапливается. В условиях *in vitro* все стадии вторичного метаболизма – от синтеза до депонирования – обычно проходят в одной клетке.

Эпибласты и млечники, в которых может осуществляться отложение различных веществ, являются редкими структурами в каллусных культурах.

Одной из особенностей популяций культивируемых растительных клеток является различная степень корреляции синтеза вторичных метаболитов с процессами дифференцировки. В организме растения вторичный метаболизм присущ только дифференцированным клеткам, специализированным органам и протекает только на определенных этапах их развития. Каллусные культуры зачастую характеризуются низким содержанием искомого вещества, что, по-видимому, вызвано отсутствием дифференциации ткани. Однако это неабсолютное правило.

Появляется все больше данных, что органогенез в культуре не является необходимым условием для биосинтеза вторичных метаболитов *in vitro*. Например, органогенез иногда сопровождается снижением содержания продуктов вторичного обмена веществ. Также неоднозначны данные о взаимосвязи их накопления с фазами ростового цикла клеточных культур. У многих видов при периодическом режиме выращивания вторичные метаболиты накапливаются в значительных количествах лишь при замедлении или остановке роста. Предполагается, что механизмы и условия, блокирующие деление клеток и активный рост, могут одновременно являться и механизмами активации, обеспечивающими синтез ферментов вторичного метаболизма. Однако известны такие культуры, у которых синтез продукта способствует росту клеток. В любом случае, на первом этапе культивирования стараются создать оптимальные условия для роста, то есть накопления биомассы, а затем исследуют влияние этих условий на биосинтез вторичных метаболитов.

3 Биотехнологии вторичных метаболитов на основе культур клеток и тканей растений.

Накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений зависит от ряда факторов. Во-первых, выход продукта определяется генотипом донор-

ного растения, правильным выбором его ткани или органа для введения в культуру. В большинстве случаев это главное условие, определяющее качество получаемого продукта. Как правило, высокий выход продукта наблюдается в культурах, инициированных из высокопродуктивных растений. Выбор органа также имеет немаловажное значение. Например, содержание стероида диосгенина в культуре клеток *Dioscorea floribunda*, полученной из клубня, было на порядок выше, чем в культуре клеток, полученной из побега.

Во-вторых, на выход продукта влияет гетерогенность культивируемых клеток по способности к синтезу вторичных метаболитов. Как отмечалось ранее, у культивируемых *in vitro* клеток могут происходить значительные изменения вторичного метаболизма по сравнению с интактными растениями. Одной из причин изменения интенсивности вторичного метаболизма в культуре клеток выступает генетическая их гетерогенность. Вместе с тем гетерогенность клеточной популяции может играть положительную роль, позволяя отбирать линии клеток с повышенным синтезом искомого продукта или синтезирующие совершенно новые вещества.

В-третьих, в качестве факторов, оказывающих влияние на накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений, выступают состав питательной среды и физические условия культивирования.

Важнейшими компонентами питательных сред, эффективно регулируемыми и первичный, и вторичный обмен клеток, являются фитогормоны. Показано, что характер влияния фитогормонов зависит от вида растения, природы вторичного соединения, клеточного штамма и т.д. Поэтому результаты экспериментов по выяснению воздействия фитогормонов на синтез вторичных метаболитов крайне противоречивы. При изучении влияния 146 соединений с ауксиновой активностью на рост и образование антрахинонов в культуре клеток моринды лимоннолистной было установлено, что многие регуляторы поддерживали хороший рост клеток, но только два: НУК и 2,3,6–трихлорбензойная кислота, наряду со стимуляцией роста, способствовали образованию антрахинонов.

Увеличение выхода вторичных метаболитов во многих случаях наблюдается при повышении концентрации сахарозы в питательной среде. Вместе с тем высокое ее содержание приводит к возрастанию осмотического потенциала, что может оказывать неблагоприятное влияние на метаболизм культивируемых клеток. Нельзя не учитывать, что увеличение содержания сахарозы в среде удорожает производство, поэтому поиск дешевых углеводных добавок остается актуальным.

Среди других компонентов питательной среды регулирующее воздействие на накопление вторичных метаболитов могут оказывать источники азота, фосфора и калия. Однако характер их влияния значительно различается в зависимости от вида растения и синтезируемого соединения. Так, если у одних культур присутствие органических форм азота в среде тормозит накопление вторичных метаболитов, то у других – повышает их синтез. Установлено, что недостаток фосфора в среде стимулирует синтез многих БАВ, хотя очень низ-

кие его концентрации будут подавлять процессы энергетического метаболизма и, следовательно, снижать накопление вторичных метаболитов.

Положительный эффект на биосинтез вторичных веществ оказывает наличие в среде некоторых предшественников самих искомым соединений. Это могут быть аминокислоты (глутамат, фенилаланин, лейцин, орнитин и др.) и органические кислоты (ацетат, сукцинат, шикимовая и др.). Однако не всегда их внесение вызывает увеличение выхода продукта. Отсутствие желаемого эффекта можно объяснить разными причинами: предшественники не поглощаются клетками, происходит их распад в процессе приготовления и стерилизации сред или же они переходят в другие физиологически неактивные формы. Не исключено, что некоторые предшественники могут оказывать побочные эффекты на рост культуры, в частности, ингибировать его.

Во многих случаях буферная емкость питательных сред является достаточно низкой, поэтому величина исходного рН при культивировании быстро сдвигается на несколько единиц, а это, в свою очередь, сказывается на биосинтетических свойствах культивируемых клеток. Например, в культуре клеток *Ipomea*, которая биотрансформирует триптофан в различные метаболиты индольной природы, выход такого продукта как триптанол значительно увеличивается при рН 6,3 и полностью подавляется при рН 4,8. Поэтому поддержание кислотности питательной среды на определенном уровне также является важным фактором, от которого зависит образование БАВ в культуре. Следует отметить, что оптимизация состава питательной среды является ключевым условием для повышения выхода продукта. В результате подобных исследований разрабатываются так называемые продукционные среды, на которых культивируемые клетки синтезируют значительное количество вторичных метаболитов.

Физическими факторами, влияющими на накопление БАВ клетками, являются освещенность, температура, аэрация и режим перемешивания в случае суспензии, а также состав газов в колбах. Стимулирующее действие света на образование вторичных соединений в культуре клеток показано на примере каротиноидов, эфирных масел, коричных масел, флавоноидов, пластохинонов, антоцианов, катехинов, алкалоидов, витаминов. При этом имеет значение и качество света. Однако в некоторых случаях свет оказывал ингибирующее действие, подавляя синтез вторичных метаболитов.

Данных о влиянии температуры на рост и процессы биосинтеза в клеточных культурах очень мало, но поскольку температура влияет на вторичный метаболизм интактных растений, исследования в этом направлении являются достаточно необходимыми. Тем более, что оптимумы температуры для роста культуры клеток и процессов биосинтеза БАВ не всегда совпадают.

Для получения вторичных метаболитов из суспензионных культур важны также аэрация и скорость перемешивания. Так, в культуре клеток табака увеличение скорости перемешивания приводило к повышению выхода никотина.

В целом следует отметить, что накопление клетками продуктов вторичного метаболизма является результатом динамического равновесия между биосинтетическим, биотрансформационным и биodeградационным процессами. Влияние внешних и внутренних факторов на каждый из этих процессов имеет

сложный характер, и зачастую из-за отсутствия фундаментальных знаний с трудом поддается прогнозированию. Поэтому следует признать оправданным тот эмпирический подход при изучении влияния факторов культивирования на накопление вторичных веществ, который продолжает использоваться и в настоящее время.

Биотехнологическое производство вторичных метаболитов растений осуществляется преимущественно при культивировании клеточных суспензий. Очень большое значение для их роста и образования целевых продуктов имеют технические характеристики систем культивирования.

Длительное время для создания технологий промышленного выращивания суспензионных культур применялась аппаратура, разработанная для микробиологической промышленности. Однако исследования последних лет показали, что растительные клетки в силу своих специфических особенностей требуют особых сосудов для культивирования. Клетки растений в десятки, сотни раз крупнее клеток бактерий и грибов, кроме того, их размеры меняются в процессе онтогенеза. Если в начале экспоненциальной фазы роста они мелкие и плотные, то в стационарной фазе роста они сильно увеличиваются в размерах и вакуолизируются. Чем крупнее становится клетка, тем больше возрастает опасность ее механического повреждения. В то же время клетки растений крупные и тяжелые требуют эффективного перемешивания.

В зависимости от принципа перемешивания культуральной жидкости биореакторы подразделяются на два больших типа по своей конструкции.

В биореакторах первого типа перемешивание осуществляется только путем аэрирования воздухом. При этом в барботажных биореакторах – за счет поднимающихся пузырьков воздуха, а в аэролифтных – с применением специальной конструкции с внутренним цилиндром, создающей градиент плотности суспензии (рисунок).

Для биореакторов второго типа характерно наличие механических перемешивающих устройств.

- Использование биореакторов для исследования популяций растительных клеточных имеет следующие преимущества:

- большой объем культивационного сосуда позволяет, не внося существенных возмущений, отбирать пробы большого объема, что очень важно при анализе вторичных метаболитов, часто содержащихся в очень низких концентрациях;

- возможность управления процессом культивирования по определенному алгоритму на основе показаний датчиков, установленных в биореакторах.

Вместе с тем культивирование клеточных суспензий в биореакторах связано и с некоторыми проблемами:

- оседанием клеток вследствие недостаточного перемешивания, что приводит к появлению «мертвых» зон в сосудах, в которых происходит быстрое накопление и старение клеток;

- увеличением вязкости суспензии вследствие роста биомассы, приводящим к адгезии – прилипанию клеток друг к другу, поверхности культурального сосуда, погруженных в него мешалок и датчиков;
- образованием в верхней части сосуда «корки» или «безе», состоящей из полисахаридов, белков, слипшихся клеток и снижающей эффективность перемешивания, что в конце концов может привести культуру к гибели.

В настоящее время наиболее приемлемым способом получения больших количеств вторичных метаболитов растений является двустадийное культивирование. Его первая стадия связана с образованием больших количеств биомассы культивируемой суспензии, а вторая предполагает создание условий для активного биосинтеза необходимых продуктов. Обеспечив благоприятные условия культивирования на обеих стадиях *in vitro* можно добиться получения выхода вторичного метаболита в количестве, синтезируемом *in vivo*, а иногда и выше.

Большой интерес представляет также развитие методов иммобилизации культивируемых клеток и биотрансформации ими метаболитов. Суть иммобилизации состоит в заключении живых клеток в определенный носитель. Затем через носитель с клетками пропускают питательную среду. При этом клетки прекращают рост, но могут достаточно долго оставаться живыми и продуцировать необходимые вещества.

Клетки могут быть иммобилизованы 4 способами:

- иммобилизация в инертном субстрате, т.е. обволакивание клеток одной из различных цементирующих сред (альгинат, агар, полиакриламид, коллаген или комбинация гелей);
- адсорбция клеток на инертный субстрат;
- адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул;
- ковалентное связывание клеток с каким-либо инертным субстратом типа карбоксилметилцеллюлозы.

Вокруг физически неподвижных иммобилизованных клеток могут циркулировать большие объемы питательной среды, регулируя состав которой, замедляют рост клеток и тем самым повышают выход вторичных продуктов.

Поскольку клетки в иммобилизованном виде культивируются длительное время, то для этого используются клетки, которые сами, естественным путем, секретируют необходимые метаболиты в питательную среду или могут быть индуцированы к такой секреции какими-либо приемами, например, воздействием низких температур и растворителей. Клетки, которые накапливают искомый продукт внутри, например, в вакуолях или пластидах, не пригодны для иммобилизации.

Иммобилизованные клетки могут быть использованы не только для синтеза, но и для биотрансформации различных соединений. Очень часто растения или культуры клеток растений не доводят синтез метаболита до наиболее важного продукта, и тогда можно использовать процесс биотрансформации. В качестве примера можно привести использование суспензии клеток наперстянки,

синтезирующей дигитоксин, тогда как для медицинских целей нужен дигоксин. Сердечный гликозид дигоксин обладает большим терапевтическим эффектом по сравнению с дигитоксином, которого в растениях содержится значительно больше. Дигоксин отличается от дигитоксина лишь по наличию дополнительной гидроксильной группы. Недифференцированные культуры клеток наперстянки шерстистой не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять определенную реакцию биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду.

Биотрансформация необходима для гликозилирования фенольных продуктов корня женьшеня *in vitro*. Культура клеток женьшеня корневого происхождения активно трансформирует фенольные вещества (гликозилирует и гептозилирует), модифицирует ароматические карбокислоты.

Другим примером служит биотрансформация монотерпеновых соединений (компонентов эфирных масел) культурами клеток разных видов мяты. Путем биотрансформации можно значительно изменить качественный состав компонентов эфирного масла мяты. В частности, эффективна биотрансформация пулегона в более ценные компоненты (ментол) в культуре клеток *Mentha canadensis*.

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы. Работа по созданию клеточных технологий для получения вторичных метаболитов в настоящее время включает следующие этапы:

1. Экономически обоснованный выбор объекта. Растения, выбранные для введения в культуру, должны содержать значительные количества экономически важных вторичных соединений. Особенно это относится к исчезающим видам растений.

2. Первичное введение тканей в культуру. Для этих целей отбираются отдельные растения, обладающие наибольшим содержанием искомого вещества. Обычно вначале получают каллусы на твердой среде.

3. Биохимическое изучение биомассы по качественному и количественному составу вторичных метаболитов. Определение очень низких концентраций метаболитов в медленно растущих клетках представляет большую трудность. Поэтому в качестве экспресс-методов оценки продуктивности каллусных культур в последнее время применяют радиоиммунохимический и иммуноферментный методы. Последний имеет преимущества благодаря более высокой скорости проведения анализов и возможности их автоматизации.

4. Оптимизация сред и параметров выращивания. Для реализации генетической информации, детерминирующей вторичный обмен, требуются специфические условия. Поскольку нет твердой уверенности в том, что используемые питательные среды полностью отвечают потребностям клеток, в каждом конкретном случае приходится подбирать состав среды и определять влияние других факторов, опираясь на имеющийся опыт. Эта задача еще более усложняется при переводе культуры в жидкую среду, так как при этом следует учитывать влияние факторов аэрации и перемешивания.

5. Создание продуктивных штаммов клеток. Получение гомогенной популяции клеток с высоким содержанием тех или иных вторичных веществ –

сложная задача, так как популяции длительно культивируемых клеток даже полученные клонированием одной высокопродуктивной клетки, могут терять способность к синтезу ценного соединения. Для поддержания на высоком уровне способности культуры к видоспецифическим биосинтезам, помимо оптимизации условий выращивания, требуются значительные усилия, включая проведение с ней генетических манипуляций и клеточную селекцию. Для организации рентабельного крупномасштабного производства на основе клеточной технологии нужны мутанты, синтезирующие гормоны, нетребовательные к питательным средам, а также устойчивые к осмотическому и механическому стрессу. Наиболее эффективным приемом создания продуктивных штаммов является искусственное конструирование клеток методами клеточной и генной инженерии, которым принадлежит будущее.

6. Первичное использование лучших штаммов в суспензионной культуре. Каллусные клетки, первоначально полученные на твердой среде, переводят в жидкую среду. Изменение режима культивирования не должно приводить к потере штаммом своих положительных качеств, т.е. штамм должен быть устойчив к стрессовым условиям культивирования. Особенно это касается момента переноса клеток из условий лабораторного эксперимента в небольших колбах в ферментеры крупных размеров.

7. Выращивание продуктивной и устойчивой культуры в условиях, приближающихся к производственным, в ферментерах с последующим увеличением их емкости. Если в таких полупромышленных условиях культивируемые клетки сохраняют высокие скорости роста и биосинтеза искомого вещества, накапливают его без деградации и в значительных количествах выделяют в среду, то такой штамм пригоден для организации крупномасштабного производства. Кроме того, важным качеством штамма является его генетическая стабильность.

8. Составление технического регламента на производство биомассы клеточной суспензии и его оценка. Производственная технология требует соответствующей аппаратуры, которой располагает, в частности, Япония. Так, в 20 000-литровом ферментере в непрерывной культуре в течение трех месяцев выращивались клетки табака, продуцировавшие убихинон с продуктивностью по биомассе 5,582 г/л в день. Там также налажено крупномасштабное производство и других вторичных метаболитов.

В настоящее время в разных странах для получения экономически важных веществ используются культуры клеток около ста видов растений, среди которых – женьшень, раувольфия змеиная, наперстянка шерстистая и пурпурная, диоскорея дельтовидная, воробейник, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, амми зубная, мак снотворный и др.