



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**

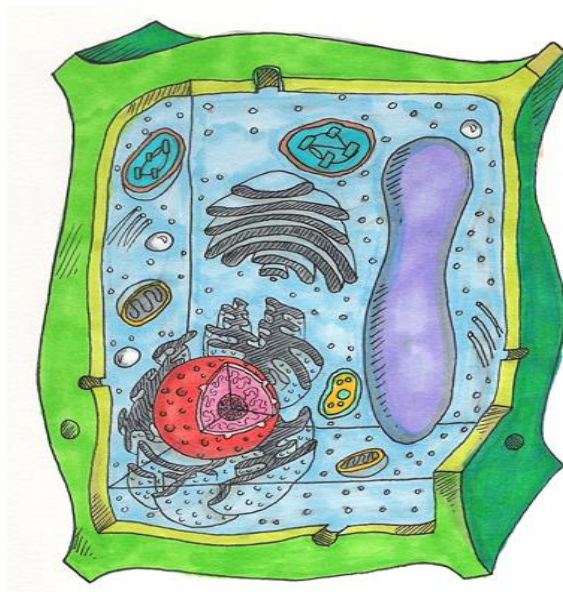
ΣΧΟΛΗ : ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ : ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΕΡΤΙΒΑΝΙΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΕΣ

ΤΟΜΠΑΖΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>Περίληψη</u>	σελ. 2
<u>1. Εισαγωγή</u>	3
<u>2. Τεχνική κυτταροκαλλιέργειας εγκαταστάσεων.</u>	4
2.1 Δευτεροβάθμιοι μεταβολίτες εγκαταστάσεων που παράγονται από Κυτταροκαλλιέργειες .	4
2.2 Εφαρμογή των κυτταροκαλλιεργειών εγκαταστάσεων	5
2.2.1 Τα πρόσθετα τροφίμων από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων.	10
2.2.2 Φαρμακευτικά είδη από τις κυτταροκαλλιέργειες.	14
2.2.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των εγκαταστάσεων κυτταροκαλλιεργειών .	16
<u>3. Στρατηγικές για να αυξήσει τη δευτεροβάθμια παραγωγή μεταβολίτη.</u>	19
3.1 Επιλογή σύμφωνα με τα μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά.	24
3.1.1 Γενότυπος και ποικιλία εγκαταστάσεων.	25
3.1.2 Λήψη των ταχέως αναπτυσσόμενων και υψηλός-παραγωγικών γραμμών κυττάρων.	26
3.2 Απευθυνόμενος στοχεύοντας στο μεταβολισμό.	31
3.2.1 Περιβάλλον πολιτισμού.	32
3.2.2 Επεξεργασίες.	42
3.2.3 Ακινητοποίηση και αίτηση των ακινητοποιημένων κυττάρων.	52
3.2.4 Βιολογική μεταβολή βιομετατροπή και τα πλεονεκτήματά του.	56

<u>4 Απελευθέρωση και αποκατάσταση προϊόντων</u>	60
4.1 Έκκριση.	60
4.2 Δύο σταδίων συστήματα.	60
4.3 Μembrάνη Permeabilisation	64
4.3.1 Χημικό Permeabilisation	64
4.3.2 Φυσικό Permeabilisation	65
<u>5. Βιομηχανική παραγωγή των χρήσιμων βιοχημικών ουσιών από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων</u>	67
<u>6 Συμπεράσματα και προοπτική</u>	68
<u>Βιβλιογραφία</u>	70

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέπων καθηγητή της πτυχιακής μας εργασίας κύριο Κ.Τερτιβανίδη τόσο για την βοήθεια και της συμβουλές του όσο και για την υπόδειξη του θέματος όσο και για την παρακολούθηση και το συνεχές ενδιαφέρον του που αποτέλεσε βάση και καθοριστικό ρόλο για την περάτωση της πτυχιακής μας εργασίας.

Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους γονείς μας για την ψυχολογική υποστήριξη ,που μας προσέφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μας.

Περίληψη

Οι κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων αντιπροσωπεύουν μια πιθανή πηγή πολύτιμων δευτεροβάθμιων μεταβολιτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες ουσίες τροφίμων, *nutraceuticals*, και σε φαρμακευτικά είδη. Η σύνθεση από τα φωτοχημικά των κυτταροκαλλιεργειών σε αντίθεση με αυτά στις εγκαταστάσεις είναι ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις ποιοτικές διακυμάνσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, η χημική σύνθεση των μεταβολιτών δεν είναι δυνατή ή οικονομικά εφικτή.

Επιπλέον, οι φυσικές πρόσθετες ουσίες τροφίμων γίνονται αποδεκτές καλύτερα από τους καταναλωτές σε αντίθεση με εκείνους που παράγονται τεχνητά.

Σε αυτό το κεφάλαιο, η διαδικασία για τους δευτεροβάθμιους μεταβολίτες από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων αντιπροσωπεύεται ως πολυβάθμια στρατηγική, και κάθε σύνδεση πρέπει να περιγραφεί σύμφωνα με τις προδιαγραφές των κυτταροκαλλιεργειών ή των προϊόντων. Για την καθιέρωση της υψηλής παραγωγής και των ταχέως αναπτυσσόμενων γραμμών κυττάρων, οι εγκαταστάσεις γονέων πρέπει να επιλεχθούν. Η έκφραση από τις συνθετικές διαβάσεις μπορεί να επηρεαστεί από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, τον ανεφοδιασμό των προδρόμων, και την εφαρμογή των *elicitors*, και μπορεί από ειδικές μεταχειρίσεις να αλλάξει όπως η βιολογική μεταβολή και η ακινητοποίηση.

Η αποδοτικότητα μπορεί να αυξηθεί από την απλοποίηση των μεθόδων για την αποκατάσταση προϊόντων, βασισμένη στην αρχή της συνεχούς απελευθέρωσης προϊόντων στα μέσα καλλιέργειας. Αυτό μπορεί να προκληθεί μέσω του επηρεασμού της διαπερατότητας μεμβρανών από τους χημικούς ή φυσικούς παράγοντες, π.χ., υψηλοί σφυγμοί ηλεκτρικών πεδίων.

Η συνδυασμένη έρευνα στους τομείς της καθιέρωσης των τεχνητών πολιτισμών, της στοχοθέτησης της σύνθεσης μεταβολιτών, και της ανάπτυξης των τεχνολογιών για την αποκατάσταση προϊόντων μπορεί να εκμεταλλευτεί η δυνατότητα των φυτικών κυττάρων ως πηγές δευτεροβάθμιων μεταβολιτών.

1 Εισαγωγή

Τα συστήματα κυτταροκαλλιέργειας εγκαταστάσεων αντιπροσωπεύουν μια πιθανή πηγή πολύτιμων δευτεροβάθμιων μεταβολιτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες ουσίες τροφίμων (γεύσεις, αρώματα, και χρωστικές ουσίες), nutraceuticals, και φαρμακευτικά είδη [65].

Τα προβλήματα σχετικά με την λήψη των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών από τις εγκαταστάσεις περιλαμβάνουν περιβαλλοντικούς παράγοντες, πολιτικές και αστάθειες εργασίας στις χώρες παραγωγής, ανεξέλεγκτες παραλλαγές στην ποιότητα συγκομιδών, ανικανότητα των αρχών να αποτρέψουν τη νοθευμένη συγκομιδή, και απώλειες στην αποθήκευση και το χειρισμό. Σε πολλές περιπτώσεις, η χημική σύνθεση αυτών είναι είτε εξαιρετικά δύσκολη είτε οικονομικά ανέφικτη [42].

Η παραγωγή των χρήσιμων και πολύτιμων δευτεροβάθμιων μεταβολιτών από τις κυτταροκαλλιέργειες είναι μια ελκυστική πρόταση. Η τεχνολογία κυτταροκαλλιέργειας αναπτύχθηκε όπως ένα πιθανό εργαλείο και για να μελετήσει και να παράγει τους δευτεροβάθμιους μεταβολίτες εγκαταστάσεων. Η εξελισσόμενη σημασία των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών έχει οδηγήσει σε ένα υψηλό επίπεδο ενδιαφέροντος για τη δυνατότητα παραγωγής τους μέσω της βελτίωσης της τεχνολογίας καλλιέργειας [65].

Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων τεσσάρων δεκαετιών, η έρευνα έχει συγκεντρωθεί στη χρήση των κυτταροκαλλιεργειών εγκαταστάσεων, ιδιαίτερα στην Ιαπωνία, Γερμανία, και ΗΠΑ, για την εμπορική παραγωγή ενός ευρέος φάσματος των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών, με τον ίδιο τρόπο όπως τα βακτηρίδια και οι μύκητες έχουν χρησιμοποιηθεί για το αντιβιοτικό ή amino-acid παραγωγή [40]. Παραδείγματος χάριν, έχει υπάρξει τεράστια επιτυχία στην παραγωγή του shikonin από τις κυτταροκαλλιέργειες του *Lithospermum erythrorhizon*, του berberine από το *japonica Coptis* [36], και του sanguinarine από *papaver - somniferum* [11].

Αυτό το κεφάλαιο αναθεωρεί τις πρόσφατες προόδους στη βελτιστοποίηση των περιβαλλοντικών παραγόντων για την παραγωγή μεταβολιτών από την κυτταροκαλλιέργεια εγκαταστάσεων, τις νέες αναπτύξεις στις βιοεπεξεργασίες φυτικών κυττάρων , και την αναδυόμενη έρευνα για τη φυτοχημική αποκατάσταση.

2. Τεχνητή καλλιέργεια φυτικών κυττάρων

2.1 Δευτεροβάθμιοι μεταβολίτες που παράγονται από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων

Οι εγκαταστάσεις φυτικών κυττάρων διαμορφώνουν ένα σημαντικό μέρος της καθημερινής διατροφής μας, και οι θρεπτικές τιμές τους έχουν μελετηθεί εντατικά για δεκαετίες. Πάνω από 80% των περίπου 30.000 γνωστών φυσικών προϊόντων είναι φυτικής προέλευσης [45], τα οποία είναι υπολογισμένα για να είναι σχεδόν τετραπλά μεγαλύτερη από αυτών στο μικροβιακό βασίλειο.

Για αιώνες, οι άνθρωποι έχουν τα φυτά που χρησιμοποιούνται

ως πηγή υδατανθράκων, πρωτεϊνών, και λιπών για τα τρόφιμα και τη στέγη. Εκτός από τους ουσιαστικούς αρχικούς μεταβολίτες, τα ανώτερα φυτά συνθέτουν μια ευρεία ποικιλία των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών.

Οι δευτεροβάθμιοι μεταβολίτες εγκαταστάσεων μπορούν να οριστούν ως οι ενώσεις που δεν έχουν κανέναν αναγνωρισμένο ρόλο στη συντήρηση των θεμελιωδών διαδικασιών ζωής στις εγκαταστάσεις, αλλά έχουν έναν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των εγκαταστάσεων με το περιβάλλον του.

Έχουν συνήθως έναν οικολογικό ρόλο ως attractants της επικοινωνίας εντόμων ή στους αμυντικούς μηχανισμούς ενάντια στα αρπακτικά ζώα. Η διανομή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών στα φυτά είναι πολύ πιο περιορισμένη από εκείνη των πρωτογενών μεταβολιτών μια ένωση συχνά

μόνο βρίσκεται σε μερικά είδη, ή ακόμα και μέσα σε μερικές ποικιλίες μέσα σε ένα είδος. Η παραγωγή αυτών των ενώσεων είναι συχνά χαμηλή (λιγότερο από 1% DW), και εξαρτάται πολύ από τα είδη των φυτών και το φυσιολογικό και αναπτυξιακό στάδιο των εγκαταστάσεων [42]. Επιπλέον, οι δευτεροβάθμιοι μεταβολίτες συσσωρεύονται συχνά στο φυτό σε εξειδικευμένα κύτταρα ή όργανα.

2.2. Εφαρμογή των Φυτικών Κυτταροκαλλιιεργειών

Πολλά φυτά που περιέχουν μεγάλης αξίας ενώσεις είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν [49]. Συγχρόνως, η χημική σύνθεση των παραγόμενων ενώσεων φυτικής προέλευσης δεν είναι συχνά οικονομικά εφικτή λόγω των εξαιρετικών σύνθετων δομών και των ειδικών στερεοχημικών χαρακτηριστικών τους. Η παραγωγή των πολύτιμων δευτεροβάθμιων μεταβολιτών στις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση στην εξαγωγή ολόκληρου του φυτικού ιστού.

Οι κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων καθιερώθηκαν αρχικά προς το τέλος της δεκαετίας του '30. Εντούτοις, ήταν το 1956 όταν η Pfizer Inc. αρχειοθέτησε το πρώτο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για την παραγωγή των μεταβολιτών από τις κυτταροκαλλιέργειες [50]. Οι μεγαλύτερες ποσότητες *vinagin* και *diosgenin* ήταν απομονωμένες από τις κυτταροκαλλιέργειες απ'ότι, τι από ολόκληρο το σύνολο των εγκαταστάσεων των φυτών [5]. Το 1978 ο Zenk (1978) κατέδειξε τις σημαντικές μεταβολικές ικανότητες των φυτικών κυττάρων και έδωσε έμφαση στην αυθόρμητη μεταβλητότητα της βιοσυνθετικής ικανότητας των κυττάρων των φυτών.

Αυτή η φυσική μεταβλητότητα έχει αξιοποιηθεί για να προσδιορίσει τους υψηλοαποδοτικούς πολιτισμούς για τη χρήση σε μια βιομηχανική κλίμακα [4].

Από το τέλος δεκαετίας του '70, η έρευνα και η ανάπτυξη σε αυτήν την περιοχή έχουν δει μια υψηλή αύξηση στον αριθμό κατατεθειμένων αιτήσεων

διπλώματος ευρεσιτεχνίας. Το 1983, η shikoniin παράγεται από καλλιέργειες φυτικών κυτάρων σε μια βιομηχανική κλίμακα για πρώτη φορά πριν από τις βιομηχανίες πετροχημικών Mitsui Petrochemical Industries Ltd. [20].

Αυτήν την περίοδο, η φυτική κυτταροκαλλιέργεια έχει άμεσες εμπορικές εφαρμογές καθώς επίσης και την αξία στον τομέα της βασικής έρευνας στη βιολογία, τη γενετική, και τη βιοχημεία κυττάρων.

Η εφαρμογή των φυτικών κυτταροκαλλιεργειών έχει τρεις βασικές πτυχές [65]:

1. αναπαραγωγή και γενετική:

- μικροπολλαπλασιασμός - χρησιμοποιεί μεριστώματα και βλαστούς για την παραγωγή μεγάλου αριθμού πανομοιότυπων ατόμων
- επιλογή - διαλογή των κυττάρων και όχι των φυτά, για τους συμφέροντες χαρακτήρες.
- πέρασμα των μακριά σχετικών ειδών από την σύντηξη των πρωτοπλαστών και την αναγέννηση των νέων υβριδιακών ατόμων.
- παραγωγή των dihaploid εγκαταστάσεων από τους haploid πολιτισμούς για να επιτύχει τις ομοζυγία γραμμών γρηγορότερα στα προγράμματα αναπαραγωγής.
- μετασχηματισμός, που ακολουθείται είτε από τη βραχυπρόθεσμη δοκιμή των γενετικών κατασκευασμάτων είτε από την αναγέννηση των διαγενετικών εγκαταστάσεων
- απομάκρυνση των ιών από τη διάδοση των μεριστωματικών ιστών.

2. Πρότυπο σύστημα για τη μελέτη της γενετικής, της φυσιολογίας, της βιοχημείας, και της παθολογίας κυττάρων φυτών

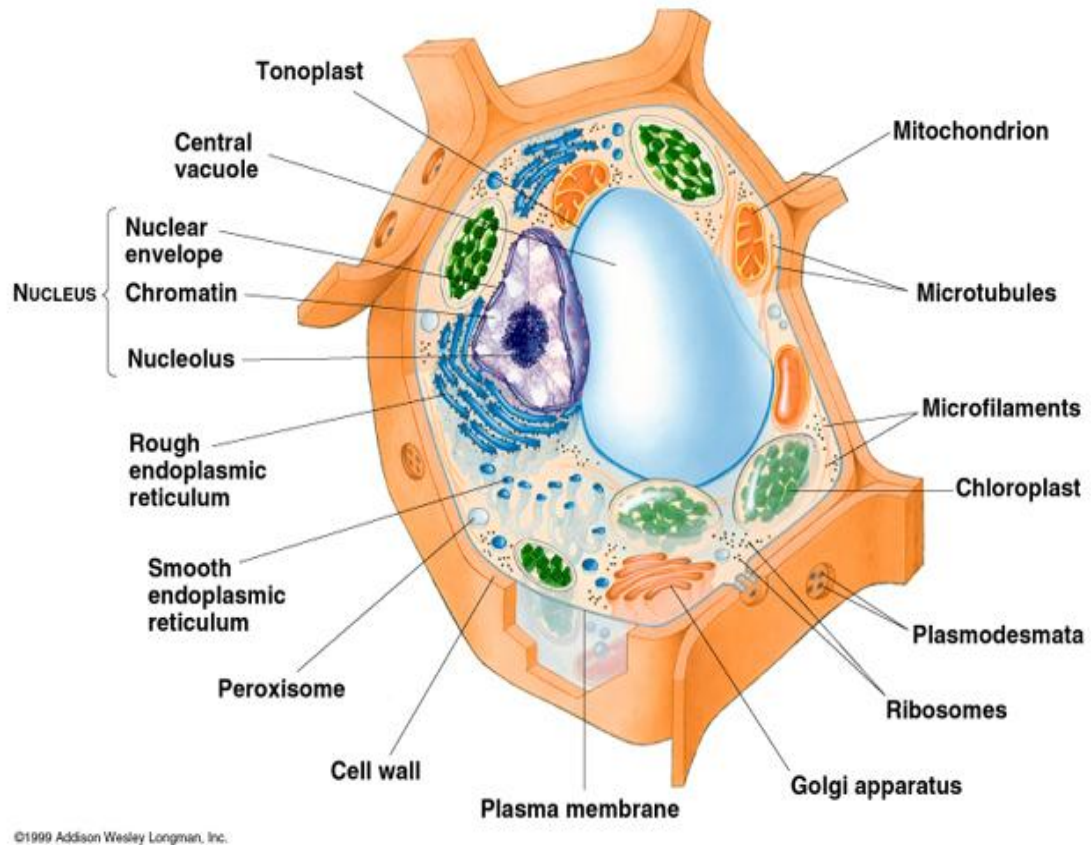
3. Παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών στην αύξηση του υγρού πολιτισμού ως πηγή προϊόντων.

Αυτό το κεφάλαιο εξετάζει τις πρόσφατες προόδους στην παραγωγή μεταβολιτών από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων.

Εφαρμογή για την παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών

Σε σύγκριση με τις άθικτες εγκαταστάσεις, τα καλλιεργημένα κύτταρα φυτών παράγουν συχνά διαφορετικές ποσότητες με τα διαφορετικά σχεδιαγράμματα των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών και τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα μπορούν να αλλάξουν με το χρόνο [59].

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, μερικοί μεταβολίτες στις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων μπορούν να συσσωρευτούν με έναν υψηλότερο τίτλο έναντι εκείνων στις εγκαταστάσεις γονέων, που προτείνουν ότι η παραγωγή των εγκαταστάσεων συγκεκριμένων μεταβολιτών από την κυτταροκαλλιέργεια εγκαταστάσεων αντί ολόκληρης της καλλιέργειας εγκαταστάσεων κατέχει την καθορισμένη δυνατότητα [65].



**Πίνακας 1. παραγωγή προϊόντων από τις κυτταροκαλλιέργειες φυτών
έναντι των φυτών γονέων**

Προϊόν	Εγκαταστάσεις	Παραγωγή (% DW)			Culture/ Refs.	Culture Plant
Ajmalicine	Catharanthus roseus	1.0	0.3	3.3	Lee and Shuler 2000	
Anthraquinones	Morinda citrifolia	18	2.2	8	Zenk 1977	
Berberine	Coptis japonica	13	2	3.3	Fujita and Tabata 1987	
Caffeic acid	Vanilla planifolia	0.02	0.05	4	Knorr et al. 1993	
Ginsenoside	Panax ginseng	27	4.5	6	Matsubara et al. 1989	
Nicotine	Nicotiana tabacum	3.4	2.0	1.7	Mantell et al. 1983	
Rosmarinic acid	Coleus blumei	27	3	9	Petersen and Simmond 2003	
Shikonin	Lithospermum erythrorhizon	20	1.5	13.5	Kim and Chang 1990	
Ubiquinone-10	Nicotiana tabacum	0.036	0.003	12	Fujita and Tabata 1987	

Ο Kim και Chang (1990) έδειξαν ότι η ουσία shikonin από το είδος *Lithospermum erythrorhizon* συσσωρεύθηκε στα πιά υψηλά επίπεδα στα καλλιεργημένα κύτταρα από ότι, στις άθικτες εγκαταστάσεις. Τα παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από Petersen και Simmonds (2003) στην παραγωγή του rosmarinic οξέος από το *Coleus blumei*. Οι υψηλότερες ποσότητες berberine έχουν ληφθεί από την ανάπτυξη των κυττάρων του *japonica Coptis* [20]. Αυτές οι εγκαταστάσεις συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες του berberine στις ρίζες τους σε τέσσερα έως έξι έτη ,οι παρόμοιες συγκεντρώσεις θα μπορούσαν να ληφθούν σε τέσσερις εβδομάδες χρησιμοποιώντας τις καλλιέργειες ιστού. Hara και λοιποί έχουν απομονώσει μια γραμμή κυττάρων *japonica Coptis* που περιείχε 13%DW του berberine. Αυτός ο πολιτισμός παράγαγε περίπου 1500 mg λ⁻¹ αυτού του αντιβακτηριακού αλκαλοειδούς σε 14 ημέρες. Υπάρχουν διάφορα παραδείγματα των καλλιεργημένων κυττάρων που παράγουν τους

μεταβολίτες που δεν παρατηρούνται στις εγκαταστάσεις. Κατά συνέπεια το είδος *Lithospermum erythrorhizon* έχει παρατηρηθεί για τη σύνθεση του rosmarinic οξέος [57].

2.2.1 ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

Ο λόγος για τη χρήση των μεταβολιτών που συντίθενται από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων ως πρόσθετες ουσίες τροφίμων είναι όχι μόνο ότι είναι δύσκολο ή αδύνατο να συνθεθούν χημικά, αλλά οι καταναλωτές δέχονται επίσης ευκολότερα ένα φυσικό προϊόν από ένα που παράγεται τεχνητά [50].

Οι πρόσθετες ουσίες τροφίμων συμβάλλουν στο να καταστήσουν τις ουσίες τροφίμων εύγευστες και ελκυστικές με την ενίσχυση ή τη βελτίωση της γεύσης, του χρώματος, της σύστασής και της υφής τους. Οι τεχνολογίες τροφίμων προσπαθούν να ανταποκριθούν σε αυτά τα κριτήρια ειδικά στη σύσταση, την προτίμηση, και το άρωμα των τροφίμων.

Η ανάγκη να υπάρξει ίδια προτίμηση για την γεύση και το άρωμα προκειμένου να ταιριαστούν οι καταναλωτικές προτιμήσεις το καθιστά υποχρεωτικό να χρησιμοποιήσει τα πρόσθετα φυσικά ή τεχνητά αρώματα.

Από το τέλος δεκαετίας του '50, πολλές πρόσθετες ουσίες τροφίμων έχουν εξεταστεί κυρίως από τις εθνικές και διεθνείς ρυθμιστικές αρχές για την ασφάλειά τους για τη μακροπρόθεσμη χρήση και την κατανάλωση.

Συγχρόνως, οι ενώσεις των καταναλωτών, ενήμερες για το συνυπολογισμό των πρόσθετων ουσιών στα τρόφιμα, έχουν ασκήσει την πίεση στους κυβερνητικούς οργανισμούς για να αντικαταστήσουν τις χημικές ή τεχνητές πρόσθετες ουσίες από τις φυσικές πρόσθετες ουσίες από τους ιστούς εγκαταστάσεων, ή τις πρόσθετες ουσίες που συντίθενται από τις κυτταροκαλλιέργειες φυτών [52].

Οι πολυτιμότερες πρόσθετες ουσίες τροφίμων που μπορούν να λαμβάνονται από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων είναι οι χρωστικές ουσίες τροφίμων (ανθοκυάνες και betalaines), οι γεύσεις (σαφράνι και vanillin), οι γλυκαντικές ουσίες (steviosides), οι πικάντικες πρόσθετες ουσίες τροφίμων (capsaicin), και αντιβακτηριακά συντηρητικά τροφίμων (thio-phenol). Μερικές πρόσθετες ουσίες τροφίμων που λαμβάνονται από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων παρατίθενται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. πρόσθετες ουσίες τροφίμων από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων

Τύπος προϊόντων	Φυτικά είδη	Refs.
Χρώματα Ανθοκυάνες	Vitis vinifera Aralia cordata Perilla frutescens	Curtin et al. 2003 Sakamoto et al. 1994 Zhong 2001
Betalaines	Beta vulgaris Chenopodium rubrum	Trejo-Tapia et al. 2007 Knorr et al. 1993
Crocin Καρωτινοειδή	Crocus sativus Lycopersicon esculentum Morinda citrifolia	Chen et al. 2003 Rhodes et al. 1991 Zenk 1977
Naphthoquinones	Lithospermum erythrorhizon	Kim and Chang 1990
Γεύσεις Βανιλίνη Σκόρδο Κρεμμύδι	Vanilla planifolia Allium sativum Allium cepa	Dornenburg and Knorr 1996 Rhodes et al. 1991 Rhodes et al. 1991
Γεύση καφέ Γεύση κακάου	Coffea arabica Theobroma cacao	Kurata et al. 1998 Rao and Ravishankar 1999
Πικάντικη πρόσθετη ουσία τροφίμων Καψαϊκίνη	Capsicum frutescens Capsicum annuum	Rhodes et al. 1991 Johnson and Ravishankar 1996
Γλυκαντικές ουσίες Stevioside Γλυκυρριζίνη Thaumatococcus	Stevia rebaudiana Glycyrrhiza glabra Thaumatococcus danielli	Rao and Ravishankar 1999 Rao and Ravishankar 1999 Rao and Ravishankar 1999

Αρώματα

Τα φυσικά αρώματα είναι ένα μίγμα πολυάριθμων ενώσεων περισσότερα από 500 έχουν προσδιοριστεί στα ψημένα φασόλια, καφέ και

200 στα μήλα. Τα φυσικά αρώματα είναι ευαίσθητα στις διαδικασίες συντήρησης των τροφίμων, όπως η αποστείρωση, η παστερίωση, η ψύξη, κ.λπ. Ορισμένα αρώματα έχουν αλλοιωθεί με ενζυματικές ή χημικές αντιδράσεις είτε αλλάζουν είτε εξαφανίζονται συνήθως εάν αποθηκεύονται για μια μεγάλη περίοδο.

Για το λόγο αυτό τα υποκατάστατά τους έχουν επιδιωχθεί από το τέλος του 19ου αιώνα. Τα τεχνητά αρώματα κατασκευάστηκαν από τα παράγωγα άνθρακα ή πετρελαίου, και χρησιμοποιήθηκαν για να προστεθούν στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10^{-6} - 10^{-9}).

Οι παρούσες τάσεις είναι καθεμία για να παράγουν τα συνθετικά μόρια, που είναι ίδια με τα φυσικά μόρια, ή για να χρησιμοποιήσουν τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων [65]. Τα αρώματα από τις κυτταροκαλλιέργειες έχουν ένα πλεονέκτημα μιας σταθερής σύνθεσης η οποία είναι ανεξάρτητη με την εποχή. Κατά συνέπεια, τα χαρακτηριστικά αρώματα του κακάου και του καφέ έχουν παραχθεί από τις κυτταροκαλλιέργειες από το κακάο *Theobroma* και *Coffea arabica*, αντίστοιχα [33].

Χρωστικές ουσίες

Η χρήση των πρόσθετων χρωστικών ουσιών επικρίθηκε έντονα από τις ενώσεις των καταναλωτών στη δεκαετία του '70, επειδή τα περισσότερα από τα χρώματα παράγονται από τη χημική σύνθεση και είναι ανεξάρτητα από οποιοδήποτε φυσικό υλικό. Οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των φυσικών χρωστικών ουσιών τροφίμων αποτελούνται από την ανάπτυξη των υψηλότερων κυττάρων φυτών [65].

1. Ενώσεις Shikonin, όπως και τα παράγωγα shikonin και το ακετυλικό και ισοβουτιλικό shikonin, συσσωρεύονται στις ρίζες του είδους *Lithospermum erythrorhizon*. Λόγω μιας έλλειψης αυτών των εγκαταστάσεων, η μαζική καλλιέργεια *Lithospermum erythrorhizon* των κυττάρων για να παραγάγει τις shikonin ενώσεις έχει καθιερωθεί επιτυχώς [25].

2. Οι ανθοκυάνες είναι η μεγάλη ομάδα υδροδιαλυτών χρωστικών ουσιών αρμόδιων για πολλά από τα φωτεινά χρώματα στα λουλούδια και φρούτα. Αλλάζουν το χρώμα πέρα από τη σειρά του pH που οφείλεται στην ύπαρξη τεσσάρων pH-dependent μορφών: σε χαμηλό pH είναι κόκκινοι και στο pH άνω των έξι που γίνονται μπλε.

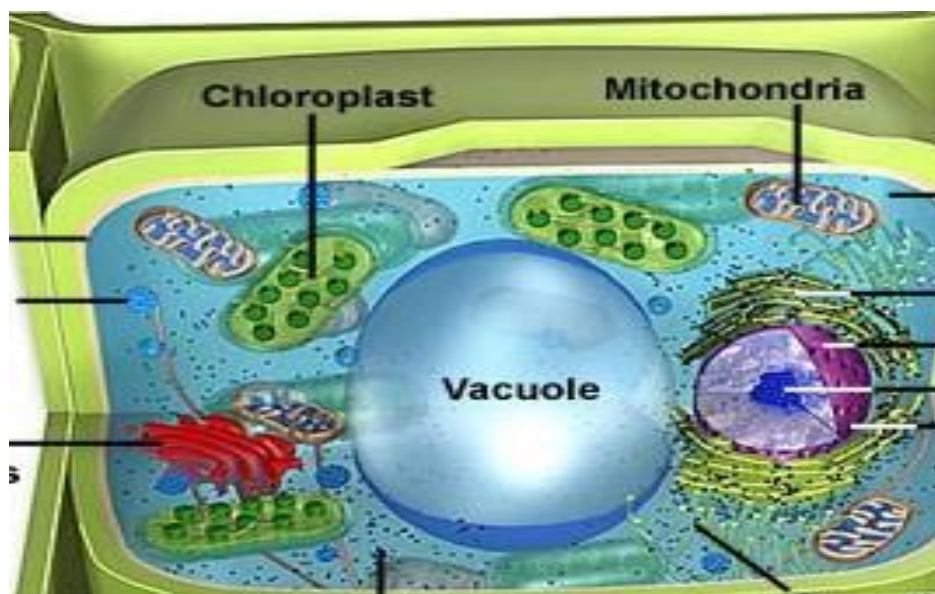
Είναι συνήθως χρησιμοποιημένος στις όξινες λύσεις προκειμένου να μεταδοθεί ένα κόκκινο χρώμα στα μη αλκοολούχα ποτά, τη βιομηχανία ζαχαρωδών προϊόντων ζάχαρης, τις μαρμελάδες, και τα καλύμματα αρτοποιειών. Οι καθαρές ανθοκυάνες διατιμώνται σε \$ 2000 kg⁻¹, αλλά τα ακατέργαστα υλικά (οποί μήλου και απόβλητα σταφυλιών από το χυμό και τις βιομηχανίες κρασιού) είναι μάλλον ανέξοδα [10].

Πολλοί ερευνητές περιγράφουν την παραγωγή των ανθοκυανών χρησιμοποιώντας τα καλλιεργημένα κύτταρα των διάφορων εγκαταστάσεων ειδών που οι περισσότεροι από τους φαίνονται να χρησιμοποιούν μια ανθοκυάνη-παραγοντας γραμμή κυττάρων ως πρότυπο σύστημα για τη δευτεροβάθμια παραγωγή προϊόντων λόγω του χρώματός τους, το οποίο επιτρέπει στην παραγωγή να απεικονιστεί εύκολα.

3. Crocin, η κύρια χρωστική ουσία του στίγματος *Crocus sativus*, χρησιμοποιείται εκτενώς ως κίτρινη χρωστική ουσία τροφίμων. Η εμπορική παραγωγή της χρωστικής ουσίας σαφρανιού είναι περιορισμένη από την υψηλή τιμή και την περιορισμένη διαθεσιμότητά του. Σαν γεόφυτο, το σαφράνι αυξάνεται αργά και διαδίδεται μόνο από τη φυτική παραγωγή μέσω του σχηματισμού των βολβών κορών. Παίρνει 200.000 λουλούδια και πάνω από 400 ώρες εργασίας χεριών για την παραγωγή 1 kg προϊόντος του στίγματος σαφρανιού. Μια μέθοδος φυτικής ιστοκαλλιέργειας προσφέρει μια μεγάλη δυνατότητα για την παραγωγή crocin [8].

4. Madders είναι κόκκινες χρωστικές ουσίες από το *Rubia tinctorum*, ένα πολυετές φυτό από τις παράκτιες περιοχές της Μεσογείου, και οι ρίζες της έχουν χρησιμοποιηθεί ως κόκκινες χρωστικές ουσίες στη δυτική Ευρώπη.

Τα βασικά συστατικά στη χρωστική ουσία είναι η alizarin , purpurine, το glycoside και ruberythric οξύ. Η καθαρή αλιζαρίνη είναι ένα πορτοκαλί κρύσταλλο και είναι διαλυτή στο νερό που βράζει και σε άλλους διαλύτες. Η αλιζαρίνη παρουσιάζει κίτρινο χρώμα στο όξινο έως ουδέτερο pH και τείνει να είναι κοκκινωπή με την αύξηση του pH. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στη θερμότητα και το φως, το οποίο είναι ευνοϊκό στη βιομηχανία τροφίμων. Μέσω της επιλογής της υψηλής παραγωγής κυτταρικών σειρών και της εφαρμογής elicitor, λήφθηκε κίτρινη χρωστική ουσία του παράγοντα κύτταρα του *Rubia tinctorum* [61].



2.2.2. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΥΤΩΝ

Ανώτερα φυτά αποτελούν μια πλούσια πηγή βιοενεργών συστατικών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία φαρμάκων. Μερικά παραγόμενα φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης που περιλαμβάνουν και τα ναρκωτικά, όπως η μορφίνη, η κοδεΐνη, η κοκαΐνη, η κινίνη, τα αντικαρκινικά αλκαλοειδή Catharanthus, τα αλκαλοειδή ατρόπων, colchicines, το rhytostigminine, το pilocarpine, το reserpine, και τα στεροειδή, όπως το diosgenin, digoxin, και η διγιτοξίνη [42].

Πίνακας 3. Φυτικά παραγόμενα φαρμακευτικά είδη μεγάλης σημασίας

Προϊόν	Χρήση	Φυτικά είδη	Κόστος US \$ kg ⁻¹
Ajmalicine	Αντιυπερτασικούς	Catharanthus roseus	37. 000
Ajmaline	Αντιελονοσιακούς	Rauwolfia serpentine	75. 000
Camptothecin	Κατά του όγκου	Camptotheca acuminata	432. 000
Codeine	Ηρεμιστικούς	Papaver somniferum	17. 000
Colchicine	Κατά του όγκου	Colchium autumnale	35. 000
Ellipticine	Κατά του όγκου	Orchrosia elliptica	240. 000
Morphine	Ηρεμιστικούς	Papaver somniferum	340. 000
Shikonin	Αντιβακτηριακός	Lithospermum erythrorhizon	4.500
Taxol	Αντικαρκινικούς	Taxus brevifolia	600. 000
Vinblastine	Αντιλευχαιμικούς	Catharanthus roseus	1. 000. 000
Vincristine	Αντιλευχαιμικούς	Catharanthus roseus	2. 000. 000

Rao and Ravishankar (2002)

Τα παραγόμενα φυτικά φάρμακα αντιπροσωπεύουν μια τεράστια τιμή εμπορίου. Σύμφωνα με τον Rao και τον Ravishankar (2002), παγκοσμίως, 121 κλινικά χρήσιμες ιατρικές συνταγές προέρχονται από τις εγκαταστάσεις φυτών. Επιπλέον, 12% των φαρμάκων που εξετάζονται ως βασικός και ουσιαστικός από το WHO προέρχονται αποκλειστικά από τα ανθίζοντα φυτά [49].

Οι έρευνες για την ιατρική χρήση εγκαταστάσεων στις ΗΠΑ έχουν παρουσιάσει μια αύξηση ακριβώς περίπου 3% του πληθυσμού το 1991 σε πάνω από 37% το 1998 [46]. Οι ιατρικές συνταγές που περιέχουν τα φυτοχημικά εκτιμήθηκαν περισσότερο από US σε \$ 30 δισεκατομμύρια το 2002 στις ΗΠΑ [48]. Το 75% του παγκόσμιου πληθυσμού στηρίζεται στις εγκαταστάσεις για την παραδοσιακή ιατρική. Μερικά παραγόμενα φαρμακευτικά είδη παρατίθενται στον πίνακα 3. Ένα παράδειγμα ενός

φαρμάκου μεγάλης αξίας που παράγεται από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων είναι η paclitaxel, ένα αντικαρκινικό φάρμακο που εξάγεται αρχικά από το φλοιό 50 χρόνων δέντρων πουρναριών, *Taxus brevifolia* [58].

2.2.3 ΤΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ.

Τα πλεονεκτήματα των κυτταροκαλλιεργειών εγκαταστάσεων κατά τη συμβατική παραγωγή είναι τα εξής:

1. Είναι ανεξάρτητη από τις γεωγραφικές και εποχιακές διακυμάνσεις και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η σύνθεση βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών γίνεται σε ελεγχόμενο περιβάλλον, και οι αρνητικές βιολογικές επιδράσεις που επηρεάζουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στη φύση απομακρύνονται (μικροοργανισμοί και έντομα).
2. Προσφέρει ένα καθορισμένο σύστημα παραγωγής που εξασφαλίζει τη συνεχή παροχή των προϊόντων, και της ομοιόμορφης ποιότητας και απόδοσης της παραγωγής.
3. Είναι δυνατό να επιλεγθούν κυτταρικές γραμμές με υψηλότερη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών.
4. Είναι δυνατή η παραγωγή νέων ενώσεων που δεν βρίσκονται κανονικά στο μητρικό φυτό.
5. Επιτρέπει την αποδοτικότητα κατά την παραγωγή.
6. Το φυτικό κύτταρο μπορεί να εκτελέσει συγκεκριμένες ειδικές βιολογικές μεταβολές για την παραγωγή νέων ενώσεων από φθηνούς προδρόμους.

7. Με την αυτοματοποίηση του ελέγχου αύξησης και ανάπτυξης των κυττάρων και την ρύθμιση των μεταβολικών διαδικασιών, η τιμή κόστους μπορεί να μειωθεί και να αυξηθεί η παραγωγικότητα.

Υπάρχουν διάφορες επιτυχώς καθιερωμένες και εμπορευματοποιημένες κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων που παράγουν ένα υψηλό ποσό δευτεροβάθμιων μεταβολιτών(πίνακας 4).

Ωστόσο, η τεχνολογία αυτή είναι ακόμα σε εξέλιξη και παρά τα πλεονεκτήματα, υπάρχει μία ποικιλία από προβλήματα που πρέπει να ξεπεραστούν για την παραγωγή χρήσιμων φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών.

Πίνακας 4 Υψηλές αποδόσεις των δευτερογενών προϊόντων

Προϊόν	φυτικά είδη	Σοδειά (% DW)	Refs
Anthocyanins	<i>Perilla frutescens</i>	8.9	Zhong 2001
Anthraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>	18.0	Zenk 1977
	<i>Coleus blumei</i>	21.4	Petersen and Simmond 2003
Sanguinarine	<i>Papaver somniferum</i>	2.5	Dicosmo and Misawa 1995
Serpentine	<i>Catharanthus roseus</i>	2.2	Moreno at al.1995
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	13.5	Kim and Chang 1990

Εμπόδια για τις κυτταροκαλλιέργειες.

Θεωρητικά, αναμένεται ότι οι κυτταροκαλλιέργειες θα είναι κατάλληλες για την βιομηχανική παραγωγή των χρήσιμων χημικών προϊόντων κατά τρόπο παρόμοιο με εκείνο της μικροβιακής ζύμωσης. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες σημαντικές διαφορές μεταξύ μικροβιακών και κυτταροκαλλιεργειών εγκαταστάσεων που πρέπει να εξεταστούν κατά την προσπάθεια τους να

εφαρμοστούν οι κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων με τη διαθέσιμη τεχνολογία. Γενικά τα προβλήματα με τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων μπορούν να ταξινομηθούν ως βιολογικά (αργό ρυθμό ανάπτυξης, ανομοιογένεια της φυσιολογίας, η γενετική αστάθεια, χαμηλή περιεκτικότητα σε μεταβολίτη, προϊόντα έκκρισης), και λειτουργικά (τοίχο πρόσφυσης, απαίτηση σε φως, ανάμειξη, διάτμησης ευαισθησία, ασηπτικός ορός) [65].

Ο πίνακας 5 παρουσιάζει μια σύγκριση ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των εγκαταστάσεων και των μικροβιακών καλλιέργειών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, στο να δείξουν ορισμένα από τα προβλήματα που μπορούν να αντιμετωπιστούν με τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων.

Πίνακας 5 Χαρακτηριστικά των μικροβιακών και φυτικών κυττάρων που σχετίζονται με την ζύμωση.

Χαρακτηριστικά	Φυτικά κύτταρα	Μικροοργανισμοί
Μέγεθος		
Διάμετρος (μm)	40–200	1–10
Όγκος (μm ³)	> 10 ⁵	1–50
Μόλυσμα	5–10	≤ 1
Ανάπτυξη	σύνολα-μεγέθη	ενιαία κύτταρα
Χρόνος καλλιέργειας	2-3 εβδομάδες	2-10 ημέρες
Χρόνος διπλασιασμού, ώρες	15–120	0.3–6
Κατανάλωση οξυγόνου, O h–1 g–1 ≤5		50
Περιεκτικότητα σε νερό (%)	> 90	80
Προϊόν συσσώρευσης	κυρίως ενδοκυτταρική (κυτταρικό κενό)	κυρίως εξωκυτταρικό (μέσο)
Απαιτήσεις για asepticity	υψηλή	χαμηλή

Dörnerburg and Knorr 1997

Το μεγάλο μέγεθος των φυτικών κυττάρων συμβάλει στον συγκριτικά υψηλό διπλασιασμό του χρόνου του, ο οποίος έτσι παρατείνει το χρόνο που απαιτείται για το τρέξιμο μιας επιτυχής ζύμωσης. Το κυτταρικό κενό είναι η σημαντικότερη περιοχή συσσώρευσης προϊόντων και από το προϊόν η έκκριση είναι ασυνήθιστη, οι υψηλές παραγωγές μεταβολίτη που εμφανίζονται

σε μικροοργανισμούς που εκκρίνει το προϊόν δεν μπορεί να αναμένεται. Υπάρχουν ορισμένες εν εξέλιξη έρευνες για το permeabilization των μεμβρανών των φυτικών κυττάρων, που μπορούν να χρησιμεύσουν για την ανακούφιση των περιορισμών του προϊόντος, από την αναστολή της διευκόλυνσης της διαρροής στο εξωκυτταρικό μέσο(See Sect. 4.3 “Membrane Permeabilisation”) [17]. Έτσι υπάρχουν ορισμένα σημαντικά εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν στο βιοχημικό επίπεδο.

3. Στρατηγικές για την αύξηση δευτεροβάθμιας παραγωγής μεταβολίτη.

Ο στόχος της βιομηχανίας τροφίμων είναι να αναπτύξει τις τεχνικές για να επιτρέψει την παραγωγή των δευτερογενών προϊόντων από την μονάδα κυτταροκαλλιέργειας που θα ήταν λιγότερο δαπανηρή από την εξαγωγή του συνόλου των εγκαταστάσεων, που καλλιεργούνται σε φυσικές συνθήκες και λιγότερο δαπανηρή από την σύνθεση του προϊόντος. Αντιμέτωποι με την αύξηση του ποσού των δευτερογενών μεταβολιτών στις εγκαταστάσεις κυτταροκαλλιέργειας, η ανάγκη για βιομηχανική και μοριακή έρευνα σχετικά με τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών έχει επανειλημμένα τονιστεί.

Η έρευνα στον τομέα αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στον επιτυχή χειρισμό του δευτερογενούς μεταβολισμού και θα μπορούσε να αυξήσει σημαντικά τα ποσά των ενώσεων. Θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η σύνθεση ενός ευρέος φάσματος των ενώσεων, όπως τα αλκαλοειδή, τα φλαβονοειδή, τα τερπένια, τα στεροειδή, γλυκοσίδες κ.λπ., με την χρήση της τεχνολογίας της κυτταροκαλλιέργειας. Η στρατηγική για την απόκτηση των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών από τις κυτταροκαλλιέργειες μπορούν να εκπροσωπούνται ως πολλαπλά στάδια διαδικασίας (Σχήμα 1). Κάθε σύνδεση μπορεί να βελτιστοποιηθεί χωριστά ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους και διαδικασίες.

1. Το αρχικό βήμα αυτής της τεχνολογίας περιλαμβάνει την επιλογή του μητρικού φυτού σύμφωνα με τα μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του, ιδιαίτερα σχετικά με το υψηλό περιεχόμενο των επιθυμητών μεταβολιτών. Θεωρητικά, οποιοδήποτε τμήμα που λαμβάνεται από οποιοδήποτε φυτικό είδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προκαλέσει ιστό κάλων, εντούτοις η επιτυχής παραγωγή του κάλου εξαρτάται από τα είδη των φυτικών κυττάρων και τις ιδιότητες τους. Τα δικοτυλήδονα είναι μάλλον υποκείμενα για την επαγωγή ιστού κάλων, όπως σε σύγκριση με τα μονοκοτυλήδονα, οι χρήσεις ξυλώδων φυτών γενικά αυξάνονται με αργό ρυθμό. Βλαστοί, φύλλα, ρίζες, άνθη, σπόροι καθώς και άλλα μέρη των φυτών χρησιμοποιούνται, αλλά είναι προτιμότερο να λαμβάνονται από νεότερα μέρη των φυτών.
2. Στη συνέχεια η επιλογή της κυτταρικής σειράς γίνεται σημαντική. Περιλαμβάνει την δημιουργία μεγάλης παραγωγής και ταχείας ανάπτυξης in-vitro φυτών. Είναι δυνατόν να προσδιοριστούν κυτταρικές γραμμές που μπορούν να παράγουν ποσότητες των ενώσεων ίσων ή ακόμη και υψηλότερων σε σχέση με το φυτό από το οποίο προέρχονται[11]. Περισσότερο για την αύξηση των επιπέδων του μεταβολίτη χρησιμοποιούν τις μεταλλάξεις, για αυτό το λόγο η επιλογή των κατάλληλων αναλόγων θα μπορούσε να είναι ένας σοβαρός παράγοντας για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων.



Η μεγιστοποίηση της παραγωγής και η συσσώρευση των δευτερογενών μεταβολιτών από την καλλιέργεια φυτικών κυττάρων απαιτεί την παραγωγή νέων γονότυπων με σύντηξη πρωτοπλαστών ή της εφαρμοσμένης γενετικής μηχανικής. Ωστόσο αυτό προϋποθέτει τον προσδιορισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν τα βασικά ένζυμα των δευτεροβάθμιων μεταβολικών οδών και της έκφρασης τους. Η χρήση των μεταλλαξιγόνων αυξάνει την μεταβλητότητα που υπάρχει ήδη στα ζωντανά κύτταρα. Επιπλέον, τα νέα μόρια, τα οποία στο παρελθόν δεν βρέθηκαν σε φυτά μπορούν να παραχθούν από τις κυτταροκαλλιέργειες.

3. Στόχευση του μεταβολισμού. Μια σειρά από διάφορους χημικούς και φυσικούς παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών .Η έκφραση αυτή των δευτερογενών μεταβολιτών από πολλούς οδούς είναι εύκολο να μεταβληθούν από εξωτερικούς παράγοντες όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες (χημικές και φυσικές)και οι ειδικές μεταχειρίσεις(πρόδρομες ουσίες, elicitors)

α)Το μέσο της κυτταροκαλλιέργειας περιλαμβάνει τα ανόργανα συστατικά, οργανικές ουσίες και φυτοορμόνες. Η αλλαγή των μέσων συστατικών (συγκέντρωση, αναλογία και μορφής)είναι ένας πολύς ισχυρός τρόπος για την αποδοτικότητα των καλλιεργειών των κυττάρων. Έτσι το υψηλό επίπεδο αυξίνης διεγείρει την ανάπτυξη των κυττάρων αλλά συχνά επηρεάζει αρνητικά την δευτεροβάθμια παραγωγή μεταβολιτών[63].

Φυσικές ιδιότητες ,όπως φως ,θερμοκρασία και το μέσο pH,έχουν εξεταστεί για τις επιπτώσεις και την επίδραση τους στην δευτεροβάθμια συσσώρευση μεταβολίτη σε πολλά είδη καλλιεργειών.

β)Ειδικές μεταχειρίσεις περιλαμβάνουν την σίτιση με τις πρόδρομες ουσίες, την εφαρμογή των elicitors,την βιολογική μεταβολή για την ακινητοποίηση. Η έννοια της τροφής με πρόδρομες ουσίες είναι βασισμένη στην ιδέα ότι ο ανεφοδιασμός με τις ενώσεις που είναι ενδιάμεσα ή στην αρχή της βιοσυνθετικής διαδρομής δίνει μια καλή ευκαιρία για την αύξηση της απόδοσης και παραγωγής του τελικού προϊόντος. Η παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών περιορίζεται συχνά από την έλλειψη ιδιαιτέρων πρόδρομων, η βιολογική μεταβολή που χρησιμοποιεί είναι εξωγενή ανεφοδιασμού των βιοσυνθετικών προδρόμων που μπορεί να βελτιώσει την συσσώρευση των ενώσεων. Η βιολογική μεταβολή είναι μια διαδικασία μέσω της οποίας οι λειτουργικές ομάδες ενώσεων τροποποιούνται από τις κυτταροκαλλιέργειες σε διαφορετικά χημικά προϊόντα[24].Τα κύτταρα

του φυτού μπορούν να μετατρέψουν φυσικά ή τεχνητά ενώσεις που εισάγονται στα κύτταρα μέσα από μια ποικιλία αντιδράσεων, όπως υδρογόνωση, αφυδρογονώσεις, ισομερισμός, γλυκοζιδιώσεις και υδροξυλιώσεις.

Φυτά και φυτικά κύτταρα *in vitro* παρουσιάζουν φυσιολογικές και μορφολογικές απαντήσεις σε μικροβιακούς, φυσικούς ή χημικούς παράγοντες οι οποίοι είναι γνωστοί ως *elicitors*. Δεδομένου ότι οι δευτεροβάθμιοι μεταβολίτες προστατεύουν τις εγκαταστάσεις των φυτών από τις περιβαλλοντικές αλλαγές, ο τρόπος να προκληθεί η σύνθεση τους είναι να εφαρμοστούν οι δυσμενείς παράγοντες, δηλαδή μιμείται την επίθεση των παθογόνων, τα φυτοφάγα, τα βαρέα μέταλλα κ.λ.π..

Εξαγωγή είναι μια διαδικασία που προκαλείται η ενισχυμένη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών από τα φυτά για να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους την αυθεντικότητα, και την ανταγωνιστικότητα.

Τα βιοτικά και αβιοτικά *elicitors* χρησιμοποιούνται για την υποκίνηση σχηματισμού του δευτεροβάθμιου προϊόντος μεταβολίτη στις κυτταροκαλλιέργειες των κυττάρων.

Η ακινητοποίηση των κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις των φυτικών κυττάρων λόγω τις εξειδίκευσης και της ποιότητας ορισμένων κυττάρων ενώ εκατοντάδες ή χιλιάδες από αυτά είναι ακινητοποιημένα σε ένα σύνολο. Τα περισσότερα από την έρευνα στον τομέα αυτό έχει χρησιμοποιήσει τη υδροηλεκτρική κολλοειδών πηκτωμάτων όπως το άλας αλγινικού οξέως και καραγενάνη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να παγιδεύσουν στα κύτταρα των φυτών μια μήτρα πηκτωμάτων επιτρέποντας την εύκολη πρόσβαση των υποστρωμάτων.

4. Ίσως η πιο αποτελεσματική βιολογική επεξεργασία ιδεών για την παραγωγή φυτοχημικών οδηγήσει στην αυθόρμητη απελευθέρωση στο μέσο όπου μπορούν να αναπτυχθούν ευκολότερα. Μια από τις πιο καρποφόρους τομείς της έρευνας για την παραγωγή προϊόντων χαμηλότερης αξίας μπορεί να είναι η μελέτη των μεθόδων που μπορεί να προκαλέσει διαρροή προϊόντος από τα κύτταρα που συσσωρεύουν συνήθως το προϊόν. Μπορεί επίσης μια μελέτη των ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων στα οποία εμφανίζεται η σύνθεση των χημικών ουσιών να είναι απαραίτητη, δεδομένου ότι οι ουσίες μεταφέρονται στο κυτταρικό κενό για συσσώρευση.

Έτσι μια εναλλακτική εξέταση είναι η πρόληψη της συσσώρευσης και κατά συνέπεια η ενίσχυση των ουσιών που απελευθερώνονται στο μέσο. Τα φυτά έχουν συχνά θέσεις σύνθεσης και αποθήκευσης δευτερογενών μεταβολιτών σε χωριστά κύτταρα ή σε όργανα. Η αναστολή των μεταβολικών ενζύμων καθώς επίσης και η αναστολή της μεμβράνης των μεταφορών μπορούν να εξαλειφθούν από τη συσσώρευση των συνδεδεμένων προϊόντων σε μια δεύτερη φάση που εισάγεται στο υδάτινο μέσο ή σε σύστημα δυο στα δυο.

3.1 Επιλογή σύμφωνα με τα μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά

Η επιλογή και η διαλογή των φυτικών ειδών και ποικιλιών πλούσιων σε χρήσιμους μεταβολίτες είναι η στρατηγική για την αύξηση και ενίσχυση της δευτερογενούς περιεκτικότητας σε μεταβολίτη στις εγκαταστάσεις κυτταροκαλλιεργειών.

Οι εγκαταστάσεις των φυτών με υψηλή περιεκτικότητα των επιθυμητών προσόντων πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την επαγωγή κάλων για να λάβουν υψηλή παραγωγή κυτταρικών σειρών.

3.1.1 Γονότυπος και ποικιλία εγκαταστάσεων

Το γενετικό δυναμικό αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την βιοχημική κατάσταση των κυτταροκαλλιέργειών των φυτικών κυττάρων. Περιβαλλοντικοί και φυσιολογικοί παράγοντες μπορούν να τροποποιήσουν την έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν σε φυτοχημική σύνθεση, αλλά το γενετικό υπόβαθρο αποτελεί το σημαντικότερο και καθοριστικό παράγοντα.

Η ποικιλομορφία του γεννητικού δυναμικού προς το δευτεροβάθμιο προφίλ μεταβολίτη μπορεί να παρουσιαστεί στο παράδειγμα των εγκαταστάσεων των φυτών της οικογένειας Brassicaceae. Περιλαμβάνει περίπου 350 γένη και 3.500 είδη που περιλαμβάνουν τα φυτά, διακοσμητικά είδη και διάφορες καλλιέργειες.

Της γλυκοζινόλης το προφίλ και τα επίπεδα διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό και εκπροσωπούνται συνήθως από 6-10 επιμέρους γλυκοζινολικά άλατα (Πίνακας 6).

Η σύγκριση των χαρακτηριστικών των βασικών γλυκοζινολικών αλάτων στα λαχανικά Brassica κραμβολάχανο δείχνει ότι το γενικό περιεχόμενο και η κατανομή των υποκατηγοριών των γλυκοζινολικών αλάτων είναι μοναδική για κάθε είδος. Για παράδειγμα το κύριο γλυκοζινόλης Brassica juncea σπόρων κυριαρχείται από progoitrin, οι σπόροι των Brassica oleacea περιέχουν κυρίως gluconapoleiferin, ενώ οι σπόροι Brassica napus περιέχουν gluconapoleiferin, gluconapin, και glucobrassicinapin [55].

**Πίνακας 6 κατανομή προφίλ γλυκοζινολικών αλάτων οικογένειας
Brassicaceae**

ΕΙΔΗ	ΓΛΥΚΟΖΙΝΟΛΙΚΑ ΑΛΑΤΑ (mg 100g-1 fw)	% του συνόλου των γλυκοζινολικών αλάτων		
		αλειφατικές	αρωματικά	ινδολοξικό
Brassica rapa L. var. rapa	21–340	42	30	18
Brassica rapa L. var. rapa teltovie	790–890	29	46	25
Brassica oleracea L. var. capitata	26–275	47	33	20
Brassica oleracea L. var. italica	40–340	47	9	44
Brassica oleracea L. var. botrytis	14–208	47	14	39

Schreiner M, 2005

3.1.2 Η απόκτηση των ταχέως αναπτυσσομένων και υψηλών παραγωγικών
κυτταρικών σειρών

Οι κυτταροκαλλιέργειες χαρακτηρίζονται μερικές φορές με εγγενή και έμφυτη γενετική μεταξύ των κυττάρων που συχνά οδηγεί στην επιγενετική αστάθεια. Η μεταβλητότητα μεταξύ των κυττάρων συχνά οδηγεί σε βαθμιαία μείωση της παραγωγικότητας και μπορούν να αποδοθούν σε γενετικές αλλαγές που προκαλούνται από φυσιολογικές συνθήκες. Αυτές οι ανεπιθύμητες αλλαγές μπορούν να αντιστραφούν με την διαλογή και έρευνα των κυττάρων από τον ετερογενή πληθυσμό, που παρουσιάζονται συνήθως στις κυτταροκαλλιέργειες [17].

Οι μέθοδοι κλωνοποίησης κυττάρων παρέχουν ένα υποσχόμενο τρόπο για την επιλογή των κυττάρων που παράγουν αυξημένα επίπεδα του

προϊόντος. Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των επιμέρους φυτικών κυττάρων δεν είναι πάντα ομοιόμορφα.

Για παράδειγμα η χρωστική των κυττάρων που παράγουν συνολικά μεγέθη συνήθως αποτελείται από κύτταρα που τα παράγουν. Η ετερογένεια στη βιοχημική δραστηριότητα που υπάρχει μέσα σε ένα πληθυσμό των κυττάρων έχει χρησιμοποιηθεί για να αποκτήσει υψηλή παραγωγικότητα κυτταρικών σειρών.

Αυτό είναι παρόμοιο μόνο με την απομόνωση αποικίας των βακτηρίων . Για παράδειγμα, από την κλωνοποίηση των κυττάρων με την χρήση κυττάρων μακροοικονομικών μεγεθών των *Coptis japonica*, *matsubara*, et al. (1989) στελέχους που προκύπτει ότι αυξήθηκαν ταχύτερα και παράγεται ένα υψηλότερο ποσό των *berberin*.

Κατά την διάρκεια των τριών εβδομάδων της καλλιέργειας, το επιλεγμένο κύτταρο της γραμμής *Coptis japonica* παράγει εξαπλάσιο υψηλότερο ποσό *berberine*, ιδιαίτερα $1.2(g) 1^{-1}$ ως αρχικό καλό. Το επιλεγμένο στέλεχος ήταν πολλή σταθερό, η παραγωγή *berberin* ακόμη και μετά από 27 γενιές ήταν σε υψηλό επίπεδο. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7 ένα στέλεχος της *euphorbia milli* χιλιοστοισοδύναμα συσσωρεύτηκε και επταπλασιάστηκε περίπου το επίπεδο των ανθοκυανών που παράγονται από την κυτταροκαλλιέργεια των γονέων μετά από 24 επιλογές [40]. Στην κυτταροκαλλιέργεια *Lithospermum erythrorhizon* εκτενής διαλογή ενός αριθμού κλώνου οδήγησε σε 13-πλάσια έως 20-πλάσια αύξηση στην παραγωγή *shikonin*[25].



Πίνακας 7 Επίδραση των κυττάρων κλωνοποίησης στην παραγωγικότητα των κутταροκαλλιεργειών

Προϊόντα	Φυτά	Οι παράγοντες (αύξηση της παραγωγής)	Refs.
Anthocyanins	Vitis vinifera	2.3–4	Curtin et al. 2003
	Euphorbia milli	7	Mulabagal and Tsay 2004
Reserpine	Coptis Landa	2–6	Matsubara et al. 1989
Biotin	Lavendula vera	9–10	Misawa 1985
Shikonin	Lithospermum erythrorhizon	7–20	Kim and Chang 1990
Ubiquinone-10	Nicotiana tabacum	15–180	Dicosmo and Misawa 1995

Τα κύτταρα της *Lavendula vera* που καλλιεργήθηκαν αυξήθηκαν στο φως και συσσωρεύσαν ένα υψηλό επίπεδο ελεύθερη βιοτίνη [38]. Για να επιλεγθεί μια μεγάλη παράγωγή κυτταρικής σειράς, χρησιμοποιήθηκε μια πρόδρομη ουσία των βιοτινών, pimelic οξύ. Το επίπεδο της βιοτίνης που συσσωρεύτηκε από μια επιλεγμένη γραμμή κυττάρων ήταν $0,9\text{mg } 1^{-1}$, το οποίο ήταν δέκα φορές το ποσό που βρέθηκε στα φύλλα.

Η Α.Ε καπνών της Ιαπωνίας απομόνωσε μια σειρά από στελέχη του *Nicotiana tabacum* παράγοντας τα υψηλά επίπεδα ubiquinone-10 [11]. Μετά την 13^η κλωνοποίηση, ένα στέλεχος επιλέχθηκε από περίπου 4.000 κλώνους κυττάρων που έχουν δοκιμαστεί. Όταν το *nicotiana tabacum* BY-2, η μητρική στελέχους που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση ήταν απομονωμένη, ο τίτλος για την ubiquinone -10 ήταν μόνο $0.36\text{mg } \text{g}^{-1}$ DW, επομένως το ποσοστό αυτό αυξήθηκε από την επιλογή μέχρι $5.2 \text{mg } \text{g}^{-1}$, που αντιστοιχεί σε 180 φορές που παράγεται από το μητρικό φυτό.

Η Κλωνοποίηση φυτών κυττάρων είναι μια πολύ χρήσιμη τεχνική για να αυξηθεί το επίπεδο δευτεροβάθμιων μεταβολιτών. Ωστόσο δεν είναι

προφανές ο λόγος για τον οποίο η κυτταροκαλλιέργεια τόσο μεγάλης και χαμηλής περιεκτικότητας παράγονται τα κύτταρα. Ο Kim και ο Chang (1990) έδειξαν ότι η έλλειψη συγκεκριμένων ενζύμων αποτελούν την πιο σημαντική αντίδραση για την ανικανότητα των φυτικών κυττάρων στις κυτταροκαλλιέργειες να παράγουν δευτεροβάθμιους μεταβολίτες.

Σύντηξη πρωτοπλαστών. Μεγιστοποίηση της παραγωγής και της συσσώρευσης δευτερογενών μεταβολιτών από την κυτταροκαλλιέργεια φυτικών κυττάρων αποκτά την παραγωγή νέων γονότυπων μέσω της σύντηξης πρωτοπλαστών ,αλλά αυτό προϋποθέτει την αναγνώριση των γονιδίων που κωδικοποιούν βασικά ένζυμα των δευτερευόντων μεταβολικών οδών και της έκφρασης τους μόλις εισαχθούν στα φυτικά κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι η χρήση του μεταλλαξιόγονου για να αυξηθεί η μεταβλητότητα υπάρχει ήδη σε ζωντανά κύτταρα.

Δεδομένου ότι τα περισσότερα καλλιεργημένα κύτταρα παρουσιάζονται ως συνολικά μεγέθη, η επιλογή της μεγάλης παραγωγής αλλά και συγκεντρωτικά κυτταρικές σειρές των *Lithospermum erythrorhizon* δεν είναι αποτελεσματική και να είναι εντατική .Η ομάδα Mitsui προετοίμασε πρωτοπλάστες από τα καλλιεργημένα κύτταρα με τα κατάλληλα ένζυμα και επέλεξε υψηλά shikonin-παραγωγή συνθετικών πρωτοπλαστών χρησιμοποιώντας έναν διαλογέα κυττάρων [46].

Επιλεγμένοι πρωτοπλάστες παρήχθησαν στις κυτταρικές σειρές και καλλιεργούνται σε αποστολή. Από τις 48 σειρές κυττάρων έλαβαν μια γραμμή κυττάρων που έχει 1.8 φορές την παραγωγικότητα της γραμμής των γονέων. Η γραμμή κυττάρων έδειξε σταθερή παραγωγή shikonin ενώσεων. Sakamoto και λοιποί(1994) που έχουν αναφερθεί σχετικά με την οπτική επιλογή των *eurhobia milli*. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 28 φορές και ένα από τα κύτταρα ήταν αποφασισμένο για την παραγωγή 1.32%DW ανθοκυανών στα κύτταρα. Τα επίπεδα των χρωστικών ουσιών στα λουλούδια και τα φύλλα ήταν 0.28% και μικρότερη του 0.01% αντίστοιχα.

Χρήση των μεταλλαξιγόνων. Οι στρατηγικές μεταλλαγής έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να συγκεντρώσουν μεγαλύτερη παραγωγή από αυτές των κυτταρικών σειρών [46]. Σε αυτήν την μέθοδο μεγάλοι πληθυσμοί κυττάρων εκτίθενται σε τοξικούς ή κυτταροτοξικούς ανασταλτικούς παράγοντες ή περιβαλλοντική πίεση, και μόνο τα κύτταρα που είναι σε θέση να αντισταθούν στις διαδικασίες επιλογή θα αυξηθούν.

Για παράδειγμα η p-fluorophenylalanine, ανάλογης της φαινυλαλανίνης χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για την επιλογή των κυττάρων που παράγουν υψηλές γραμμές σε σχέση με phenolics. Αυξημένη καψαϊκίνη σε p-fluorophenylalanine σε κυτταρικές σειρές *Capsicum annum* έχουν αναφερθεί.

Στην βιομηχανία ζύμωσης, επαγωγής της γενετικής μετάλλαξης σε στελέχη μικροοργανισμών χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των αμινοξέων, των νουκλεοτιδίων και αντιβιοτικών. Ωστόσο η μεταλλαξιγένεση έχει περιορισμένη δυνατότητα εφαρμογής στις κυτταροκαλλιέργειες των φυτών λόγω της διπλοειδής γενετικής του.

Οι πιθανότητες για ένα διπλό στόχο μετάλλαξης σε ένα γονίδιο είναι μικρότερη από 10^{-6} [63]. Αν και σε γενικές γραμμές απλοειδή φυτά μπορούν να παραχθούν από μια άλλη κυτταροκαλλιέργεια, στην πράξη, οι απλοειδή κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων τείνουν να επανέλθουν στην διπλοειδή κατάσταση. Το γεγονός αυτό καθιστά την ευκαιρία κατά την απομόνωση των κυττάρων που παράγουν από μεταλλαξιγόνο μεταχείριση απλοειδών κυττάρων σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Επιπλέον, βιοσυνθετικές οδοί από πολλούς δευτεροβάθμιους μεταβολίτες και μηχανισμοί ρύθμισης στον τομέα της τριτοβάθμιας στις υψηλότερες εγκαταστάσεις δεν γίνονται πάντα ακριβώς κατανοητά, επομένως είναι επίσης δύσκολο να γνωρίζουμε τι είδους μεταλλάξεις πρέπει να προκληθούν προκειμένου αυξηθεί η σύνθεση προϊόντων.

Ωστόσο, Berlin και λοιποί(1981) προκάλεσαν p- fluorophenylalanine ανθεκτικές γραμμές κυττάρων κυτταροκαλλιεργειών καπνού και διαπίστωσαν

ότι ,από 31 ανθεκτικές γραμμές κυττάρων ,πέντε γραμμές *Nicotiana tabacum* και πέντε γραμμές *Nicotiana glauca* συσσωρεύσαν τα πιο υψηλά επίπεδα phenolics.Το ανθεκτικό στέλεχος του *Nicotiana tabacum* που παράγει από έξι έως δέκα φορές υψηλότερα επίπεδα cinnamoyl putrescine από αυτή του μητρικού στελέχους.

Γενικά, τα φυτικά κύτταρα συσσωρεύουν τους μεταβολίτες τους intracellularly, που είναι μειονεκτική σε εμπορική παραγωγή, επειδή το ποσό απελευθερωμένων ενώσεων είναι συνήθως χαμηλό. Η επαγωγή της μετάλλαξης όπου έχει μεταβληθεί η διαπερατότητα του θα μπορούσε να είναι σημαντική.

Από την *Thuja occidentalis* εκκρίνονται monoterpenoids,αλλά τα επίπεδα στο μέσο ήταν μόνο 5% των ατόμων στις εγκαταστάσεις φυτών. Ωστόσο *Macleaya microcarpa* κύτταρα εξέκριναν σχεδόν όλα τα αλκαλοειδή ανιχνεύσιμα στην φιάλη κυτταροκαλλιέργειας [65].Μετά από τρις ημέρες από την καλλιέργεια των κυττάρων *Tinospora rumphii*,0.57mg (5,3% DW) της ισοκινολίνης αλκαλοειδών έχουν βρεθεί στο διήθημα καλλιέργειας και μετά από επτά ημέρες 0.50mg των αλκαλοειδών συσσωρεύτηκαν στα κύτταρα και 1.02mg στο διήθημα.

3.2 Στόχευση του μεταβολισμού

Μια σειρά από χημικούς και φυσικούς παράγοντες, όπως το pH των τμημάτων των μέσων ,η θερμοκρασία και το φως ,επηρεάζουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών στις κυτταροκαλλιέργειες των φυτών [40].Η χειραγώγηση των συνθηκών καλλιέργειας είναι μια από τις πιο θεμελιώδης προσεγγίσεις για την βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας της κυτταροκαλλιέργειας.

3.2.1 Περιβάλλον κυτταρολογίας

3.2.1.1 Χημικοί παράμετροι

Τα μέσα κυτταροκαλλιέργειας των κυττάρων των φυτών περιλαμβάνουν τα ανόργανα συστατικά (macroelements και microelements) και οργανικές ουσίες και φυτοορμόνες. Για να καλλιεργήσουν τον κάλο και τα κύτταρα σε αναστολή, τα διάφορα είδη μέσων (ανόργανα αλατούχα μέσα) έχουν σχεδιαστεί. Άλλα και τα υποκατάστατά του προστίθεται στα μέσα για την προετοιμασία των στερεών μέσων.

Πολλά μέσα έχουν αναπτυχθεί και έχουν τροποποιηθεί και οι θρεπτικές συνθέσεις μερικών χαρακτηριστικών μέσω περιγράφονται στον πίνακα 8.

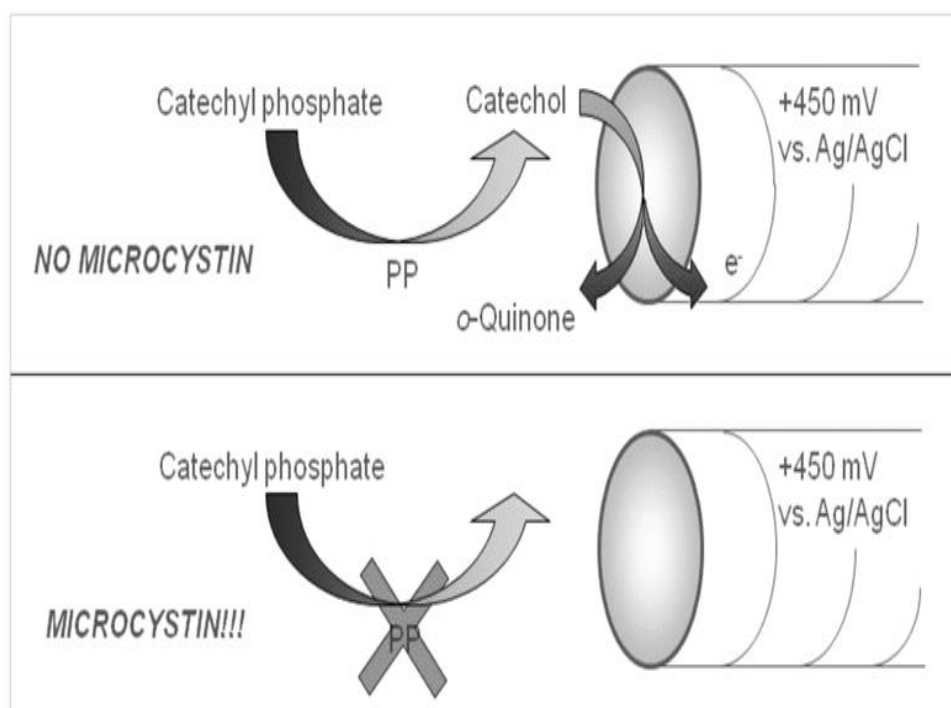
Ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιημένα μέσα για καλλιέργειες φυτικών ιστών είναι αυτό που αναπτύσσεται από Murashige και Skoog (MS) – κράτη μέλη [14]. Το σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα MS μέσου είναι η πολύ υψηλή συγκέντρωση νιτρικών ιόντων (NO_3^-) καλίου (K^+) και αμμωνίας (NH_4^+) (βλέπε πίνακα 8)

Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν επίσης B5 μέσα που θεσπίστηκε με Gramborg. Τα επίπεδα των ανόργανων θρεπτικών ουσιών στο B5 μέσο είναι χαμηλότερα σε σχέση με το MS μέσο. Τα αποτελέσματα του μέσου που χρησιμοποιείται στις διάφορες διαδικασίες που έχουν αναφερθεί, π.χ. επιδράσεις του ασβεστίου και του φωσφορικού άλατος στην καλλιέργεια της *Coffea Arabica* αναστέλλει τα κύτταρα, αποτέλεσμα του φωσφορικού άλατος οι επιπτώσεις στην παραγωγή στεροειδών saponin στην αναστολή κυτταροκαλλιέργειας φυτών *Agave americana* [56], και του φωσφορικού άλατος και της σακχαρόζης στην παραγωγή νικοτίνης από *Nicotiana tabacum* των κυτταροκαλλιεργειών [35].

ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Ο Zerk και λοιποί (1978) δοκίμασαν διάφορα βασικά μέσα για την παραγωγή *serpentines indole* αλκαλοειδή από αναστολή του *Catharanthus roseus* όπως συνοψίζονται στον πίνακα 9. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το *serpentine* εξαρτάται από τη σύνθεση του βασικού κυτταρολογικού μέσου που χρησιμοποιείται. Μεταξύ αυτών, *Muriashge –Skoog's* της (MS) η διατύπωση αναγνωρίστηκε ως η πλέον κατάλληλη για την παραγωγή αυτού του ιδιαίτερου αλκαλοειδούς.

Άζωτο. Τα μέσα φυτικής ιστοκαλλιέργειας όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας MS, LS ή B5, έχουν και τα δυο νιτρικό άλας (NO^{-3}) και αμμωνία (NH^{+4}) ως πηγές αζώτου. Για παράδειγμα το άζωτο είναι πηγή πολύ σημαντική για την αναστολή της κυτταροκαλλιέργειας των *Holarrhena antidysenterica* για την συσσώρευση των αλκαλοειδών [65], στις αναστολές κυττάρων *Vitis vinifera* για τον σχηματισμό ανθοκυάνης και στην παραγωγή *shikonin* από τις κυτταροκαλλιέργειες των *Lithospermum erythrorhizon* [25].



Η αναλογία $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ και τα γενικά επίπεδα συνολικού αζώτου έχουν αποδειχθεί πως έχουν επιπτώσεις εμφανείς στην παραγωγή των δευτερογενών προϊόντων. Τα μειωμένα επίπεδα NH_4^+ και τα αυξανόμενα επίπεδα NO_3^- προώθησαν την παραγωγή shikonin και betacyanins ενώ οι υψηλότερες αναλογίες NH_4^+ σε NO_3^- αύξησαν την παραγωγή του berberine και ubiquinone [14]. Τα μειωμένα επίπεδα του συνολικού αζώτου βελτίωσαν την παραγωγή capsaicin του *Capsicum frutescens* των ανθρακινονών στο *Morinda citrifolia* και των ανθοκυανών στα είδη *Vitis* [54,64].

Η συγκέντρωση φωσφορικού άλατος στο μέσο έχει μεγάλη επίδραση στην παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών στην ιστοκαλλιέργεια φυτικών κυττάρων. Το ανώτερο επίπεδο φωσφορικών ενίσχυσε την αύξηση των κυττάρων, ενώ είχε αρνητική επίδραση στη συσσώρευση των δευτεροβάθμιων προϊόντων.



Το μέσο που περιορίζεται στο φωσφορικό άλας είτε προκαλεί είτε διεγείρει και το προϊόν και τα επίπεδα βασικών ενζύμων κλειδιών που οδηγούν στο προϊόν. Τα μειωμένα επίπεδα φωσφορικού άλατος προκάλεσαν την παραγωγή Ajmalicine και phenolics στο *Catharanthus roseus* nicotine στο *Nicotiana tabacum* [35]. Αντίθετα αυξανόμενο φωσφορικό άλας φάνηκε να τονώνει την σύνθεση της digitoxin στο *Digitalis purpurea* και betacyanin στο *Chenopodium rubrum* [5].

Τα ιόντα καλίου (K^+) λειτουργεί ως ένας σημαντικός συνεισφέρον παράγοντας στην ωσμωτική δυναμικού, είναι μια ειδική απαίτηση για την πρωτεϊνική σύνθεση και ιδιαίτερα για έναν ενεργοποιητή ενζυμικού συστήματος [65]. Με την υψηλότερη συγκέντρωση K^+ προκλήθηκε βραδύτερη ανάπτυξη των κυττάρων. Περισσότερος διαλύτης ζάχαρης αποθηκεύτηκε μέσα στα κύτταρα από την ανεπάρκεια K^+ .

Πίνακας 8 Μείγματα τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων (mg l⁻¹)

Na ₂ SO ₄	–	200	–	–	–	–
KCl	–	65	–	1500	–	–
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440	–	150	25	200	–
NaNO ₃	–	–	–	–	–	–
KNO ₃	1900	80	3000	2000	2500	250
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	–	300	–	–	–	1000
NH ₄ NO ₃	1650	–	–	–	–	–
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	–	16.5	150	250	–	–
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	–	–	–	300	–
KH ₂ PO ₄	170	–	–	–	–	250
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27.8	–	27.8	–	15	–
Na ₂ EDTA	37.3	–	37.3	–	20	–
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22.3	7	10	3	10	–
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8.6	3	2	0.5	0.1	–
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.025	–	0.025	0.025	0.2	–
H ₂ SO ₄	–	–	–	0.5	–	–
Fe ₂ (SO ₄) ₃	–	2.5	–	–	–	–
NiCl ₂ ×6H ₂ O	–	–	–	–	–	–
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.025	–	0.025	–	0.1	–
AlCl ₃	–	–	–	–	–	–
FeCl ₃ ×6H ₂ O	–	–	–	–	–	–
FeC ₆ O ₅ H ₇ ×5H ₂ O	–	–	–	10	–	–
KI	0.83	0.75	0.75	0.5	1.0	–
H ₃ BO ₃	6.2	1.5	3	0.5	5	–
Na ₂ M ₁₀ O ₄ ×2H ₂ O	0.25	–	0.25	0.25	0.1	–
Sucrose	30 000	20 000	20 000	50 000	30 000	–
Glucose	–	–	–	36 000	–	–
Myo-inositol	100	–	100	–	1000	–
Nicotinic acid	0.5	0.5	1.0	–	0.5	–
Pyridoxine HCl	0.5	0.1	1.0	–	0.5	–
Thiamine HCl	0.1–1	0.1	10	1	5	–
Ca–pantothenate	–	–	1 –	–	–	–
Biotin	–	–	–	–	–	–
Glycine	2	–	3 –	–	–	–
Cysteine HCl	–	–	1 –	–	10 –	–
Folic acid	–	–	–	–	–	–
Glutamine	–	–	–	–	–	–

Gamborg and Phillips, 1995

**Πίνακας 9 αποτελέσματα των διαφορετικών μέσων στην αύξηση και την
ελικοειδή παραγωγή στους πολιτισμούς αναστολής κυττάρων του
Catharanthus roseus.**

Βασικό μέσο	Παραγωγή κυττάρων g DWl ⁻¹	Serpentine mg l ⁻¹	Serpentine,% DW
Blaydes	7.6	4.4	0.06
Gamborg – B5; + 2,4-D (1mg l ⁻¹)	4.6	0.5	0.01
Gamborg + 2,4 D (2 mg l ⁻¹)	5.2	0	0
Gamborg + NAA (1.86 mg l ⁻¹)	7.6	1.2	0.02
Gamborg	5.1	0	0
Heller + IAA (0.175 mg l ⁻¹); BA (1.13 mg l ⁻¹)	5.4	6.6	0.12
Linsmaier and Skoog	9.3	0	0
Murashige and Skoog	8.9	10.4	0.12
Nitsch and Nitsch	2.3	2.0	0.09
Velicky and Martin	5.0	0	0
White	0.8	0	0

Zenk, 1978

Microelements απαιτούνται στα ποσά ιχνών για τη αύξηση και ανάπτυξη εγκαταστάσεων, και έχουν πολλούς διαφορετικούς ρόλους [21]. Το μαγγάνιο, το ιώδιο, ο χαλκός, το κοβάλτιο, το βόριο, το μολυβδαίνιο, ο σίδηρος, και ο ψευδάργυρος περιλαμβάνουν συνήθως macroelements, αν και άλλα στοιχεία, όπως το νικέλιο και το αργίλιο, βρίσκονται συχνά σε μερικές διατυπώσεις.

Ο σίδηρος προστίθεται συνήθως ως θειικό άλας σιδήρου, αν και το κιτρικό άλας σιδήρου μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί. Το Ethylenediaminetetraacetic οξύ (EDTA) χρησιμοποιείται από κοινού με το θειικό άλας σιδήρου. EDTA τα συγκροτήματα επιτρέπουν την αργή και συνεχή απελευθέρωση του σιδήρου στο μέσο. Ο σίδηρος Uncomplexed μπορεί να κατακρημνίσει από το μέσο ως σιδηρικό οξύδιο.

Οι κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων αυξάνονται συνήθως heterotrophically χρησιμοποιώντας τις απλές ζάχαρες ως πηγή άνθρακα και ανόργανο ανεφοδιασμό άλλων θρεπτικών ουσιών. Το επίπεδο σακχαρόζης είχε επιπτώσεις στην παραγωγικότητα των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών στους πολιτισμούς [35]. Η σακχαρόζη ή η γλυκόζη σε 2 ή σε 4% είναι κατάλληλες πηγές άνθρακα, οι οποίες προστίθενται στο βασικό μέσο. Η φρουκτόζη, μαλτόζη, και άλλα σάκχαρα υποστηρίζουν επίσης την αύξηση των διάφορων κυτάρων φυτών. Η επιλογή της καταλληλότερης πηγής άνθρακα και η βέλτιστη συγκέντρωσή της εξαρτώνται από τα είδη και τα προϊόντα εγκαταστάσεων.

Σε πολλές περιπτώσεις, η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα έχει επιπτώσεις στην αύξηση κυτάρων και την παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών. Συγκεντρώσεις σακχαρόζης 2.5% και 7.5 στο *Coleus blumei* τα μέσα οδήγησαν στις rosmarinic όξινες παραγωγές 0.8 και 3.3 g l⁻¹, αντίστοιχα [38].

Η πηγή άνθρακα βρέθηκε επίσης να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στο μεταβολισμό κυτάρων φυτών, ο οποίος είχε επιπτώσεις στη συσσώρευση των αλκαλοειδών από τους πολιτισμούς αναστολής του *Holarrhena antidysenterica* και του shikonin από *Lithospermum erythrorhizon* των κυτταροκαλλιεργειών [65].

Για (indole) συσσώρευση των αλκαλοειδών στην κυτταροκαλλιέργεια από το *Catharanthus roseus*, η σακχαρόζη 8% (w/v) βρέθηκε για να είναι βέλτιστη στο δοκιμασμένο διάστημα συγκέντρωσης 4-12% [27]. Παραγωγές των αλκαλοειδών benzophenanthridine από τους πολιτισμούς αναστολής του *Eschscholtzia californica* αυξήθηκε δέκα φορές σε 150 mg l⁻¹ με την αύξηση της συγκέντρωσης σακχαρόζης σε 8% [5]. Η ωσμωτική πίεση που δημιουργήθηκε από τη σακχαρόζη μόνο και με άλλους ωσμωτικούς πράκτορες βρέθηκε για να ρυθμίζει την παραγωγή ανθοκυάνης στους πολιτισμούς συσσώρευσης *Vitis vinifera* [13] και νικοτίνης σε εκκρεμότητα του *Nicotiana tabacum* [35]. Εντούτοις, υψηλότερες συγκεντρώσεις της

σακχαρόζης 5% μείωσε την παραγωγή ανθοκυάνης στους πολιτισμούς αναστολής κυττάρων από το *Aralia cordata*, όπου 3% ευνόησε τη συσσώρευση ανθοκυάνης[54].

Οι βιταμίνες, όπως thiamine (βιταμίνη B1) και το myo-inositol, θεωρούνται ουσιαστικές για τον πολιτισμό των κυττάρων τεχνητών φυτών. Εντούτοις, άλλες βιταμίνες προστίθενται συχνά στα μέσα κυτταροκαλλιέργειας εγκαταστάσεων. Κατά συνέπεια, το μέσο κρατών μελών περιλαμβάνει το myoinositol, το nicotinic οξύ, pyridoxine το HCL, και thiamine το HCL [14].

Τα αμινοξέα συμπεριλαμβάνονται επίσης συνήθως στο οργανικό συμπλήρωμα. Ο συχνότερος είναι η γλυκίνη (arginine, asparagine, ασπαρτικό οξύ, αλανίνη, γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, και proline) χρησιμοποιείται επίσης και σε πολλές περιπτώσεις ο συνυπολογισμός τους δεν είναι ουσιαστικός [21]. Τα αμινοξέα παρέχουν μια πηγή NO_3^- όπως NH_4^+ , και η λήψη προκαλεί τον οξυνισμό του μέσου. Άλλα συμπληρώματα περιλαμβάνουν το οξύ casamino, peptone, τα εκχυλίσματα ζύμης, τα εκχυλίσματα βύνης, και το γάλα καρύδων. Το γάλα καρύδων είναι επίσης γνωστό ως προμηθευτής των ρυθμιστών αύξησης.

Το MEDIA για την κυτταροκαλλιέργεια εγκαταστάσεων τεχνητή μπορεί να χρησιμοποιηθεί με είτε υγρές είτε στερεές μορφές, ανάλογα με τον τύπο ανάπτυξης του πολιτισμού. Για οποιουσδήποτε τύπους πολιτισμού που απαιτούν να αυξηθούν στην επιφάνεια του μέσου, πρέπει να είναι σταθεροποιημένος ή πηγμένος. Το Άγαρ, που παράγεται από το φύκι, είναι ο πιο κοινός τύπος πήζοντας πράκτορα, και είναι ιδανικό για τις στερεότυπες εφαρμογές. Εντούτοις, επειδή είναι ένα φυσικό προϊόν, η ποιότητα Άγαρ μπορεί να ποικίλει από τον προμηθευτή στον προμηθευτή και από παρτίδα σε παρτίδα.

Η συγκέντρωση ρυθμιστών αύξησης είναι συχνά ένας κρίσιμος παράγοντας στη δευτεροβάθμια συσσώρευση προϊόντων [63]. Οι ρυθμιστές φυτοορμονών ή αύξησης απαιτούνται για να προκαλέσουν τους ιστούς κάλων και για να προωθήσουν την αύξηση πολλών γραμμών κυττάρων.

Δεδομένου ότι κάθε είδος εγκαταστάσεων απαιτεί τα διαφορετικά είδη και τα επίπεδα phytohormones για την επαγωγή κάλων, η αύξησή της, και η παραγωγή μεταβολιτών, αυτό είναι σημαντικές να επιλέξουν τους πιο κατάλληλους ρυθμιστές αύξησης και να καθορίσουν τις βέλτιστες συγκεντρώσεις τους.

Οι αυξίνες η και κυτοκυνίνες έχουν παρουσιάσει πιο αξιοπρόσεκτα αποτελέσματα στην αύξηση και την παραγωγικότητα των μεταβολιτών εγκαταστάσεων. Ο τύπος και η συγκέντρωση αυξίνης ή cytokinin ή η αυξίνη/cytokinin αναλογία αλλάζει εντυπωσιακά και την αύξηση και το σχηματισμό προϊόντων στα καλλιεργημένα κύτταρα φυτών.

Αυξίνες χρησιμοποιούνται γενικά στην κυτταροκαλλιέργεια εγκαταστάσεων σε ένα διάστημα συγκέντρωσης μεταξύ 0.1 έως 50 μM . Μια αύξηση αυξίνης των επιπέδων στο μέσο υποκινεί την διαφοροποίηση των κυττάρων, την κυτταροδιαίρεση, και το σχηματισμό και την αύξηση κάλων. Αναφέρονται για να μικρύνουν το επίπεδο δευτεροβάθμιων μεταβολιτών.

Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο αυξίνες προστίθενται συνήθως στο μέσο για την επαγωγή κάλων. Εντούτοις, για την παραγωγή των μεταβολιτών, προστίθενται σε μια χαμηλή συγκέντρωση.

Όπως **οι αυξίνες**, 2.4-D ή NAA χρησιμοποιείται συχνά. Ο ρυθμιστής αύξησης 2.4-D έχει αποδειχθεί για να εμποδίσει την παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών σε έναν μεγάλο αριθμό περιπτώσεων. Η αποβολή του 2.4-D ή της αντικατάστασής της από NAA ή IAA ενίσχυσε την παραγωγή από τις ανθοκυάνες σε εκκρεμότητα του *Daucus carota*, νικοτίνη στο *Nicotiana tabacum* [35], shikonin σε *Lithospermum erythrorhizon*, και των ανθρακινονών στο *citrifolia Morinda* [58, 64]. Εντούτοις, υποκίνηση από το 2.4-D έχει παρατηρηθεί στη βιοσύνθεση καρωτινοειδούς, στις αναστολές του *Daucus carota* [35], και στην παραγωγή ανθοκυάνης στα *linearis Oxalis* [37].

Οι κυτοκυνίνες χρησιμοποιούνται στην κυτταροκαλλιέργεια εγκαταστάσεων σε ένα διάστημα συγκέντρωσης 0.1 έως 10 μM . Πρωθούν την κυτταροδιαίρεση και διαμορφώνουν την έναρξη και την αύξηση κάλων. Οι

κυτοκυνίνες έχουν διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τον τύπο μεταβολίτη και ειδών που έχουν σχέση. Ο Kinetin υποκίνησε την παραγωγή της ανθοκυάνης στο *Harporarpus gracilus* αλλά εμπόδισε το σχηματισμό των ανθοκυανών στις κυτταροκαλλιέργειες *Populus* [46].

Οι γιββεριλίνες αντιπροσωπεύονται πάνω από 90 μορφές, αλλά το οξύ είναι το συνηθέστερο χρησιμοποιημένο για τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων. Ο Dicosmo και Misawa (1995) ανέφεραν ότι η αύξηση του κάλου *Taxus cuspidata* προωθήθηκε σημαντικά από την προσθήκη του γιββεριλικού οξέος στο στερεό μέσο. Εντούτοις, το γιββεριλικό οξύ καταστέλλει την παραγωγή των ανθοκυανών σε διάφορους πολιτισμούς [54].

3.2.1.2 Φυσικοί παράγοντες

Οι φυσικοί παράγοντες, όπως το φως, η θερμοκρασία, και το pH του μέσο, επηρεάζουν τη δευτεροβάθμια συσσώρευση μεταβολίτη σε πολλούς τύπους πολιτισμών.

Θερμοκρασία. Μια σειρά θερμοκρασίας 17-25 °C χρησιμοποιείται κανονικά για την επαγωγή των ιστών κάλων και την αύξηση της καλλιεργημένης αναστολής κυτάρων [46]. Εντούτοις, κάθε είδος εγκαταστάσεων καθώς επίσης και η κυτταροκαλλιέργεια του μπορούν να ευνοηθούν από μια διαφορετική θερμοκρασία. Όταν η θερμοκρασία διατηρήθηκε σε 19 °C, η βιολογική μεταβολή της διγιοξίνης στο digoxin ευνοήθηκε, ενώ 32 °C ήταν βέλτιστα για τον σχηματισμό ενός purpureaglycoside- στις κυτταροκαλλιέργειες *Digitalis lanata*. Μια υψηλότερη παραγωγή ubiquinone στις κυτταροκαλλιέργειες *Nicotiana tabacum* έχει παρατηρηθεί σε 32 °C όταν συγκρίνεται με 24 °C. Courtois και Guren (1980) εξέθεσαν 12 πτυχές υψηλότερη παραγωγή των αλκαλοειδών στις κυτταροκαλλιέργειες του *roseus Catharanthus* σε 16 °C σε σύγκριση με τα κανονικά 27 °C.

Φως. Η φασματική ποιότητα, η ένταση, και η περίοδος ελαφριάς ακτινοβολίας μπορούν να έχουν επιπτώσεις στις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων. Sakamoto και λοιποί. (1994) κατέδειξαν τη διεγερτική επίδραση της ελαφριάς

ακτινοβολίας στο σχηματισμό των ενώσεων όπως οι ανθοκυάνες, το vindoline, το catharanthine, και η καφεΐνη στους πολιτισμούς αναστολής κυττάρων.

Κατά συνέπεια, η συσώρευση της ανθοκυάνης υποκινήθηκε έντονα από το φως στις κυτταροκαλλιέργειες του *Daucus carota* και *Vitis vinifera* [10]. Mulder-Krieger και λοιποί.(1988) διαπίστωσαν ότι ο φωτισμός είχε επιπτώσεις στη σύνθεση sesquiterpenes στους πολιτισμούς κάλων του *Marticaria chamomilla*. Ο φωτισμός των αναστολών κυττάρων *Coffea arabica* ενίσχυσε τη βιοσύνθεση καφεΐνης από έναν παράγοντα σε δέκα [33].

pH μέσου. Το μέσο pH ρυθμίζεται συνήθως μεταξύ πέντε και έξι, και αποφεύγονται τα άκρα σε pH. Στο μέσο, η συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου αλλάζει κατά τη διάρκεια της αύξησης πολιτισμού. Το μέσο pH μειώνεται κατά τη διάρκεια της αφομοίωσης της αμμωνίας και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της λήψης νιτρικών αλάτων [46].

Ωσμωτική πίεση. Η συσώρευση των ανθοκυανών ενισχύθηκε από μια υψηλή ωσμωτική δυνατότητα στους πολιτισμούς αναστολής κυττάρων *Vitis vinifera* [14]. Η προσθήκη της σακχαρόζης ή mannitol στο μέσο ενίσχυσε την ωσμωτική πίεση και το επίπεδο ανθοκυανών που συσσωρεύθηκαν σε *Vitis - vinifera* ο πολιτισμός αυξήθηκε 1.5 φορές και έφθασε σε 55 μg κύτταρο⁻¹.

3.2.2 επεξεργασίες

3.2.2.1 Διατροφή προδρόμων

Η διατροφή προδρόμων είναι μια προφανής και δημοφιλής προσέγγιση στην αυξανόμενη δευτεροβάθμια παραγωγή μεταβολίτη στις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων. Η έννοια είναι βασισμένη στην ιδέα ότι οποιαδήποτε ένωση, που είναι μεσάζων, στην αρχή μιας δευτεροβάθμιας βιοσυνθετικής διαδρομής μεταβολίτη, στέκεται μια καλή πιθανότητα από την αύξηση της παραγωγής του τελικού προϊόντος. Οι προσπάθειες να προκληθεί ή να αυξηθεί η παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών εγκαταστάσεων,

με την παροχή του προδρόμου ή των ενδιάμεσων ενώσεων, είναι αποτελεσματικές σε πολλές περιπτώσεις. Τροφοδοτώντας ferulic οξύ στους κυτταροκαλλιέργειες της *Vanilla planifolia* οδήγησε σε μια αύξηση συσσώρευσης της vanillin [53]. Ομοίως, η σύνθεση ανθοκυάνης στο *Daucus carota* αποκαταστάθηκε από την προσθήκη ενός dihydroquarceitin (naringen). Επιπλέον, η προσθήκη geraniol στις κυτταροκαλλιέργειες *Catharanthus roseus* οδήγησε στη συσσώρευση nerol και της κιτρονελλόλης [34]. Fontanel και Tabata (1987) ανέφεραν ότι μια προσθήκη του τροπικού οξέος 500mM στο μέσο *Scorolia japonica* αύξησε το ποσό αλκαλοειδών μέχρι 14 φορές.

Σε πολλές περιπτώσεις, τα αμινοξέα έχουν χρησιμοποιηθεί ως ανέξοδοι πρόδρομοι των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών. Τα αμινοξέα έχουν προστεθεί στα μέσα πολιτισμού αναστολής κυττάρων για την παραγωγή των αλκαλοειδών τροπάνιου, indole των αλκαλοειδών, του φαινυλίου κ.λπ.

Η αλανίνη είναι ένας από τους βιοσυνθετικούς προδρόμους του rosmarinic οξέος [44], και η προσθήκη της στους πολιτισμούς αναστολής *Salvia officinalis* υποκίνησε την παραγωγή του rosmarinic οξέος και μίκρυνε το χρόνο παραγωγής επίσης.

Η χρήση του απόμακρου προδρόμου, της φαινυλαλανίνης, και ενός κοντινού προδρόμου, όπως το isocaproic οξύ, οδήγησε στην ενισχυμένη capsaicin περιεκτικότητα σε στις κυτταροκαλλιέργειες του καπνικού *frutescens* [24]. Η προσθήκη της λευκίνης οδήγησε στην αύξηση πτητικά μονοτερπενοειδών στους πολιτισμούς *Perilla frutescens* [34].

3.2.2.2 Απόκτηση

Οι δευτεροβάθμιοι μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν τις προσαρμογές των εγκαταστάσεων στην περιβαλλοντική πίεση, ή μπορούν να εξυπηρετήσουν όπως αμυντικές, προστατευτικές, ή δυσάρεστες χημικές ουσίες ενάντια στους μικροοργανισμούς, τα έντομα, και τα υψηλότερα χορτοφάγα αρπακτικά ζώα. Όταν μολύνονται από τον παθογόνο μικροοργανισμό, οι εγκαταστάσεις

αποκρίνονται με τη γρήγορη ενεργοποίηση διαφόρων στο χώρο και χρονικά ρυθμισμένες αμυντικές αντιδράσεις.

Αυτές οι απαντήσεις περιλαμβάνουν την οξειδωτική διασύνδεση των πρωτεϊνών κυπελοειδούς τοίχου, παραγωγή phytoalexins, των υδρολυτικών ενζύμων, και incrustation των πρωτεϊνών κυπελοειδούς τοίχου με phenolics, και, τελικά, του υπερευαίσθητου θανάτου του κυττάρου φυτών.

Η μικροβιακή εισβολή των εγκαταστάσεων προκαλεί τη σύνθεση των αντιμικροβιακών δευτεροβάθμιων μεταβολιτών με τον ίδιο τρόπο σαν παράγοντες πίεσης, όπως UV-irradiation, ο ωσμωτικός κλονισμός, τα λιπαρά οξέα, ανόργανα άλατα, και τα ιόντα βαρύ μετάλλου, προκαλούν τη σύνθεση των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών στις εγκαταστάσεις. Τα κύτταρα φυτού τεχνητά παρουσιάζουν φυσιολογικές και μορφολογικές απαντήσεις στους μικροβιακούς, φυσικούς, ή χημικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι γνωστοί ως elicitors.

Το Elicitor μπορεί να οριστεί ως μια ουσία που, όταν εισάγεται στις μικρές συγκεντρώσεις σε ένα σύστημα κυττάρων διαβίωσης, αρχίζει ή βελτιώνει τη βιοσύνθεση των συγκεκριμένων ενώσεων. Η απόκτηση είναι η προκληθείσα ή ενισχυμένη βιοσύνθεση των μεταβολιτών λόγω της προσθήκης των ποσών ιχνών elicitors [42].

Η παραγωγή πολλών πολύτιμων δευτεροβάθμιων μεταβολιτών που χρησιμοποιούν τα διάφορα elicitors αναφέρθηκε [40]. Σε πολλές περιπτώσεις τα elicitors που χρησιμοποιούνται βαριά μέταλλα στην κυτταροκαλλιέργεια είναι μεθυλικό jasmonate, salicylic οξύ, κα chitosan.

Ταξινόμηση Elicitors

Ο τύπος και η δομή των elicitors ποικίλλουν πολύ. Εξαρτάται από την προέλευσή τους ταξινομημένων βιοτικών ή αβιοτικών .

Η βιοτική πίεση μπορεί να προκληθεί από τη βακτηριακή, προερχόμενη από ιό, ή μυκητιακή επίθεση, καθώς επίσης και από τα βιοτικά elicitors. Περιλαμβάνουν:

- Τα ένζυμα, τεμάχια κυψελοειδούς τοίχου των μικροοργανισμών, πολυσακχαρίτες προήλθαν από τους μικροοργανισμούς (chitin ή glucans), και glycoproteins

- τα phytochemicals που παρήχθησαν από τις εγκαταστάσεις σε απάντηση στη φυσική επίθεση ζημίας, μυκήτων ή βακτηριδίων, πολυσακχαρίτες προήλθαν από τους κυψελοειδείς τοίχους εγκαταστάσεων (πηκτίνη ή κυτταρίνη), τεμάχια της πηκτίνης που διαμορφώνονται από τη δράση των μικροοργανισμών επάνω σε κυψελοειδής τοίχος εγκαταστάσεων [66] .

- chitosan, glucans, salicylic όξινο, μεθυλικό jasmonate (που διαμορφώνεται από τη δράση των εγκαταστάσεων στους μικροβιακούς κυψελοειδείς τοίχους) [17].

Τα αβιοτικά elicitors είναι οι ουσίες μη βιολογικής προέλευσης. Οι αιτίες της αβιοτικής πίεσης μπορούν να είναι χημικού ή φυσικού χαρακτήρα μεταξύ τους είναι:

- Χημικές ουσίες όπως τα ανόργανα άλατα, βαριά μέταλλα, μερικές χημικές ουσίες που ενοχλούν την ακεραιότητα μεμβρανών,

- φυσικοί παράγοντες όπως τη μηχανική πληγή, την υπεριώδη ακτινοβολία, την υψηλή αλατότητα, υψηλό ή χαμηλό osmolarity, ακραία θερμοκρασία (πάγωμα, ξεπαγώνω), υψηλή πίεση.

Απόκτηση και παραγωγή του δευτεροβάθμιου μεταβολίτη από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων

Ο πίνακας 10 επεξηγεί τα διαφορετικά είδη εγκαταστάσεων παράγοντας τους διάφορους δευτεροβάθμιους μεταβολίτες στην απόκτηση.

Παραδείγματος χάριν, το νάτριο orthovanadate και το θειικό άλας vanadyl προκάλεσαν τη συσσώρευση isoflavone glucosides στους πολυτισμούς και indole Vigna angularis συσσώρευση αλκαλοειδών στους πολυτισμούς Catharanthus roseus , αντίστοιχα ([42].

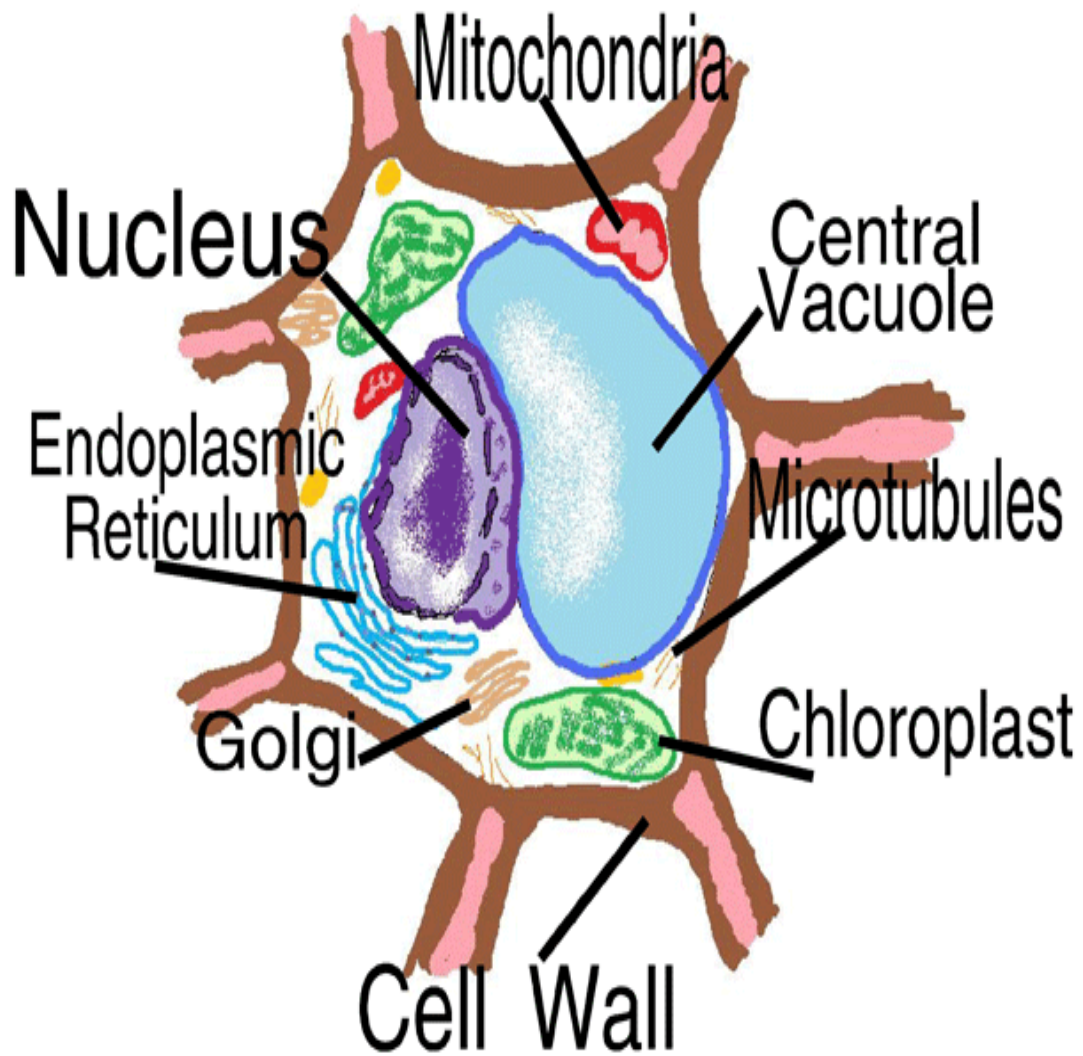
Οι περισσότερες από τις στρατηγικές που υιοθετούν τα μυκητιακά elicitors χρησιμοποιούν τα απροσδιόριστα μίγματα, όπως η αποστειρωμένη μυκητιακή ομοιογένεια ή τα μυκητιακά διηθήματα πολιτισμού. Με η εκτίμηση διάφορων παραμέτρων, όπως η ιδιομορφία και η συγκέντρωση elicitor, η διάρκεια της επαφής, και η ποιότητα των συσσωρευτικών προϊόντων έχει αναφερθεί.

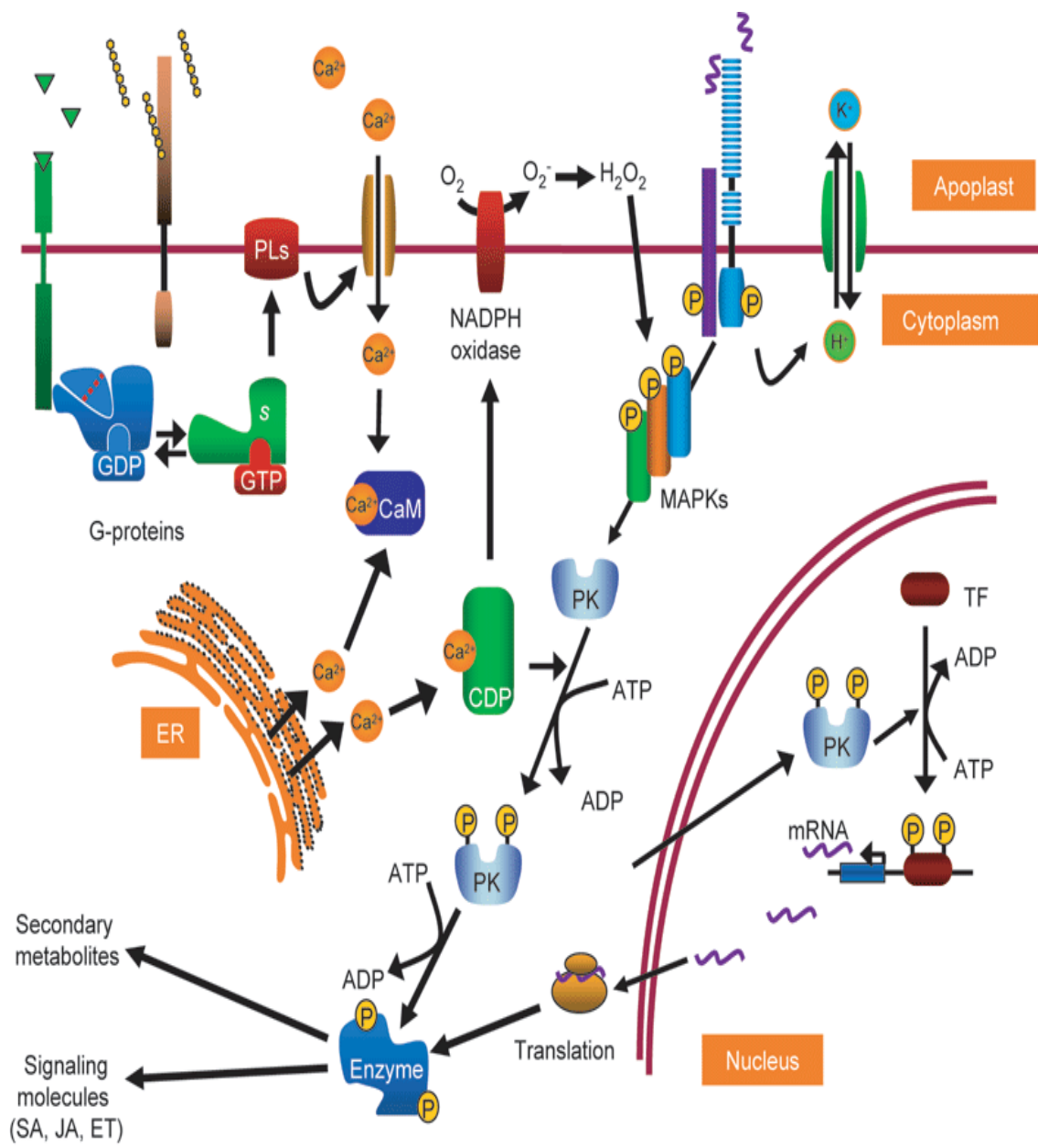
Οι μικροβιακές μολύνσεις των άθικτων εγκαταστάσεων αποσπούν συχνά τη σύνθεση των συγκεκριμένων δευτεροβάθμιων μεταβολιτών. Τα καλύτερα κατανοητά συστήματα είναι εκείνα των μυκητιακών παθογόνων, οπότε σ'αυτή την περίπτωση τα ρυθμιστικά μόρια έχουν προσδιοριστεί ως glucan πολυμερή σώματα, glycoproteins, και χαμηλός - οργανικά οξέα μοριακού βάρους(Πίνακας 11).

Πίνακας 10 αβιοτικές elicitors και παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών

Αβιοτικό elicitor	Προϊόν	ιστοκαλλιέργεια	πηγές
High electric field pulses	Amaranthin	<i>Chenopodium rubrum</i>	Knorr et al. 1993
High hydrostatic pressure	Catharanthus Anthraquinones	<i>Chenopodium rubrum</i> <i>Morinda citrifolia</i>	Knorr et al. 1993 Dørnernburg and Knorr 1997
Metal ions: Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Al ³⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Va ²⁺	Isoflavonoids	<i>Vigna alularis</i>	Namdeo 2007
Ultrasound	Saponins Anthraquinones	<i>Panax ginseng</i> <i>Morinda citrifolia</i>	Hu et al. 2003 Dørnernburg and Knorr 1997

Plant Cell





Πίνακας 11 βιοτικές elicitors και παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών

Βιοτικό elicitor	Προϊόν	Κυτταροκαλλιέργεια	Refs.
Agaropectin	Shikonin	Lithospermum erythrorhizon	Namdeo 2007
Chitosan	Antraquinones	Rubia tinctorum	Vasconsuelo et al. 2004
	Antraquinones	Morinda citrifolia	Dornenburg and Knorr 1997
Fungal elicitor	Acridone expoxide	Ruta gravelones	Dornenburg and Knorr 1997
	Antraquinones	Morinda citrifolia	Dornenburg and Knorr 1997
	Codeine, morphine	Papaver somniferum	Dicosmo and Misawa 1995
	Taxol	Taxus sp.	Wang et al. 2003
	Rosmarinic acid	Coleus blumei	Szabo et al.1999
Jasmonic acid	Sanquinarine	Papaver somniferum	Dicosmo and Misawa 1995
Methyl jasmonate	Anthocyanins	Viti vinifera	Curtin et al.2003
	Capsidiol, nicotine	Nicotiana tabacum	Namdeo 2007
	Rosmarinic acid	Coleus blumei	Szabo et al. 1999
	Taxol	Taxus sp.	Tabata 2006
Salicylic acid	Azadirachtin	Azadirachta indica	Namdeo 2007
Yeast elicitor	Antraquinones	Morinda citrifolia	Dornenburg and Knorr 1997
	Rosmarinic acid	Coleus blumei	Petersen and Simmond 2003

Dicosmo και Misawa (1995) που περιγράφονται ότι μια γραμμή κυττάρων *Paraver somniferum* σύνθεσε και συσσωρεύσε το sanguinarine, ένα τεσσάρων καταστάσεων αλκαλοειδών benzophenanthridine όταν εκτίθεται σε μια ομοιογένεια *Botrytis fungus*.

Μια μερίδα του sanguinarine απελευθερώθηκε στο μέσο πολιτισμού. Επεξεργασία *paraver* - οι αναστολές κυττάρων *somniferum* με μια ομοιογένεια *Botrytis* του μυκηλίου οδήγησαν στη συσσωρευση 3% DW του sanguinarine.

Η αύξηση της παραγωγής των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών μετά από την απόκτηση συγκρίνεται με αυτήν του ελέγχου, όπως φαίνεται στον πίνακα 12.

Επιπλέον, το περιεχόμενο του rosmarinic οξέος στα καλλιεργημένα κύτταρα *Lithospermum erythrorhizon* αυξήθηκε μετά από την προσθήκη του εκχυλίσματος ζύμης: ένα μέγιστο επιτεύχθηκε σε 24 χ [44]. Όταν τα κύτταρα φυτών αντιμετωπίστηκαν με το εκχύλισμα ζύμης, τη 6η ημέρα της καλλιέργειας, το επίπεδο rosmarinic οξέος αυξήθηκε 2.5 φορές.

Εντούτοις, η χρήση των μικροβιακών elicitors μπορεί να μην είναι οικονομική δεδομένου ότι ένας elicitor-παράγοντας μικροοργανισμός πρέπει να καλλιεργηθεί χωριστά από το cultivation των κυττάρων φυτών. Το κόστος ζύμωσης για έναν elicitor-παράγοντα μικροοργανισμού είναι όχι πάντα χαμηλό.

Χαρακτηριστικά Elicitors

Διάφορες παράμετροι, όπως η συγκέντρωση και η επιλεκτικότητα elicitor, η διάρκεια της έκθεσης elicitor, η ηλικία του πολιτισμού, η γραμμή κυττάρων, ο κανονισμός αύξησης, η θρεπτική σύνθεση, η ποιότητα των υλικών κυψελοειδούς τοίχου, και η ουσιαστική αύξηση της συσσωρευσης προϊόντων έχουν αναφερθεί.

Συγκέντρωση Elicitor. Το Namdeo (2007) εξέθεσε την υψηλότερη συσσώρευση του ajmalicine στους πολιτισμούς *Catharanthus roseus* όταν αντιμετωπίζονται με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των αποσπασμάτων elicitor *Trichoderma - viride*, ραντιστήρι Νίγηρας, και ***Fusarium moniliforme***. Η συσσώρευση Ajmalicine ήταν υψηλότερη στα κύτταρα που αποσπάστηκαν με την υψηλότερη συγκέντρωση (5.0%) των αποσπασμάτων elicitor έναντι της χαμηλότερης συγκέντρωσης (0.5%). Εντούτοις, περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης μέχρι 10.0% είχε επιπτώσεις στη συσσώρευση του ajmalicine. Η υψηλή δόση του elicitor έχει αναφερθεί για να προκαλέσει την υπερευαίσθητη απάντηση που οδηγεί στο θάνατο κυττάρων, ενώ ένα βέλτιστο επίπεδο απαιτήθηκε για την επαγωγή.

Διάρκεια της έκθεσης elicitor. Κύτταρα του *Catharanthus roseus* που εκτίθενται με τα αποσπασματα elicitor *Trichoderma - το viride* για 24, 48, 72, και 96h εξετάστηκαν.

Περίπου τριπλάσια αύξηση στην παραγωγή ajmalicine από *Catharanthus* τα κύτταρα *roseus* που αποσπάται με τα αποσπασματα *Trichoderma - viride* για 48 χ [2]. Εντούτοις, ο περαιτέρω αυξανόμενος χρόνος έκθεσης οδήγησε στη μείωση στην περιεκτικότητα σε ajmalicine.

Ηλικία του πολιτισμού. Τα κύτταρα *roseus Catharanthus* των πολιτισμών 20 ημερών παρουσίασαν υψηλότερες παραγωγές του ajmalicine στην απόκτηση. Υψηλότερο ajmalicine (166 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ DW) συσσωρεύθηκε στα κύτταρα 20 ημερών που αποσπάστηκαν με τα αποσπασματα *Trichoderma - viride* [42].

Εκτός από αυτά τα χαρακτηριστικά, η αποδοτικότητα της απόκτησης εξαρτάται επίσης από την ιδιομορφία elicitor, τη γραμμή κυττάρων ή τους κλώνους του μικροβιακού elicitor χρησιμοποιούμενη, την παρουσία ρυθμιστών αύξησης, και των περιβαλλοντικών συνθηκών.

3.2.3 Ακίνητοποίηση και αίτηση των ακίνητοποιημένων κυττάρων

Η ακίνητοποίηση έχει χαρακτηριστεί ως τεχνική που περιορίζει ένα καταλυτικά ενεργό ένζυμο ή ένα κύτταρο και αποτρέπει την είσοδό της μέσα σε κινητή φάση, όποιος φέρνει το υπόστρωμα και το προϊόν [30]. Η ακίνητοποίηση των κυττάρων φυτών έχει τα ευδιάκριτα πλεονεκτήματα ως βιοκαταλύτη σε θέματα του ακίνητοποιημένου ενζυμικού συστήματος.

Ακίνητοποιώντας τα κύτταρα σε ένα πήκτωμα, το οποίο είναι διαπερατό στα μόρια θρεπτικού του μέσου ή στα πολυμερή σώματα (με σκοπό τη συντήρηση μεταβολικού τους και η ικανότητα τους να χρησιμοποιηθεί αρκετές φορές), έχει το πλεονέκτημα το χρόνο παραγωγής των κυττάρων (πάνω από έξι μήνες) και τα κύτταρα να καταλύσει την ίδια αντίδραση σχεδόν κατά τρόπο αόριστο.

Η χρήση των ακίνητοποιημένων κυττάρων πρέπει να παρακάμψει την άμεση εξαγωγή των ενώσεων από τη βιομάζα καθώς τα προϊόντα προκύπτουν στο ίδιο το μέσο. Τα ακίνητοποιημένα κύτταρα μπορούν να διενεργήσουν τις πολυ-ενζυμικές διαδικασίες με την επιλογή των ιδιαίτερα βιοσυνθετικών κυττάρων, η καταλυτική δραστηριότητα μπορεί να ενισχυθεί δεν υπάρχει καμία ανάγκη να παρασχεθούν παράγοντες δεδομένου ότι τα κύτταρα τα παράγουν οι ίδιοι.

Τα ακίνητοποιημένα κύτταρα φυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις ενιαίες και πολλαπλών βημάτων βιολογικές μεταβολές των προδρόμων στα επιθυμητά προϊόντα καθώς επίσης και για τη βιοσύνθεση de-novo των δευτερογενών μεταβολιτών (δείτε 3.2.4 «βιολογική μεταβολή»).

Η ακίνητοποίηση των κυττάρων φυτών θεωρείται σπουδαιότητας στην έρευνα και την ανάπτυξη στις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων, λόγω των πιθανών οφελών που θα μπορούσαν να παρασχεθούν [30]:

- Η εκτεταμένη βιωσιμότητα των κυττάρων στο στάσιμο (και παράγοντας) στάδιο, που επιτρέπει τη συντήρηση της βιομάζας κατά τη διάρκεια ενός παρατεταμένου χρονικού διαστήματος

- απλουστευμένη προς τα κάτω επεξεργασία (εάν τα προϊόντα εκκρίνονται)
- προώθηση της διαφοροποίησης, που συνδέεται με τον ενισχυμένο δευτεροβάθμιο μεταβολισμό
- μείωση του κινδύνου μόλυνσης
- μειωμένη ευαισθησία κουράς (ειδικά με τα παγιδευμένα κύτταρα)
- προώθηση της δευτεροβάθμιας έκκρισης μεταβολίτη, σε μερικές περιπτώσεις
- ελαχιστοποίηση της ρευστής αύξησης ιξώδους, η οποία στην αναστολή κυττάρων προκαλεί τα προβλήματα μίξης και αερισμού.

Ένα σύστημα ακινητοποίησης, που θα μπορούσε να διατηρήσει τα βιώσιμα κύτταρα κατά τη διάρκεια μιας εκτεταμένης χρονικής περιόδου και να απελευθερώσει τον όγκο του προϊόντος στο extracellular μέσο σε μια σταθερή μορφή, θα μπορούσε εντυπωσιακά να μειώσει το κόστος παραγωγής φυτοχημικών στην κυτταροκαλλιέργεια εγκαταστάσεων. Εντούτοις, ένα ακινητοποιημένο σύστημα περιγράφει τα προβλήματα παρακάτω:

Η ακινητοποίηση περιορίζεται κανονικά στις περιπτώσεις όπου η παραγωγή αποσυνδέεται από την αύξηση κυττάρων

- η αρχική βιομάζα πρέπει να αυξηθεί σε εκκρεμότητα
- η έκκριση του προϊόντος extracellularly στο μέσο είναι επιτακτική
- όπου η έκκριση εμφανίζεται, μπορούν να υπάρξουν προβλήματα της extracellular υποβάθμισης των προϊόντων
- όταν η παγίδευση πηκτωμάτων χρησιμοποιείται, η μήτρα πηκτωμάτων εισάγει ένα πρόσθετο εμπόδιο διάχυσης.

Οι βιοκαταλύτες μπορούν να ακινητοποιηθούν από τον περιορισμό μέσα σε μια πορώδη μεμβράνη (παγίδευση πηκτωμάτων, αντιδραστήρας μεμβρανών, ενδιάμεση μεμβράνη) ή από τη σύνδεση σε μια στερεά επιφάνεια

(εσωτερική επιφάνεια μιας πορώδους δομής, εξωτερική επιφάνεια ενός μεταφορέα από την προσρόφηση ή ομοιοπολικός δεσμός) [30].

Η φυσική παγίδευση σε μια πορώδη μήτρα είναι η πιο εύκαμπτη και δημοφιλέστερη προσέγγιση που υιοθετείται για ολόκληρη την ακινητοποίηση κυττάρων. Μια διαδικασία που σχεδιάζεται για την αποδοτική παγίδευση ολόκληρων των κυττάρων πρέπει να επιτρέψει τα εξής:

- Υψηλή διατήρηση της βιωσιμότητας κυττάρων (τη βιολογική δραστηριότητα των παγιδευμένων κυττάρων δεν πρέπει να εξασθενίσουν οι όροι ακινητοποίησης)
- το πορώδες του διαμορφωμένου πηκτώματος πρέπει να είναι ομοιόμορφο και ελέγξιμο (οι ελεύθερες ανταλλαγές των υποστρωμάτων, των προϊόντων, co-factors, και των αερίων είναι ουσιαστικές για την αποδοτική απόδοση των ακινητοποιημένων κυττάρων)
- το πηκτωμα πρέπει να διατηρήσει την καλή μηχανική, χημική, και βιολογική σταθερότητα (δεν πρέπει να υποβιβαστεί εύκολα από τα ένζυμα, τους διαλύτες, τις αλλαγές πίεσης, ή τις δυνάμεις κουράς)
- το πηκτωμα πρέπει να αποτελείται από τα εύλογα διατιμημένα συστατικά.

Οι διάφορες μέθοδοι ακινητοποίησης έχουν αναπτυχθεί (παγίδευση, προσρόφηση, και ομοιοπολική σύζευξη). Η ευρύτατα χρησιμοποιημένη τεχνική περιλαμβάνει την παγίδευση των κυττάρων σε κάποιο είδος πηκτώματος ή σε συνδυασμό πηκτωμάτων που επιτρέπονται για να πολυμερίσουν. Το Brodelius και Pedersen (1993) καθώς επίσης και Alfermann και Petersen (1995) περιέγραψαν την παγίδευση των βιώσιμων κυττάρων του *Catharanthus roseus*, *citrifolia Morinda*, και *Digitalis to lanata* στο πηκτωμα άλατος αλγινικού οξέος ασβεστίου και αυτήν η τεχνική έχει λάβει πολλή προσοχή. Το άλας αλγινικού οξέος, το Άγαρ, το αγαρόζη, η ζελατίνη, η καραγενίνη, και polyacrylamide ασβεστίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα [25]. Εντούτοις, τα πηκτώματα του άλατος αλγινικού οξέος ευρύτατα χρησιμοποιούνται λόγω της απλότητας και της σχετικής έλλειψης τοξικότητάς

τους. Οι άλλες εναλλακτικές υποστηρίξεις είναι μεμβράνες αφρός και κοίλοι-ίνες πολυουρεθάνιου. Ο πίνακας 13 δίνει διάφορα παραδείγματα των συστημάτων της ακινητοποίησης, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί με τα κύτταρα φυτών μαζί με τα σχετικά είδη εγκαταστάσεων και τα προϊόντα τους.

Η εργασία με το *Catharanthus roseus* έδειξε ότι το Άγαρ, αγαρόζη, και *carageenan* ήταν όλες οι κατάλληλες μήτρες ακινητοποίησης, κατάλληλες για τη συντήρηση της βιωσιμότητας κυττάρων αλλά το άλας αλγινικού οξέος ήταν ανώτερο από την άποψη της παραγωγής *ajmalicine* [7].

Η ακινητοποίηση προσρόφησης έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς με διάφορα είδη εγκαταστάσεων. Τα κύτταρα καψικού *frutescens* που ακινητοποιήθηκαν στον αφρό πολυουρεθάνιου παρήγαγαν 50 χρόνους περισσότερο *capsaicin* απ' ό, τι τα κύτταρα αναστολή [24]. Γενικά, φαίνεται ότι η ήπια ακινητοποίηση είτε μέσω της παγίδευσης πηκτωμάτων είτε της προσρόφησης επιφάνειας ενισχύει την παραγωγικότητα και παρατείνει τη βιωσιμότητα των καλλιεργημένων κυττάρων.

Τα ακινητοποιημένα κύτταρα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαταλύτες για τις βιολογικές μεταβολές (δείτε 3.2.4 «βιολογική μεταβολή»). Ένα τέτοιο σύστημα συγκρίνει ευνοϊκά με τη χρήση των ελεύθερα ανασταλμένων κυττάρων δεδομένου ότι, στην περίπτωση της ακινητοποίησης, ο καταλύτης είναι θεωρητικά επαναχρησιμοποιήσιμος και το προϊόν είναι εύκολα χωρισμένος από τη βιομάζα.

Η ακινητοποίηση μπορεί να ασκήσει δραματική επίδραση στην κυψελοειδή φυσιολογία και το δευτεροβάθμιο σχηματισμό προϊόντων. Οι απαντήσεις κυτταροκαλλιέργειας συνοψίζονται στον πίνακα 14.

Το Dicosmo και Misawa (1995) διαπίστωσαν ότι οι ίνες υάλου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορέας των κυττάρων φυτών για να παράγουν τους χρήσιμους μεταβολίτες εγκαταστάσεων. *Paraver somniferum* cells ακινητοποιήθηκε στο ύφασμα των αόριστα υφαμένων ινών πολυεστέρα που τακτοποιήθηκαν σε ένα spiral διαμόρφωση στο πλαίσιο υποστήριξης ανοξειδωτού για να παράγει το *sanguinarine*, ένα αντιβιοτικό

στην προφορική υγιεινή. Η παραγωγή ήταν 3.6 mg γ^{-1} FW από τα ακινητοποιημένα κύτταρα και ήταν περισσότερο από δύο φορές περισσότερο απ' ό, τι από τα κύτταρα αναστολής.

Οι πολυουρεθάνιο-ακινητοποιημένοι *frutescens*-κύτταρο-ταϊσμένοι καψικό *capsaicin* πρόδρομοι παρήγαγαν αυτόν τον μεταβολίτη σε επίπεδα μέχρι 100 φορές εκείνων των μη-ταϊσμένων πολιτισμών. Τα κύτταρα καψικού *frutescens* που ακινητοποιήθηκαν στο πολυουρεθάνιο απελευθέρωσαν *capsaicin* εξ ολοκλήρου στο μέσο, αν και άλλα είδη που ακινητοποιήθηκαν με την ίδια μέθοδο διατήρησαν το προϊόν *intracellularly* [24].

Πολλοί μεταβολίτες εμφανίζονται ακόμα να συσσωρεύουν *vacuoles* κυττάρων και είναι επομένως σημαντικό να ληφθούν περαιτέρω οι πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο αυτός ο μεταβολίτης μπορεί απελευθερώνεται στο *culturemedium*. Το *Chenopodium rubrum* cells, που ακινητοποιήθηκε στις χάντρες άλατος αλγινικού οξέος, εξέκρινε την κόκκινη *betacyanin* χρωστική ουσία *amaranthin* στο μέσο [31]. Εντούτοις, η χρωστική ουσία υποβιβάστηκε στη συνέχεια *chitosan* και *DMSO* επέτρεψαν την περαιτέρω απελευθέρωση προϊόντων στο *extracellular* μέσο, αλλά αυτό συνοδεύθηκε επίσης κοντά - υποβάθμιση προϊόντων.

3.2.4 Βιολογική μεταβολή και τα πλεονεκτήματά του

Η βιολογική μεταβολή μπορεί να οριστεί ως μια διαδικασία μέσω της οποίας οι οργανικές ενώσεις μπορούν να τροποποιηθούν από τις κυτταροκαλλιέργειες με συνέπεια τα χημικά διαφορετικά προϊόντα. Υπάρχουν δύο κύριοι λόγοι να επιλεχθούν τα κύτταρα φυτών για λόγους βιολογικής μεταβολής: Αρχικά, αυτά τα κύτταρα είναι γενικά ικανά να καταλύσουν τις αντιδράσεις *stereospecifically*, με συνέπεια τα *chirally* καθαρά προϊόντα. Αφετέρου, μπορούν να εκτελέσουν τις *Regio*-συγκεκριμένες τροποποιήσεις που δεν πραγματοποιούνται εύκολα από τη χημική σύνθεση ή από τους μικροοργανισμούς [46]. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν τη μείωση,

οξειδωση, υδροξυλίτις, ακετυλίωση, esterification, glucosylation, ισομερισμός, μεθυλίωση, demethylation, epoxidation, κ.λπ. [1]. Η παρουσία δυνατότητας βιολογικής μεταβολής στα κύτταρα φυτών είναι μια απαραίτητη προϋπόθεση για την πρακτική εφαρμογή.

Τα πλεονεκτήματα της βιολογικής μεταβολής περιλαμβάνουν την αύξηση στην παραγωγικότητα από την επιθυμητή ένωση και την παραγωγή των νέων ενώσεων. Σημαντικά, οι μελέτες για το μόλυβδο βιολογικής μεταβολής στις βασικές πληροφορίες που διευκρινίζουν η βιοσυνθετική διάβαση, και η κατάλυση μπορούν να πραγματοποιηθούν υπό τους ήπιους όρους, μειώνοντας κατά συνέπεια τα ανεπιθύμητα υποπροϊόντα, την ενέργεια, την ασφάλεια, και τις δαπάνες.

Η σειρά των μεταβολιτών και των φαρμακευτικών ειδών γεύσης που παράγονται από τις κυτταροκαλλιέργειες εγκαταστάσεων μέσω της βιολογικής μεταβολής παρουσιάζεται στον πίνακα 15.

Η μετατροπή μονοτερπενοειδών μελετήθηκε με τα είδη *Mentha* κοντά Dornenburg και Knorr (1997). Πολιτισμοί αναστολής του *Mentha canadensis* και το *Mentha piperita* ήταν σε θέση να συνθέσει limonene καθώς επίσης και οξυγόνωση, acetylated μονοτερπενοειδές. Εντούτοις, οι παραγωγές αυτές ενώσεις ήταν χαμηλές και μονοτερπενοειδή glucosides συσσωρεύθηκαν στα υψηλότερα ποσά από ελεύθερα. Οι πολιτισμοί αναστολής *Mentha* μεταβόλισαν τις εξωγενή μονοτερπενοειδή κετόνες και τα οινοπνεύματα μέσα 24 χ, και το glucosilation εμφανίστηκαν. Το Glucosilation ήταν ένας μηχανισμός αποτοξίνωσης των φυτοτοξικών ενώσεων από τα κύτταρα φυτών, και οδήγησε στη συσσώρευση και υδροδιαλυτά προϊόντα. Διαφορετικά, εξογενώς εφαρμοσμένα τοξικά monoterpenes υποβιβάστηκαν και μεταβολίστηκαν από το κύτταρο πολιτισμοί χωρίς πρόσθετες περιοχές συσσώρευσης. Τα εξωγενή τερπένια έχουν αποδειχθεί για να μεταβολιστούν γρήγορα από τους πολιτισμούς αναστολής κυττάρων για να διαμορφώσουν τα προϊόντα βιολογικής μεταβολής και υποβάθμισης. Ωστόσο το συμπέρασμα ότι οι εγκαταστάσεις οι διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας για τις αποδεκτές

παραγωγές προϊόντων μπορούν να είναι κατανοητές εάν το επιθυμητό προϊόν μπορεί να συσσωρευθεί σε μια μη πολική οργανική φάση ή να προσροφηθεί.

Για μια επιτυχή διαδικασία, οι ακόλουθες προϋποθέσεις πρέπει να συναντηθούν (Knorr 1987): ο πολιτισμός πρέπει να έχει τα απαραίτητα ένζυμα το υπόστρωμα ή ο πρόδρομος δεν πρέπει να είναι τοξικό στον πολιτισμό το υπόστρωμα πρέπει να φθάσει στο κυψελοειδές διαμέρισμα του κυττάρου και το ποσοστό σχηματισμού προϊόντων πρέπει να είναι γρηγορότερο από τον περαιτέρω μεταβολισμό του.

Πίνακας 13 ακινητοποιημένα συστήματα κυττάρων φυτών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των δευτεροβάθμιων μεταβολιτών

Ακινητοποίηση μεθοδων	φυτικά ειδη	Υπόστρωμα/πρόδρομος	προϊόν	πηγές
Biotransformation				
Agarose	Catharanthus roseus	Cathenamine	Ajmalicine	Asada and Shuler 1989
Alginate	Digitalis lanata	Digitoxin	Digoxin	Alfermann and Petersen 1995
Polyurethane foam	Papaver somniferum	Codeinone	Codeine	Dicosmo and Misawa 1995
Synthesis from precursors				
Alginate	Nicotiana tabacum	Phenylalanine	Caffeoyl putrescine	Berlin et al.1981
Alginate,agarose	Catharanthus roseus	Tryptamine,secologanin	Ajmalicine	Brodelius and Pedersen 1993
	Lithospermum erythrorhizon		Shikonin	Kim and Chang 1990
Polyurethane foam	Capsicum frutescens	Isocapric acid	Capsaicin	Brodelius and Pedersen 1993
De novo synthesis				
Alginate	Morinda citrifolia		Anthraquinon	Dornenburg and Knorr 1997
Aginate, agarose	Catharanthus roseus		Ajmalicine	Brodelius and Pedersen 1993
Hollow	Glycine max		Phenolics	Brodelius and Pedersen 1993
Polyurethane foam	Capsicum frutescens		Capsaicin	Johnson and Ravishankar 1996

Πίνακας 14 αποτελέσματα της ακινητοποίησης στη δευτεροβάθμια παραγωγή μεταβολίτη στις κυτταροκαλλιέργειες

Τύπος ακινητοποίηση	Είδη εγκαταστάσεων	Προϊόν	Πτυχές αλλαγής	πηγές
Foam	Capsicum frutescens	Capsaicin	> 100	Johnson and Ravishankar 1996
Calcium alginate	Lithospermum erythrorhizon	Shikonin	2.5	Kim and Chang 1990
Natural glass	Papaver somniferum	Saquinarine	2	Dicosmo and Misawa 1995
Gel	Coffea arabica	Methylxanthin	13	Brodellius and Pedersen 1993
	Capsicum frutescens	Capsaicin	> 100	Johnson and Ravishankar 1996
	Chenopodium rubrum	Betacyanin		Knorr and Berlin 1987

Πίνακας 15 βιολογική μεταβολή των ενώσεων γεύσης από τα συστήματα κυτταροκαλλιέργειας εγκαταστάσεων

ΦΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΠΡΟΙΟΝ	ΠΗΓΕΣ
Coffea arabica	Vanillin Capsaicin	Vanillin glucosides Capsaicin glucoside somenthone	Johnson and Ravishankar 1996
Mentha spp.	Pulegone Menthol	Neomenthol	Dornenburg and Knorr 1997
Papaver bracteatum	Linalyl acetate	Linalool, geraniol	Dicosmo and Misawa 1995
Vanilla planifolia	Ferulic acid	Vanillin	Romagnoli and Knorr 1988

4 . ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

4.1. Εξίδρωση

Πολλές ενώσεις που συντίθενται από τα φυτά αποθηκεύονται στο κυτταρικό κενό. Η ενίσχυση των ενώσεων από vacuoles στο μέσο της κυτταροκαλλιέργειας θα ήταν πολύ χρήσιμη από την άποψη του κόστους για την ανάκτηση του προϊόντος. Αυτό θα μπορούσε να περιλαμβάνει την ανάπτυξη προσθέσεων χημικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων για να προκαλέσει τέτοια εξίδρωση. Μπορεί επίσης να είναι δυνατό να ανακτηθούν οι ουσίες που εκκρίνονται στο μέσο. Για αυτή την μέθοδο, θα μπορούσε να είναι απαραίτητο να εξετασθούν οι φυσιολογικοί μηχανισμοί των μεταβολιτών για την απελευθέρωση τους από τα φυτικά κύτταρα. Ο Lee και Shuler (2000) έδειξαν ότι η συσσώρευση indole των αλκαλοειδών στο *Catharanthus vacuoles* έχουν αποδοθεί σ' έναν μηχανισμό ιονικό σε μορφή παγίδων, με το οποίο το βασικό indole αλκαλοειδές παγιδεύεται στο όξινο vacuole λόγω της θετικής δαπάνης του με χαμηλό pH, που αποτρέπει τη διάχυση πέρα από το tonoplast. Ο Kim κ.α.(2004) ανέφερε πως σχεδόν όλο το Taxol που παράχθηκε από το *Taxus brevifolia* κυτταροκαλλιέργειας ανιχνεύθηκε στην ιστοκαλλιέργεια του διηθήματος.

4.2.Συστήματα δύο σταδίων

Οι περιοχές της σύνθεσης και αποθήκευσης των δευτερογενών ενώσεων στα φυτικά κύτταρα πραγματοποιούνται συχνά στα χωρισμένα διαμερίσματα. Η συσσώρευση των δευτερογενών μεταβολιτών στις κυτταροκαλλιέργειες συνδέεται πιθανότατα με την παρουσία εξειδικευμένων

δομών του περιλαμβάνουν τα εκκριτικά και accumulatory στοιχεία , όπως οι αδένες πετρελαίου ,τα plaudular trichomes ή μια glandular επιδερμίδα [17].Η ενθυλάκωση των κυτταροτοξικών ενώσεων χρησιμεύει ως ένας ανεξαρτήτως μηχανισμός προστασίας των άθικτων φυτικών κυττάρων.

Στα αδιαφοροποίητα φυτικά κύτταρα καλών ή αναστολής , λείπουν αυτές οι περιοχές συσσώρευσης .Αυτό είναι ίσως ο λόγος για τις χαμηλές αποδόσεις τέτοιων ενώσεων που επιτυγχάνονται σ αυτές τις κυτταροκαλλιέργειες φυτών. Μια μικρή συσσώρευση δευτερογενών ενώσεων στις κυτταροκαλλιέργειες μια στο εκατομμύριο μπορεί να μην οφείλονται σε έλλειψη βιοσυνθετικών ενζύμων, αλλά λόγω της αναστολής της ανάδρασης ενζυματικής ή μη ενζυματικής υποβάθμισης του προϊόντος στο μέσω ή στην αστάθεια των ουσιών που παράχθηκαν .Στις περιπτώσεις αυτές , πρέπει να αυξηθεί η καθαρή παραγωγή από την προσθήκη μιας τεχνητής περιοχής για την συσσώρευση προϊόντος π.χ. μέσω του δεύτερου στερεού ή υγρής φάσης που εισάγεται στο υδάτινο μέσο.

Η χρήση της κανονικής αφαίρεσης προϊόντων των μεταβολιτών έχει διάφορα βασικά πιθανά πλεονεκτήματα πέρα από την προώθηση της έκκρισης. Η αφαίρεση και ο διαχωρισμός του προϊόντος σ ένα μη βιολογικό διαμέρισμα μπορεί να αύξηση τη συνολική παραγωγή της [46].

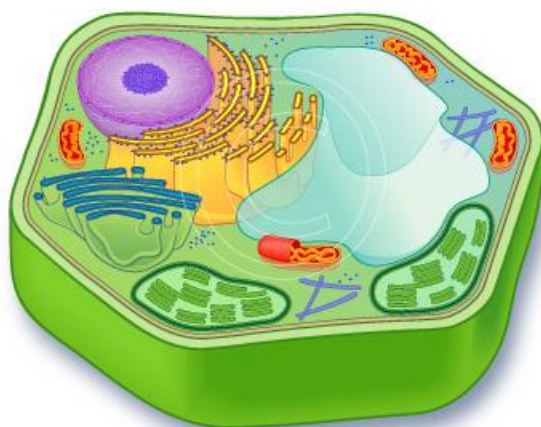
Η προσθήκη μιας τεχνητής περιοχής για την συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών μπορεί να είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για τις βιοσυνθετικές πορείες στις καλλιέργειες φυτικών κυττάρων. Εάν ο σχηματισμός ενός προϊόντος που υπόκειται σε αναστολή ανατροφοδοτήσει της παρεμπόδιση ή την ενδοκυτταρική υποβάθμιση , την αφαίρεση και τον διαχωρισμό προϊόντος σ ένα τεχνητό διαμέρισμα μπορεί να αυξήσει τη συνολική παραγωγή του μεταβολίτη. Ο πίνακας 16 συνοψίζει αρκετά παραδείγματα των δύο φάσεων ή προσρόφηση κυττάρων .

Ο Robbins και Rhodes (1986) ανέφεραν ότι η προσθήκη amberlite Xad-7 η ρητίνη στα κύτταρα *Chinchona ledgerina* υποκίνησε την παραγωγή των ανθρακινονών από 15 φορές που ήταν 539 mg L⁻¹, σε σύγκριση μ ένα

μέσο χωρίς προσροφητικό. Οι αποδόσεις των *ajmalicine* και *serpentine* που παράχθηκαν από *Catharanthus roseus* αυξήθηκαν από την προσθήκη *Xad-7* και την αναλογία μεταξύ των αλκαλοειδών άλλαξαν [34]. Είναι ενδιαφέρον πως η παραγωγή αυτών των αλκαλοειδών που συσσωρεύουν τα εσωτερικά κύτταρα επηρεάστηκε από την παρουσία της ρητίνης.

Η προσθήκη *Xad-4* αύξησε την παραγωγή γεύση βανίλιας στα κύτταρα αναστολής *Vanilla Eragrans* [28]. Μια παρόμοια προσέγγιση διευθύνθηκε από την προσθήκη *ξυλάνθρακα* και οδήγησε στις βελτιώσεις 60 πτυχών για την παραγωγή του οινόπνεύματος *coniferyl* στο κύτταρο *Marticaria chamomillia* και την προσθήκη *Miglyol* ή το πήκτωμα πυρητών *gr-8* υποκίνησε την παραγωγή αιθανόλης στις κυτταροκαλλιέργειες του *Pimpinella anisum* [41].

Τα διφασικά συστήματα συσσωρεύουν ακόμη και τα ίχνη δευτερογενών μεταβολιτών από το μεσοκύτταρο, αποφεύγοντας κατά συνέπεια κάθε είδος παρεμπόδισης της ανατροφοδότησης. Μια άλλη επίδραση μπορεί να είναι η αύξηση της δευτερογενούς απελευθέρωσης μεταβολιτών από τα φυτικά κύτταρα ή την έναρξη απελευθέρωσης των ενώσεων που αποθηκεύονται κανονικά μέσα στα κύτταρα. Οι εκκριμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να προστατευτούν από την υποβάθμιση στο μεσοκύτταρο λόγω των εκκριμένων καταβολικών ενζύμων και των οξέων.



Η εξάτμιση του προϊόντος στη φάση αερίου μπορεί να μειωθεί από τις παγιδευμένες ενώσεις γεύσεων στις τεχνητές περιοχές συσσώρευσης. Τα επιθυμητά προϊόντα φυτικών κυττάρων μπορούν επιλεκτικά έπειτα να απομακρυνθούν από τα συστήματα κυττάρων. Το προϊόν μπορεί να συγκεντρωθεί από την κανονική αποκατάσταση και προς τα κάτω purificationnay μειώνεται ενώ η αφαίρεση προϊόντων από μεσοκύτταρο είναι εκλεκτική. Συνεπώς η αποκατάσταση και ο καθαρισμός απλοποιούνται γενικά, μειώνοντας κατά συνέπεια της δαπάνες παραγωγής.

Πίνακας 16. Adsorbents χρησιμοποιείται για 2 φάσεις φυτικών κυτταρικών συστημάτων καλλιέργειας.

Adsorbents	κυτταροκαλιέργεα	Refs.
ενεργός άνθρακας	Marticaria chamomilla Nicotiana tabacum Vanilla fragrans	Dornenburg and Knorr 1997
β-κυκλοδεξτρίνη	Mucuna pruriens, Mentha canadensis	Dornenburg and Knorr 1997
Miglyol	Matricaria chamomilla Mentha canadensis, Thuja occidentalis, Valeriana wallichii, Vitis vinifera Pimella anisum	Rao and Ravishankar 2002 Dornenburg and Knorr 1997 Mulder-Krieger et al. 1988
Polyethylenglycol	Nicotiana tabacum	Knorr et al. 1987
Polydimethylsiloxan RP-8	Eschscholizia californica Marticaria chamomilla, Mentha piperita, Pimella anisum, Valeriana wallichü	Dornenburg and Knorr 1997 Dornenburg and Knorr 1997
XAD-2	Galium vernum, Thuja occidentalis	Dornenburg and Knorr 1997
XAD-4	Nicotiana rustica, Thuja occidenialis Vanilla fragrans	Dornenburg and Knorr 1997 Knorr et al. 1985
XAD-7	Catharanthus roseus Chinchona ledgerina Vanilla fragrans	Lee and Shuler 2000 Robbins and Rhodes 1986 Dornenburg and Knorr 1997
Wofatite	Galium vernum	Dornenburg and Knorr 1997
Zeolith	Nicotiana tabacum	Dornenburg and Knorr 1997

4.3 Μεμβράνη Permeabilisation

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα προϊόντα που διαμορφώνονται από τις κυτταροκαλλιέργειες φυτικών κυτάρων αποθηκεύονται vacuoles. Προκειμένου να απελευθερωθούν τα προϊόντα από τα vacuoles κυτταρικών φυτών πρέπει να διαπεραστούν δύο εμπόδια μεμβρανών (μεμβράνη πλάσματος και tonoplast). Το Permeabilisation κυτάρων εξαρτάται από το σχηματισμό των παρών σε μια ή περισσότερες από τη μεμβράνη συστήματα του φυτικού κυττάρου που επιτρέπουν τη μετάβαση των διαφόρων μορίων σε και από το κύτταρο[7]. Οι προσπάθειες έχουν γίνει παροδικά στα φυτικά κύτταρα για να διατηρήσουν τη βιωσιμότητα τους και για να έχουν τις σύντομες χρονικές περιόδους της αυξανόμενης μαζικής μεταφοράς του υποστρώματος και των μεταβολιτών σε και από το κύτταρο

Το Permeabilisation των φυτικών μεμβρανών για την απελευθέρωση των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται συχνά με την απώλεια βιωσιμότητας των φυτικών κυτάρων που με την απώλειά που αντιμετωπίζονται με διάφορους μεθόδους. Οι διάφοροι μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για να αρχίσει η απελευθέρωση προϊόντων από τα καλλιεργούμενα φυτικά κύτταρα. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν χημικές επεξεργασίες (π.χ. με τη λύση της υψηλής ιονικής δύναμης, την αλλαγή του εξωτερικού pH, το Permeabilisation με dimethylsulfoxide DMSO, chitosan) και τις φυσικές επεξεργασίες (π.χ. υψηλοί σφυγμοί ηλεκτρικών πεδίων, ultrasonics, υπερβολική υψηλή πίεση).[17,28].

4.3.1 . Χημικά Permeabilisation

Οι ενεργοί μηχανισμοί λήψης έχουν αναφερθεί επίσης για indole τα αλκαλοειδή vacuoles roseus Catharantus [39]. Από την άποψη απελευθέρωσης προϊόντων, είναι σχετικό για να σημειωθεί ότι στις κυτταροκαλλιέργειες efflux των αλκαλοειδών παρατηρήθηκε υπό ορισμένους όρους, που δείχνουν την ισορροπία μεταξύ των ενδοκυτταρικών και extracellular διαμερισμάτων που θα μπορούσαν να διαταραχθούν από το

μέσο οξυνοσμού με την επόμενη προϊόντων. Η απελευθέρωση serprtine από Catharanthus τα κύτταρα roseus (παρατηρήθηκε) πως φιλτραρίστηκαν και επαναρτήθηκαν στο φρέσκο ή ρυθμισμένο μέσο και προτάθηκε ότι η προσωρινή αποσύνδεση μεμβράνης ήταν αρμόδια για αυτό.

Σύμφωνα με Dornenburg κ Knorr (1997) τα κύτταρα Chenopodium rubrum θα μπορούσαν να είναι από την επεξεργασία με chirsau. Αυτός ο πολυσακχαρίτης προκαλεί το σχηματισμό των πόρων μόνο στο πλασμαλλήμα των φυτικών κυτταροκαλλιιεργειών. Η διαρροή που προκαλείται από chitosan μπορεί να θεωρηθεί ως διαρροή από cytosol. Το permeabilisation με chitosan παρουσίασε χρονικά εξαρτημένη απελευθέρωση amaranthin από chenopodinium των μεσοκυττάρων. Οι Bradelius κ Bederseu (1993) εξέτασαν πέντε renewabiliting πράκτορες σε τρία διαφορετικά είδη και εάν επιτεύχθηκε η απελευθέρωση προϊόντων, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε. Οι εξαιρέσεις ήταν ΔΜΣΟ και Triton X-100 που εφαρμόστηκαν κύτταρα roseus catharanteso Trejo- Tapia κ.α. (2007) ανέφερε πως η επεξεργασία της κυτταροκαλλιέργειας Beta Vulporis για 15 lit με 0,7 μμ Triton X-100 προκάλεσε την απελευθέρωση 30% betaniues χωρίς απώλεια βιωσιμότητας των κυττάρων (70%). Μετά απ αυτήν την επεξεργασία Permeabilisation, τα κύτταρα Beta Vulgaris reprev κανονικά έφθασαν σε μια μέγιστη συγκέντρωση 48% υψηλότερου από μη κύτταρα μετά από 14 ημέρες. Επιπλέον η μέγιστη betacyauines συγκέντρωση ήταν μόνο 25% χαμηλότερη απο αυτή των μη –κυττάρων.

4.3.2 Φυσικό Penneabilisaution

Οι φυσικοί παράγοντες που προκαλούν το Permeabilisation μεμβρανών περιλαμβάνουν τους υψηλούς σφυγμούς ηλεκτρικών πεδίων, την υψηλή υδροστατική πίεση, τον υπέρηχο κλπ. Η εφαρμογή των υψηλών σφυγμών ηλεκτρικών πεδίων είναι βασισμένη στην αρχή της ανάπτυξης των πόρων των μεμβρανών κάτω από τα εξωτερικά ηλεκτρικά πεδία. Ανάλογα με την ισχύ των ηλεκτρικών πεδίων ή των αριθμό των σφυγμών ο σχηματισμός

πόρων μπορεί να είναι αντιστρέψιμος ή αμετάκλητος .Η εφαρμογή των υψηλών σφυγμών των ηλεκτρικών πεδίων [32] οδήγησε σε υψηλά επίπεδα του Permeabilisation φυτικών κυττάρων τους κυτταροκαλλιέργειας *Chenopodium rubrum*, αλλά στις δυνάμεις τομέων πέρα από 0,75 σταθερό ποσό KVI *caud* δέκα σφυγμών , η βιωσιμότητα φυτικών κυττάρων πλησίασε μηδαμινές αμές Knorr κ.α. (1993) έχει δείξει ότι η επεξεργασία με την υψηλή υδρDuffy – Stepping Stoneοστατική πίεση του MPASO αύξησε την παραγωγή του amarantin και autraquinanones μέσα στις κυτταροκαλλιέργειες *chenopodium rubrum* και του *Citrifolia Morinda* .

Διαπιστώθηκε ότι η πίεση ψηλότερη από MPA 250 προκαλεί απώλεια βιωσιμότητας των φυτικών κυττάρων , πιθανότατα λόγω του Permeabilisation του tonoplast.

Έχει η pressure-depedent καταστροφή του tonoplast ,η απώλεια διαίρεσης σε διαμερίσματα ,και επόμενη απελευθέρωση του περιεχομένου vacnoles μπορεί να είχαν προκαλέσει την αλλαγή pH στο μέσο και τον επακόλουθο θάνατο των κυττάρων .

Ο Knorr (1993) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η εφαρμογή σφυγμών ή της υψηλής πίεσης ηλεκτρικών πεδίων έχει περιοριστεί μόνο την δυνατότητα για permeabilization κυττάρων με ταυτόχρονη διατήρηση της βιωσιμότητας των φυτικών κυττάρων.

Εντούτοις και οι δυο διαδικασίες θα μπορούσαν να γίνουν αποτελεσματικά εργαλεία για την αποκατάσταση προϊόντων από τα φυτικά κύτταρα και τους φυτικούς ιστούς με ελάχιστα αποτελέσματα στη σύνθεση προϊόντων.

5 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΩΝ **ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ** **ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.**

Με την τεχνολογική πρόοδο στο μέλλον , η κυτταροκαλλιέργεια φυτών θα έχει μεγαλύτερη συμβολή στην αγορά. π.χ. η τρέχουσα παγκόσμια αγορά των πρώτων υλών του ginseng είναι περίπου ένα δισεκατομμύριο VS [65] αν και το καλλιεργημένο κύτταρο fanax ginseng καταλαμβάνει λιγότερο από 1% της αγοράς , το μερίδιο του θα αυξηθεί πολύ , με την αύξηση παραγωγικότητας των κυττάρων.

Οι Mitsui βιομηχανίες πετροχημικών ΕΠΕ προβλέπουν την παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα των shikonin Lithospermum από erythrorhizon στις καλλιέργειες φυτικών κύτταρα .Η διαδικασία περιέλαβε δύο στάδια : τα φυτικά κύτταρα αυξάνονται αρχικά σε ένα βιολογικό αντιδραστήρα 200 l και η προκύπτουσα βιομάζα μεταφέρεται έπειτα σε ένα δεύτερο βιολογικό αντιδραστήρα ,στον οποίο η σύνθεση των φυτικών κυττάρων ευνοεί την σύνθεσή του shikonin.Η παραγωγικότητα των κυτταροκαλλιεργειών φτάνει σε 60 mg γ-1 την εβδομάδα ,το οποίο είναι 1000 φορές υψηλότερες απ' αυτή των ριζών των κυττάρων οι οποίες απαιτήσαν ένα πιο μακρύ χρονικό διάστημα 5-7ετών [50].

Η επιτυχία της παραγωγής shikonin μπορεί να θεωρηθεί ως μια γραμμή κυττάρων που συσσωρεύει 10 φορές υψηλότερο επίπεδο shikonin από τις ρίζες των ώριμων κυττάρων. Αυτό το επίτευγμα προκύπτει επίσης από τους βέλτιστους όρους αύξησης και των μέσων παραγωγής.

Κατά συνέπεια οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν γίνει οι σημαντικότερες εμπορικές πηγές shikonin. Το βιο-οργανικό τμήμα του ατομικού ερευνητικού Bhabba κέντρο (Ινδία) διεξάγει έρευνα για τη μαζική καλλιέργεια των επιλεγμένων κυτταρικών γραμμών Sp serpentine Rauwolfia (a)Moline, reserpine) rapower-somniferum (thebaine ,κωδεΐνη ,μορφίνη) Artemisia annua (artemisinin) και άλλων ειδών φυτικών κυτταροκαλλιεργειών [11].

6 Συμπεράσματα και προοπτική

Τα τελευταία χρόνια η αγορά φυτικών προϊόντων έχει επεκταθεί γρήγορα και αυτή η τάση θα συνεχιστεί όλο και περισσότεροι άνθρωποι προτιμούν να χρησιμοποιούν τα φυσικά προϊόντα . Είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα καλλιεργημένα κύτταρα φυτών αντιπροσωπεύουν πιθανή πηγή πολύτιμων φυτοχημικών , αλλά μόνο μερικές καλλιέργειες κυττάρων χρησιμοποιούνται εμπορικά ως σταθερή και παραγωγική πηγή των δευτερογενών μεταβολιτών. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετών, πολλές στρατηγικές ,όπως ο χειρισμός μέσων ,ο κανονισμός phytohormone , η σίτιση προδρόμων , η ακινητοποίηση φυτικών κυττάρων, η βιολογική μεταβολή και bioconversion, έχουν εφαρμοστεί για τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης επιθυμητών προϊόντων από κυτταροκαλλιέργειες φυτικών κυττάρων σε αξιόλογη ποσότητα και στην ανταγωνιστική οικονομική αξία . Για τις τεχνικές κυτταροκαλλιέργειες φυτικών ειδών για να γίνουν οικονομικά βιώσιμα είναι σημαντικό να αναπτυχθούν οι μέθοδοι που θα επιτρέπουν την συνεπή παραγωγή των παραγωγών των προϊόντων από καλλιεργούμενα κύτταρα.

Η αυξανόμενη χρήση των γενετικών εργαλείων και μιας αναδυόμενης εικόνας της δομής και η ρύθμιση των οδών για το δευτερογενή μεταβολισμό θα αποτελέσει τη βάση για τη παραγωγή εμπορικών προϊόντων σε αποδεκτά επίπεδα.

Η επιλογή των παραγωγικών κυττάρων μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση προϊόντων στα πιο υψηλά επίπεδα στις κυτταροκαλλιέργειες σε σύγκριση με τους φυτικούς ιστούς .

Προκειμένου να ληφθούν οι παραγωγές στις υψηλές συγκεντρώσεις για εμπορική εκμετάλλευση , οι προσπάθειες στρέφονται στην υποκίνηση των βιοσυνθετικών δραστηριοτήτων των καλλιεργημένων κυττάρων χρησιμοποιώντας διάφορους μεθόδους.

Η εισαγωγή των τεχνικών μορίων βιολογίας και παραγωγής δια γενετικών κυττάρων μπορεί να έχει επιπτώσεις στην έκφραση και τη ρύθμιση βιοσυνθετικών πορειών των επιθυμητών ενώσεων των φυτικών κυττάρων , οι κυτταροκαλλιέργειες ανοίγουν νέο δρόμο σε νέες δυνατότητες να ρυθμιστεί η παραγωγή των φυτοχημικών με τη σίτιση , τους προδρόμους , η εφαρμογή των elicitors κλπ.

Λόγω της σύνθετης και ημιτελής κατανοητής φύσης των φυτικών κυττάρων στους σωλήνες φυτικών κυττάρων ή σε κάθε περίπτωση οι μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να εξηγήσουν τα προβλήματα που εμφανίζονται στην παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών από καλλιεργημένα φυτικά κύτταρα.

Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών από τις καλλιέργειες φυτικών κυττάρων πρέπει να είναι ανταγωνιστική με άλλα συμβατικά μέσα της παραγωγής , όπως η εξαγωγή από τις field –grown εγκαταστάσεις , η εναλλακτική χημική σύνθεση , η μικροβιακή ζύμωση , η βελτίωση των φυτικών κυττάρων μέσω της παραλλαγής somaclonal και της γενετικής εφαρμοσμένης μηχανικής.

Η σημαντική πρόοδος στη βελτιστοποίηση των κυτταροκαλλιεργειών φυτικών ειδών μπορεί να επιτευχθεί ,αν και αυτή τη στιγμή υπάρχουν δυο κύρια εμπόδια : η έλλειψη ενός επαρκώς ελέγχου για τα φυτικά κύτταρα και την ετερογένεια και την αστάθεια των κυττάρων .

Οι κοινές προσπάθειες των εμπειρων της επιστήμης φυτών της τεχνολογίας τροφίμων ,φαρμάκων, βιοχημείας, μοριακής , βιολογίας , και της τεχνολογίας ζύμωσης μπορεί να αξιοποιήσουν το δυναμικό των φυτικών κυττάρων για την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alfermann AW, Petersen M (1995) Natural products formation by plant cell biotechnology.

Plant Cell Tissue Org Cult 43:199–205

2. Asada M, Shuler ML (1989) Stimulation of ajmalicine production and excretion from

Catharanthus roseus: effects of adsorption in situ, elicitors, and alginate immobilization.

Appl Microbiol Biotechnol 30:475–481

3. Beiderbeck R, Knoop B (1987) Two-phase culture. In: Constable F, Vasil I (Eds) Cell

Culture and somatic cell genetics of plants, vol 4. Academic Press, San Diego, pp 255–266

4. Benjamin BD, Sipahimalani AT, Heble MR (1990) Tissue cultures of *Artemisia pallens*:

Organogenesis, terpenoid production. Plant Cell Tissue Org Cult 21:159–164

5. Berlin J, Sieg S, Strack D, Bokern M, Harns H (1986) Production of betalaines by suspension

Cultures of *Chenopodium rubrum* L. Plant Cell Tissue Org Cult 5:163–174

6. Berlin J, Kukoschke KG, Knobloch KH (1981) Selection of tobacco cell lines with high

yields of cinnamoyl putrescines. Planta Med 42(6):173–180

7. Brodelius P, Pedersen H (1993) Increasing secondary metabolite production in plant–

cell culture by redirecting transport. Trends Biotechnol 11(1):30–36

8. Chen H, Wang X, Zhao B, Yuan X, Wang Y (2003) Production of crocin using *Crocus*

Sativus callus by two-stage culture system. Biotechnol Lett 25(15):1235–1238

9. Courtois D, Guren J (1980) Temperature response of *Catharanthus roseus* cells cultivated

in liquid medium. *Plant Sci Lett* 17:473–482

10. Curtin C, Zhang W, Franco C (2003) Manipulating anthocyanin composition in *Vitis*

vinifera suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation.

Biotechnol Lett 25(14):1131–1135

11. Dicosmo F, Misawa M (1995) Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite

production. *Biotechnol Adv* 13:425–435

12. Dixon RA (2005) Engineering of plant natural product pathways. *Curr Opin Plant Biol*

8(3):329–336

13. Do CB, Cormier F (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic

potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep* 9:143–146

14. Dodds JH, Roberts LW (1985) Experiments in plant tissue culture. Second edition.

Cambridge University Press, New York, p 232

15. Dornenburg H, Knorr D (1993) Cellular permeabilization of cultured tissues by high

electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites.

Food Biotechnol 7:35–48

16. Dornenburg H, Knorr D (1996) Production of the phenolic flavour compounds with

cultured cells and tissues of *Vanilla planifolia* species. *Food Biotechnol* 10:75–92

17. Dornenburg H, Knorr D (1997) Challenges and opportunities for metabolite production

from plant cell and tissue cultures. *Food Technol* 51:47–54

18. Dougall DK (1980) Nutrition and metabolism. In: Staba E (ed) Plant tissue culture as

a source of biochemicals. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 21–58

19. Fontanel A, Tabata M (1987) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects. Nestlé Res News pp 93–103
20. Fujita Y, Tabata M (1987) Secondary metabolites from plant cells: pharmaceutical applications and progress in commercial production. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboer DD (eds) Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, New York, pp 169–185
21. Gamborg OL, Phillips GC (1995) Plant Cell Tissue Org Cult. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 21–33
22. Grisebach H (1988) Induction of flavonoid biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures. In: European Conference on Biotechnology, Scientific, technical and industrial challenges, pp 23–27
23. Hu X, Neill SJ, Cai W, Tang Z (2003) Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures of *Panax ginseng*. *Funct Plant Biol* 30:901–907
24. Johnson TS, Ravishankar GA (1996) Precursor biotransformation in immobilized placental tissues of *Capsicum frutescens* Mill: I. Influence of feeding intermediate metabolites of the capsaicinoid pathway on capsaicin and dihydrocapsaicin accumulation. *J Plant Physiol* 147:481–485
25. Kim DJ, Chang HN (1990) Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by in situ extraction and calcium alginate immobilization. *Biotechnol Bioengin* 36(5):460–466
26. Kim BJ, Gibson DM, Shuler ML (2004) Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnol Prog* 20(6):1666–1673

27. Knobloch KH, Berlin J (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. Naturforschung 35:551–556
28. Knorr D, Miazga SM, Teutonica RA (1985) Immobilization and permeabilization of cultured plant cells. Food Technol 39:139–142
29. Knorr D, Teutonico RA (1986) Chitosan immobilization and permeabilization of *Amaranthus tricolor* cells. J Agric Food Chem 34:582–585
30. Knorr D (1987) Immobilization of Microbial and Cultured Plant Cells. In: Knorr D (ed) Food Biotechnology. Marcel Dekker Inc., New York, pp 271–287
31. Knorr D, Berlin J (1987) Effect of permeabilization and immobilization procedures on the release of pigments from cultured *Chenopodium rubrum* cells. J Food Sci 52:1397–1400
32. Knorr D, Caster C, Dörnenburg H, Dorn R, Größ S, Havkin-Frenkel D, Podstolski A, Werrmann U (1993) Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue culture. Food Technol 47(12):57–63
33. Kurata H, Achioku T, Okuda N, Furusaki S (1998) Intermittent light irradiation with a second-scale interval enhances caffeine production by *Coffea arabica* cells. Biotechnol Prog 14(5):797–799
34. Lee CWT, Shuler ML (2000) The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. Biotechnol Bioengin 67:61–71

35. Mantell SH, Pearson DW, Hazell LP, Smith H (1983) The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Rep* 2:73–83
36. Matsubara K, Shigekazu K, Yoshioka T, Fujita Y, Yamada Y (1989) High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. *J Chem Technol Biotechnol* 46:61–69
37. Meyer HJ, van Staden J (1995) The in vitro production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 40:55–58
38. Misawa M (1985) Production of useful plant metabolites. In: Fiechter A (ed) *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer, Berlin, pp 59–88
39. Moreno PRH, van der Heijden R, Verpoorte R (1995) Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey. *Plant Cell Tissue Org Cult* 42(1):1–25
40. Mulabagal V, Tsay H (2004) Plant cell cultures as a source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Engin* 2:29–48
41. Mulder-Krieger T, Verpoorte R, Svendse A, Scheffer J (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. *Plant Cell Tissue Org Cult* 13:85–114
42. Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacognosy reviews* :1, <http://www.phcogrev.com> 69
43. Pepin MF, Archambault J, Chavarie C, Cormier F (1995) Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: shake flask cultures. *Biotechnol Bioengin* 47:131–138
44. Petersen M, Simmonds MS (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62(2):121–125
45. Phillipson JD (1990) Plants as source of valuable products. In: Charlwood BV,

Rhodes MJC (eds) Secondary products from plant tissue culture. Clarendon Press, Oxford, pp 1–21

46. Rao RS, Ravishankar GA (1999) Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour

metabolites and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum*

frutescens: study of the influence of *b*-cyclodextrin and fungal elicitor. Process

Biochem 35:341–348

47. Rao RS, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary

metabolites. Biotechnol Adv 20:101–153

48. Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A,

Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B (2002)

Plants and human health in the twenty-first century. Trends Biotechnol 20:522–531

49. Rates SMK (2001) Plants as sources of drugs. Toxicol 39:603–613

50. Ratledge C, Sasson A (1992) Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures:

biotechnological and economic aspects. Cambridge University Press, Cambridge,

p 402

51. Rhodes MJC, Robins RJ, Hamill J, Parr AJ (1986) Potential for the production of biochemicals

by plant cell cultures. New Zealand J Technol 2:59–70

52. Rhodes MJ, Spencer A, Hamill JD (1991) Plant cell culture in the production of flavour

compounds. Biochem Soc Trans 19(3):702–706

53. Romagnoli LG, Knorr D (1988) Effects of ferulic acid treatment on growth and flavour

development of cultured *Vanilla planifolia* cells. Food Biotechnol 2:93–104

54. Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T, Furuya T (1994)

- Anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. *Plant Cell Tissue Org Cult* 36(1):21–26
55. Schreiner M (2005) Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *Eur J Nutr* 44(2):85–94
56. Soehono LD (1999) Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt on saponin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 55:103–108
57. Szabo E, Thelen A, Petersen M (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep* 18(6):485–489
58. Tabata H (2006) Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Curr Drug Target* 7(4):453–461
59. Tepe B, Sokmen A (2007) Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. *Nat Prod Res* (21):1133–1144
60. Trejo-Tapia G, Cuevas-Celis J, Salcedo-Morales G, Trejo-Espino H-L, Arenas-Ocampo ML, Jimenez-Aparicio A (2007) *Beta vulgaris* suspension cultures permeabilized with triton x-100 retain cell viability and betacyanines production ability: a digital image analysis study. *Biotechnol Prog* 23(2):359–363
61. Vasconsuelo A, Giulietti AM, Boland R (2004) Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant Sci* 166:405–413
62. Wang C, Wu J, Mei X (2001) Enhancement of taxol production and excretion in

Taxus chinensis cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Appl Microbiol

Biotechnol 55:404–410

63. Zenk MH (1978) The impact of plant cell cultures on industry. In: Thorpe EA (ed) Frontiers of plant tissue culture. The International Association of Plant Tissue Culture, Calgary, pp 1–14

64. Zenk MH (1977) Plant tissue culture and its bio-technological application. Springer,

Berlin, Heidelberg, p 27

65. Zhong JJ (2001) Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary

metabolites by cell suspension cultures. Adv Biochem Eng Biotechnol 72:26

66. Thaler JS, Fidantsef AL, Bostock RM (2002) Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defence-related proteins, herbivore, and plant performance in tomato. J Chem Ecol 28:1131–1159

Άλλες πηγές

<http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/typo3temp/pics/91117828d4.png>

<http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/typo3temp/pics/752c435ae8.png>