

Sekundární metabolity rostlin 11.

Definice Příklady a využití Biotechnologie



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Primární metabolity

sloučeniny, které jsou nutné při základních procesech, které udržují rostliny při životě

(stavba těla a metabolismus)

nukleové kyseliny

uhlohydráty

bílkoviny

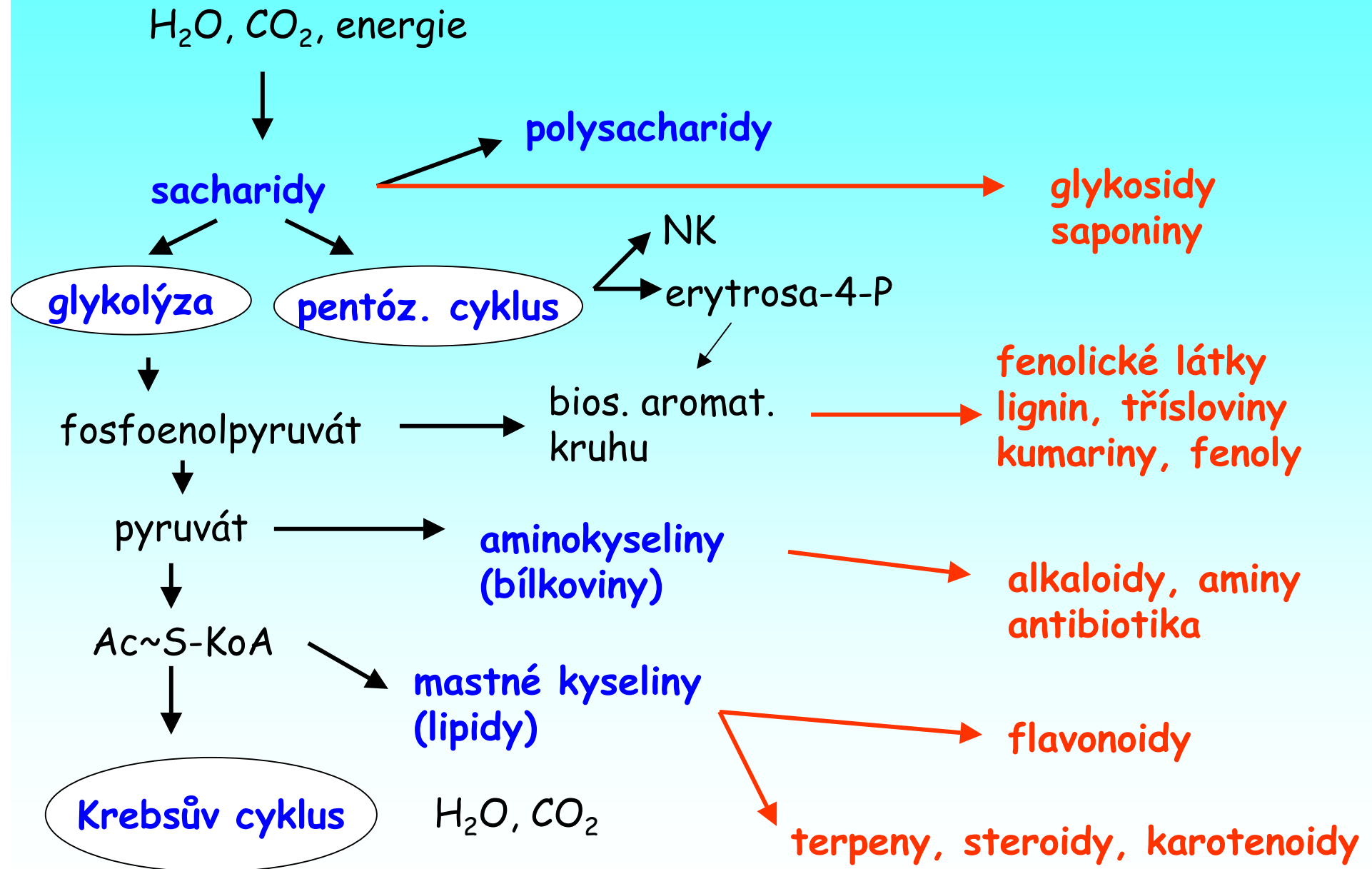
lipidy

Sekundární metabolity

- rostlinami produkované sloučeniny, které **nejsou nezbytné** pro základní životní funkce
- jejich biosyntéza navazuje na primární metabolismus a jejich význam není vždy jasný

Primární metabolismus

Sekundární metabolismus



Funkce sekundárních metabolitů

1. **ekologická: chemická ochrana proti mikroorganismům**
(baktericidní účinky, fungicidní účinky)
chemická ochrana proti živočichům - repelentní efekt
(hořká chuť, zápach, toxicita)
2. **regulační**
3. **produkty detoxikačního metabolismu**

Některé skupiny sekundárních metabolitů

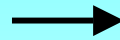
(Harborne 1993)

druh	přibližný počet
antibiotika	6 000
alkaloidy	10 000
flavonoidy	4 000
saponiny	600
monoterpeny	1 000
seskviterpeny	3 000

Využití sekundárních metabolitů

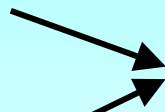
průmysl:

farmaceutický
(25% léčiv)



antibiotika, cytostatika,
kardiaka, diuretika

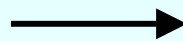
potravinářský



barviva a vonné látky

kosmetický

zemědělství



insekticidy, herbicidy

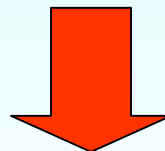
Nevýhody získávání sekundárních metabolitů

z intaktních rostlin

- úbytek rostlin na přírodních stanovištích
- závislost obsahových látek na vnějších podmínkách (klíma, minerální výživa, ozáření, dostupnost vody) = kolísání obsahu a nebezpečí znečištění

chemickou syntézou

- často obtížné a drahé
- výsledkem chemických syntéz = směs izomerů



snaha o biotechnologickou produkci

Využití tkáňových a buněčných kultur pro produkci sekundárních metabolitů

množení rostlin - nahrazuje úbytek z přírodních lokalit

produkce sekundárních metabolitů *in vitro*

kalusy

buněčné suspenze

kultury orgánů

Výhody

1. řízené prostředí bez klimatických vlivů
2. absence mikroorganismů a škůdců
3. možnost selekce produktivních linií
4. automatizace (bioreaktory) - definovaná kvalita, pokles výrobní ceny, kontinuální produkce

Obecná metodologie biotechnologických postupů pro produkci SM (ZENK 1978)



Vinca rosea, barvínek z Madagaskaru

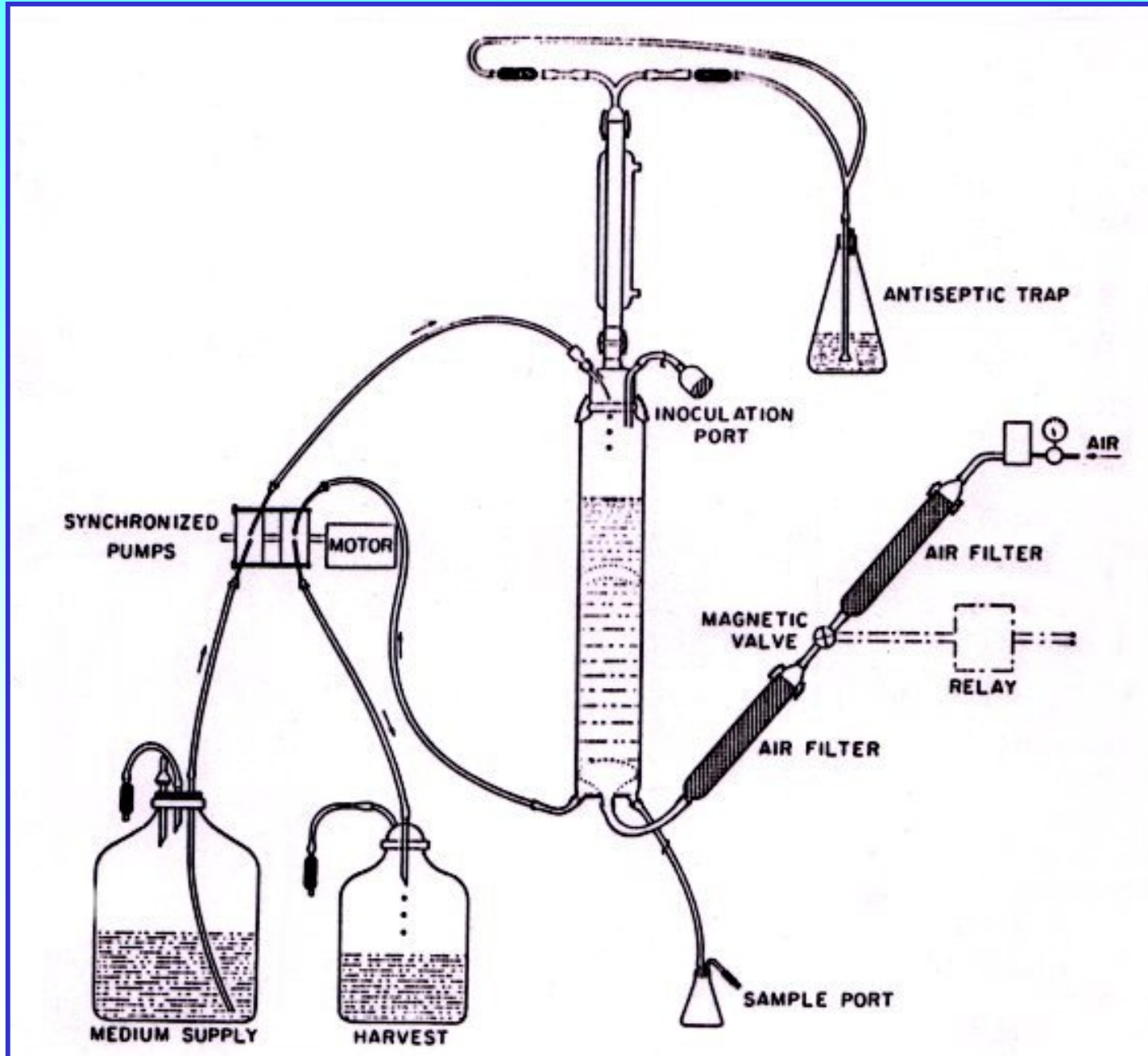


vincristin a vinblastin
antikancerogeny



kalusové linie *Vinca rosea*
variabilita mezi liniemi

Schéma bioreaktoru



Laboratorní bioreaktor



Průmyslový bioreaktor



v roce 2005 největší
automatický provzdušňovaný
bioreaktor pro pěstování
rostlinných buněk a orgánů
na světě

pracovní objem každého
tanku 20 000 l (20 tun)

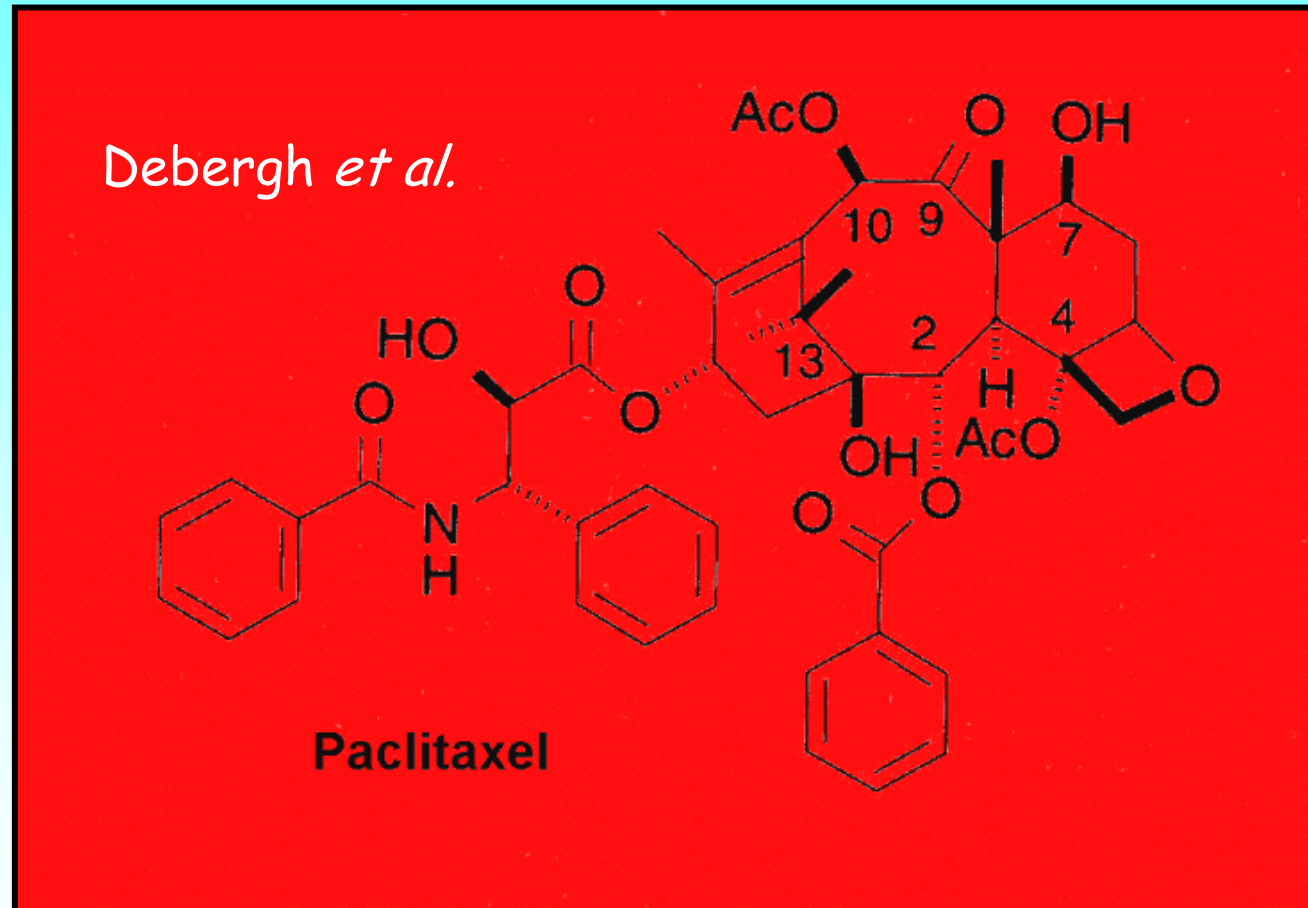
celkový objem 160 000 l
(160 tun)

Foto: Sung Ho Son
VitroSys Inc., Korea

SM produkované buněčnými nebo orgánovými kulturami

alkaloid	ajmalicin	antihypertensivum zlepšení cirkulace v mozku	<i>Catharanthus roseus</i>
alkaloid	berberin	antimikrobiální	<i>Coptis japonica</i>
seskviterpen	artemisinin	antimalarikum	<i>Artemisia annua</i>
diterpen	taxol	cytostatikum	<i>Taxus brevifolia</i>
alkaloid	codeine, morphine		<i>Papaver somniferum</i>
alkaloid	atropin scopolamine		<i>Atropa bella-donna</i>
glykosid	digoxin digitoxin	kardiotonikum	<i>Digitalis lanata</i>

Struktura paclitaxelu (taxolu) z tisů *Taxus brevifolia*, *T. baccata*



léčení karcinomu vaječníků a plic, přírodní zdroje omezené,
nelze syntetizovat chemicky - má 10 stereocenter

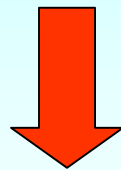
Produkce paclitaxelu u stromů, buněčných a houbových kultur

Materiál	Specifická biosynt. rychlost	Prům. obsah (% sušiny)
kůra dosp. stromů (100leté stromy)	4.70×10^{-6} mg/g/den	0.017
<i>Taxus</i> plantáž (4leté stromy)	0.34×10^{-6} mg/g/den	0.005
<i>Taxus</i> susp. kultura	640×10^{-3} mg/l/den	0.200
<i>Taxomyces andreanae</i>	400×10^{-6} mg/l/den	-

buněčná kultura může produkovat paclitaxel rychleji
a může tak být cestou pro jeho produkci

Nevýhody tkáňových a buněčných kultur pro produkci sekundárních metabolitů

1. nízká produkce SM x **vyšší náklady**
2. **absence SM v buněčných kulturách** (narozdíl od mateřských rostlin nebyly SM u mnoha kalusových a buněčných kultur zjištěny. Produkce SM začíná až při tvorbě kořenů nebo prýtů či při embryogenezi = **nutnost diferenciacce pletiv**)



**produkce SM není zatím (až na výjimky)
komerčně úspěšná**

Důvody absence SM v buněčných kulturách

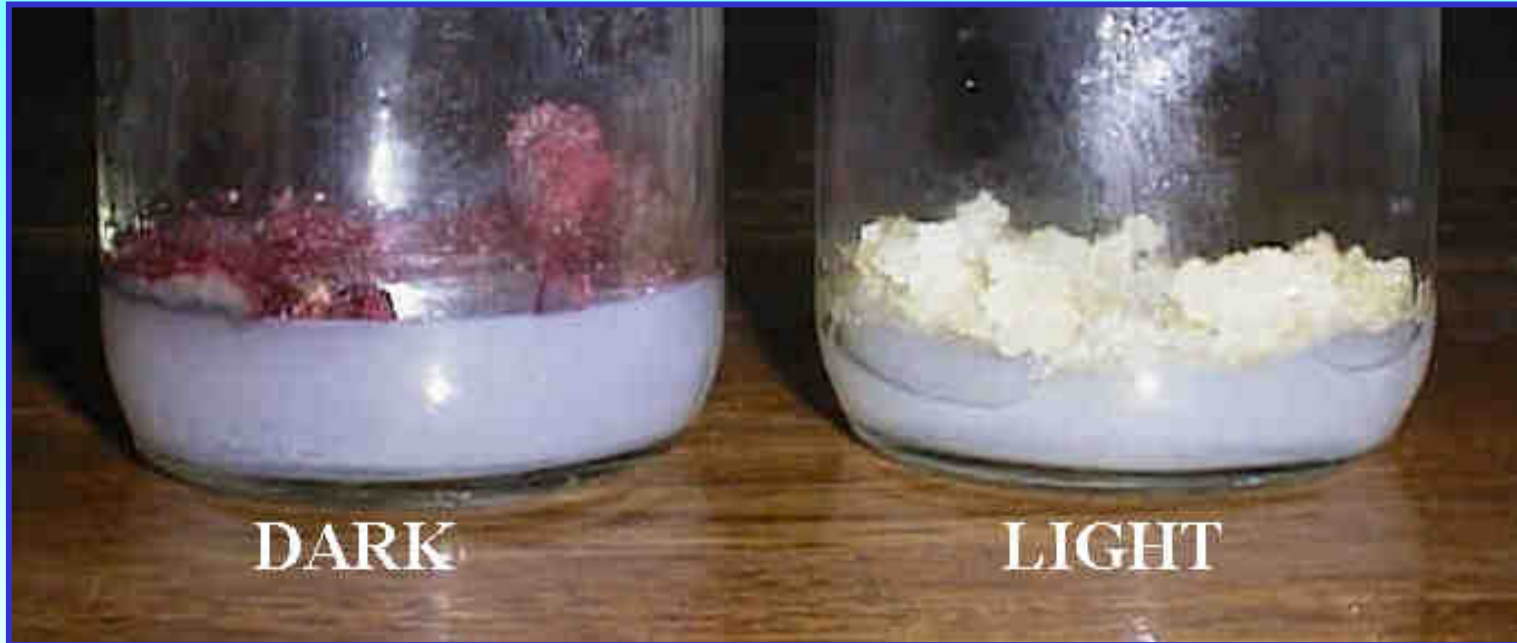
- přesun prekurzorů do primárního metabolismu
- suprese nebo redukce exprese klíčových enzymů biosyntézy
- nedostatek vhodných skladovacích míst, jako sekreční buňky, dutiny nebo váčky, latexová pletiva nebo žláznaté trichomy, které se vyskytují pouze v diferencovaných pletivech

Produkce pigmentů

- Některé buněčné kultury akumulují vysoké koncentrace pigmentů
- Např. kultura *Lithospermum erythrorhizon* produkuje červený pigment **šikonin**, používaný v kosmetice (barvení rtěnek)
- Jiné buněčné kultury produkují **anthocyaniny**, červené nebo modré flavonoidy, které mohou být použity jako přírodní barviva pro potraviny

Debergh *et al.*

Rozdíly v produkci anthokyanů na světle a ve tmě



Kalusy *Oxalis reclinata* jsou při kultivaci na světle žluté, ale po přenosu do tmy začínají produkovat červené pigmenty anthocyaniny.

Debergh *et al.*

Elicitace

Určité sekundární metabolity, **fytoalexiny**, jsou akumulovány v rostlinách po infekci mikroorganismy.

Tyto látky mají antimikrobiální aktivitu a tak fungují jako chemická ochrana rostlin.

Sloučeniny podporující tvorbu fytoalexinů byly nazvány **elicitory** a proces produkce fytoalexinů **elicitace**.



Akumulace fytoalexinů může být indukovaná rovněž různými **stresovými faktory**: UV- radiace, expozice chladu nebo horka, ethylen, fungicidy, antibiotika, soli těžkých kovů, vysoká koncentrace solí.

Elicitace SM v kulturách *in vitro*

Elicitor	Druh	Produkt
<i>Phytophthora megasperma</i>	<i>Glycine max</i>	glycollin
houbové homogenáty	<i>Ruta graveolens</i>	akridon. epoxidy
<i>Phytium aphanidermatum</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	ajmaciline catharanthin
<i>Botrytis</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Verticillium</i> <i>Alternaria</i>	<i>Papaver somniferum</i>	sanguinarin

Biokonverze

Kultury rostlinných buněk obsahují **enzymy**, které mohou **katalyzovat** velký počet reakcí.

Výhodou aplikace rostlinných enzymů při biosyntéze je, že jsou tak produkovány **čisté stereochemické látky** (a ne směsi izomerů jako při chemické syntéze).

Biokonverze - postup, při kterém se používají buněčné kultury, kterým se přidá prekurzor a v průběhu kultivace dojde k jeho přeměně na žádaný sekundární metabolit.
= levnější než biosyntéza SM od počátku

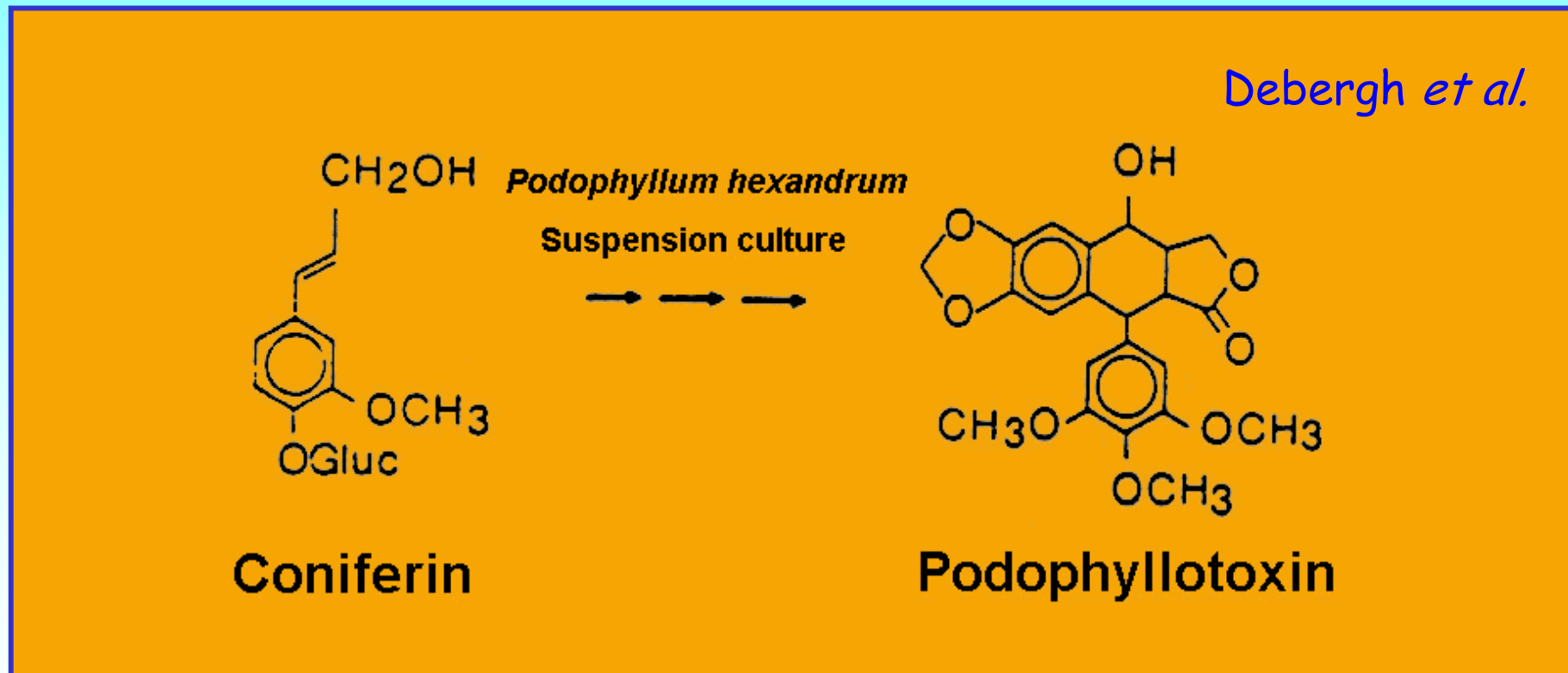
Biokonverze

Přidávání prekursoru k suspenzím (**feeding a precursor**), který je levný a dostupný může zvýšit výnos sekundárních metabolitů. Prekursor je zpracován stejnými metabolickými drahami jako v intaktní rostlině.

Někdy ale buněčné kultury mění prekurzor na **nové sloučeniny**, které se v rostlině nenacházejí.

Příklad biokonverze v buněčné kultuře:

Koniferin je přidáván do média k suspenzní kultuře buněk *Podophyllum hexandrum*, které jej přetvoří na podophyllotoxin.



Podofylotoxin se používá k výrobě protirakovinných léčiv.

Imobilizace buněk

upevnění do inertního materiálu

- 1. aktivní** = uzavírání do polymerů
(alginát, agar, polyakrylamid, želatina)
- 2. pasivní** = vcestování a usazení buněk na nosiče
(polyuretan - molitan)

Využití transgenozy pro tvorbu SM

při produkci SM v kořenech rostlin

indukce tvorby kořínků pomocí *Agrobacterium rhizogenes*

Nicotiana rustica, Datura stramonium

pro zvýšení produkce prýtlů - vnášení genu *ipt* nebo pro auxiny

z *Agrobacterium tumefaciens*

Mentha