SLEDOVANIE PRODUKCIE RESVERATROL 3-β-D-GLUKOZIDU V BUNKOVÝCH KULTÚRACH VINIČA PO VYSTRESOVANÍ FUNGALNYM ELICITOROM

MARTIN SÁK [a,b], IVANA DOKUPILOVÁ [b] a JÁN ŠAJBIDOR [a]

[a] Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, [b] Výskumný Ústav Vinohradnícky a Vinársky, Národné Poľnohospodárske a Potravinárske centrum, Hlavná ulica 326, 900 41 Rovinka
11martinsak@gmail.com

Došlo 4.11.14, prepracované 17.2.15, prijaté 12.3.15.

Kľúčové slová: *Vitis vinifera*, resveratrol 3-β-D-glukozid, bunkové kultúry, fungálny elicitor

Úvod

Polyfenoly sú prírodné látky s rôznorodými štruktúrami obsiahnuté predovšetkým v ovocí, zelenine, čaji a víne[1]. V rastlinách bolo identifikovaných viac ako 8000 štruktúr polyfenolov. Veľa týchto látok sa nachádza v jedovatých rastlinách[2]. Všetky polyfenoly majú viac ako jednu fenolovú jednotku, na ktorú sa zvyčajne viaže niekoľko hydroxylových skupín. Väčšina obsahuje aspoň jeden glykozid spájajúci hydroxylové skupiny. Flavonoidy sú jednou z najdôležitejších skupín polyfenolov. Zahŕňajú flavonoly (napr. kvercetín, myricetín, kaempferol), flavanoly (napr. katechín, katechín galát, epicatechín, epigallokatechín-3-galát), flavóny (napr. apigenín, rutín a luteolín) a antokyanidíny (napr. kyanidín, malvidín, naringinín). Záujem o polyfenoly v posledných rokoch vzrastá vďaka ich antioxidačnej aktivite. Pôsobia inhibične na agregáciu krvných doštičiek, popri pozitívnym účinkom na kardiovaskulárny systém zohrávajú aj dôležitú úlohu v prevencii rôznych druhov rakovinových ochorení[3–6].

Významnou skupinou fenolových zlúčenín sú fytoalexíny – stilbény. Ide o sekundárne metabolity syntetizované rastlinami využívané pri defenzných mechanizmoch. Najznámejším zástupcom je resveratrol produkovaný napríklad viničovými bunkami po napadnutí zmesou húb spôsobujúcich ochorenie ESCA (Petriho choroba)[7,8].

Rastlinné bunkové kultúry našli využitie najmä v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle[9–11]. Ich výhodou je produkcia čistých látok bez prítomnosti nežiaducich izomérov, ktoré sú problémom pri ich chemickej syntéze. Mikroorganizmy sa uplatňujú najmä v moderných biotechnológiách, ale nie vždy dokážeme regulovať biosyntetickú dráhu producenta s cieľom zvýšenia výťažku žiadaného metabolitu. Výhodou rastlinných bunkových kultúr je aj celoročná dostupnosť biologického materiálu s nízkymi nárokmi na výživu. Zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov sa dá dosiahnuť prostredníctvom prekurzorov, elicitáciou napríklad metyl jasmonátom a kyselinou salicylovou alebo genetickou manipuláciou.

Kyselina jasmónová v kombinácií s ožarovaním značne ovplyvňuje biosyntézu antokyánov v rastlinných bunkových kultúrach[12]. Eicitáciou rastlinných bunkových kultúr s indanoyl-izoleucínom, *N*-linolenoyl-l-glutamínom a slinami hmyzu sa zvýšila produkcia resveratrolu[13]. Iniciovať zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov v rastlinných bunkových kultúrach je možné aj abiotickými fyzikálnymi faktormi, ako sú napr. pulzné elektrické pole alebo aj ich kombináciou s biotickým faktorom, ako napr. etefónom[14].

V našej štúdii sme sa zamerali na sledovane vplyvu polysacharidového fungálneho elicitora z *Fusarium oxysporum* na produkciu stilbénu resveratrol 3-β-D-glukozidu (polydatín – POL) vo viničových bunkových kultúrach. Laboratórne pripravený polysacharidový elicitor sa aplikoval do média k rastlinným bunkovým kultúram. Sledovali sa nasledovné parametre: rast biomasy, vodivosť kultivačného média a vplyv elicitora na produkciu POL.

Experimentálna časť

Príprava bunkových kultúr a sledovanie rastu

Bunkové kultúry sa pripravili zo sterilizovaných segmentov listov viniča z odrody Váh. Kultivovali sa na ½ Murashige a Skoog médiu[15] (Duchefa BIOCHEMIE B.V, Holandsko) s pridaním ďalších zložiek: 3 % (w/v) sacharózy a 0,7 % (w/v) agaru, 0,1 mg l^{-1} 1-naftalénoctová kyseliny (NAA) (Sigma-Aldrich, Nemecko), 0,2 mg l^{-1} 6-benzylaminopurín (BAP) (Sigma-Aldrich, Nemecko) a pH sa upravilo na 5,8. Kultúry sa kultivovali v režime 16 h žiarivkové svetlo (cca. 2900 lux)/8 h tma pri 25 ± 1 °C. Následne boli prenášané na nové médium každých 30 dní.

Bunkové suspenzné kultúry boli pripravené sterilným prenesením 5 g tuhých bunkových kultúr do 50 ml kvapalného média, ktorého zloženie bolo rovnaké ako v prípade tuhého média, ale bez agaru. 250ml fľaše boli miešané na trepačke na 120 ot./min. a udržiavané pri teplote 25 ± 1 °C v režime 16 h žiarivkové svetlo (cca. 2900 lux)/8 h tma. Rast biomasy sa sledoval vo všetkých bunkových kultúrach v 1-dňových intervaloch počas celej doby kultivácie a bol vyhodnotený ako nárast suchej hmotnosti.

Príprava a aplikácia fungálneho elicitora

Fusarium oxysporum, izolovaná z drevných odrezkov viniča, bola udržiavaná v tme pri izbovej teplote na zemiakovo-dextrózovom agare (Sigma-Aldrich, Nemecko). Mycélium rástlo na kvapalnom médiu Czapek Dox Broth (Duchefa BIOCHEMIE B.V, Holandsko).

Elicitor obsahujúci polysacharidy (POE) sa pripravil zo 50 g čerstvo naváženého mycélia, ktoré sa dvakrát premylo deionizovanou vodou, zmrazilo a zlyofilizovalo. Následne sa pomlelo na prášok, pridalo do 80% etanolu v pomere 1:4 (w/v) a ponechalo 24 h pri izbovej teplote. Zmes sa vákuovo prefiltrovala, nerozpustné komponenty sa pridali do chloroformu v pomere 1:4 (w/v) a refluxovali pod spätným chladičom pri 60 °C 4 h. Po ochladení sa zmes prefiltrovala a filtrát obsahujúci lipidy a proteíny bol odstránený. Zvyšok bol premytý acetónom a zlyofilizovaný. Suchý materiál bol pridaný do 1 M HCl v pomere 1:6 (w/v). Vzniknutá suspenzia sa následne prefiltrovala. pH filtrátu sa upravilo na 3,0 s 0,5 M NaOH. Koncentrácia fungálnych polysacharidov v získanom elicitore bola stanovená spektrálnou metódou na princípe H_2SO_4-UV techniky[16]. Nameraná koncentrácia bola vyhodnotená ako mg KE (ekvivalent karbohydrátu)/l.

K bunkovým suspenzným kultúram sa pridal laboratórne pripravený fungálny elicitor na šiesty deň kultivácie. Výsledné koncentrácie elicitorov v tekutých médiách boli 30 (POE1), 60 (POE2) a 120 (POE3) mg KE/l. Ku kontrole sa napipetoval rovnaký objem destilovanej vody s pH 3,0.

Stanovenie elektrickej vodivosti kultivačného média

Po pridaní elicitora sa stanovila vodivosť média pomocou prístroja (EUTECH Instruments – Cyberbcan PC 10) v jednodňových intervaloch po dobu 6 dní.

Extrakcia resveratrol 3-β-D-glukozidu

Bunková kultúra sa separovala z kultivačného média vákuovou filtráciou. Následne bola premytá jedenkrát demineralizovanou vodou. Získaná bunková kultúra sa vysušila lyofilizáciou a odvážila. Následne sa zhomogenizovala a bola extrahovaná s 80% metanolom s pH 2,5 v pomere 1:15 (w/v). Získaná suspenzia sa ponorila do ultrazvukového kúpeľa na 1 h a priebežne sa premiešavala. Nerozpustený bunkový materiál sa zo suspenzie odstránil centrifugáciou pri 10 000 ot./min za 15 min. Supernatant sa uskladnil v chladničke a extrakčný proces sa so sedimentom zopakoval. Získané metanolové extrakty sa spojili a boli zahustené na vákuovej rotačnej odparke pri 35 °C. Koncentrovaný extrakt bol nariedený s demineralizovanou vodou v pomere 1:8 (v/v) a nastreknutý do laboratórne pripravenej sklenej SPE kolónky C18 (0,1 g/3 ml). SPE kolónka bola pred pridaním vzorky kondiciovaná zmesou 3 ml metanol:HCl (98:2 v/v) a 3 ml demineralizovaná voda : HCl (98:2 v/v). Po pridaní vzorky sa SPE kolónka prepláchla 1,5 ml demineralizovaná voda:HCl (98:2 v/v). Samotná vzorka bola z kolónky eluovaná s 1,5 ml 70% metanol : HCl (98:2 v/v). Takto získaná vzorka bola použitá na HPLC analýzu.

HPLC stanovenie resveratrol 3-β-D-glukozidu

Na stanovenie resveratrol 3-β-D-glukozidu v získanom extrakte bola použitá HPLC (Hewlet Packard 1200) v kombinácii s detektorom diódového poľa. Vzorky pred nastreknutím boli prefiltrované cez diskový membránový filter, 20 µl pomocou autosampléra na kolónu Supelco C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm) vyhriatu na 35 °C termostatom. Vysokotlaková binárna pumpa vytvorila podmienky gradientu mobilných fáz kyselina octová : demineralizovaná voda (1:99 v/v) ako rozpúšťadlo A a metanol ako rozpúšťadlo B. Meralo sa podľa uvedeného programu: od 0 min do 8 min zo 30 % na 70 % B, od 7 min do 10 min zo 70 % na 85 % B, od 10 min do 18 min prebiehalo rekondiciovanie kolóny s 70 % A a 30 % B. Pre POL bolo zaznamenávané UV-VIS spektrum v rozsahu 200 až 600 nm. POL bol identifikovaný na základe porovnania relatívneho retenčného času a UV-VIS spektra s autentickým externým štandardom. Kvantifikácia bola vyhodnotená na základe externej kalibračnej krivky. Ako interný štandard bol použitý syringaldehyd.

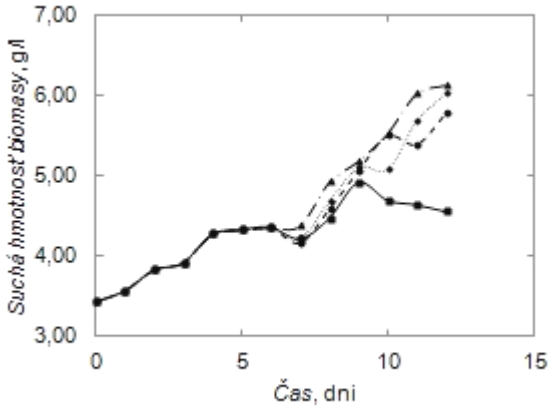
Výsledky a diskusia

In vitro bunkové kultúry (*Vitis vinifera* L.) pripravené z odrody Váh boli kultivované s laboratórne pripraveným polysacharidovým fungálnym elicitorom (POE) s cieľom sledovať vplyv na produkciu POL. Bolo dokázané, že polysacharidové elicitory získané z huby *Phytophthora gasperma* zvýšili produkciu fytoalexínov v bunkových kultúrach sóje. Prítomnosť viacerých oligo- a polysacharidov spôsobilo spustenie obranných mechanizmov a následné zvýšenie produkcie fytoalexínov[17].

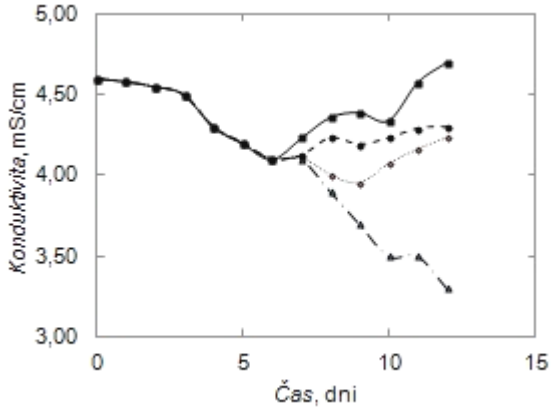
Vodivosť kultivačného média a rast bunkových kultúr

Suchá hmotnosť bunkových kultúr bola stanovovaná v jednodňových intervaloch počas celej doby kultivácie (obr. 1). Odumretie buniek počas kultivácie elicitovaných buniek aj kontroly sa prejavilo farebnou zmenou média zo zelenej na bledo-hnedú. Všetky koncentrácie elicitora mali za následok spomalenie nárastu biomasy bunkových kultúr v porovnaní s kontrolou. Tento pokles mohol spôsobiť obranný mechanizmus buniek odpovedajúci na prítomnosť elicitora, inhibíciou rastu a stimuláciou sekundárneho metabolizmu buniek[18] (obr. 2). Biomasa bunkových kultúr elicitovaných s POE1 a POE2 rástla, aj keď menej ako kontrolná bunková kultúra. Najvyššia koncentrácia elicitora spôsobila úhyn veľkého množstva bunkovej kultúry a pravdepodobne došlo k väčšiemu zapojeniu obranných mechanizmov a bunky využili viac energie na obranu pred fungálnym patogénom ako na rast, čo je vidieť najmä v treťom dni po elicitácií.

Ďalším sledovaným parametrom v experimente bola vodivosť, ktorá poskytuje informáciu o poklese živín v médiu (obr. 2). Všetky kultivačné média s prídavkom



Obr. 1. **Suchá hmotnosť bunkových kultúr počas kultivácie;** kontrola (- · - · -), elicitor 30 mg KE/l (·····), elicitor 60 mg KE/l (- - - - -), elicitor 120 mg/l KE (———)



Obr. 2. **Konduktivita kultivačného média počas kultivácie;** kontrola (- · - · -), elicitor 30 mg KE/l (·····), elicitor 60 mg KE/l (- - - - -), elicitor 120 mg/l KE (———)

elicitora vykazovali počas experimentu vyššiu vodivosť ako kontrola, čo mohlo byť spôsobené hypersenzitívnou reakciou, uvoľnením intracelulárnych iónov a v prípade mŕtvych buniek intracelulárneho obsahu[18–20], čo je vidieť najmä od štvrtého dňa elicitácie až po koniec experimentu v prípade POE3. POE1 spôsobil najskôr pokles a následne slabý nárast vodivosti. Počas kultivácie bol však zaznamenaný klesajúci trend vodivosti v prípade kontroly, nakoľko došlo k priebežnému čerpaniu živín z média[13].

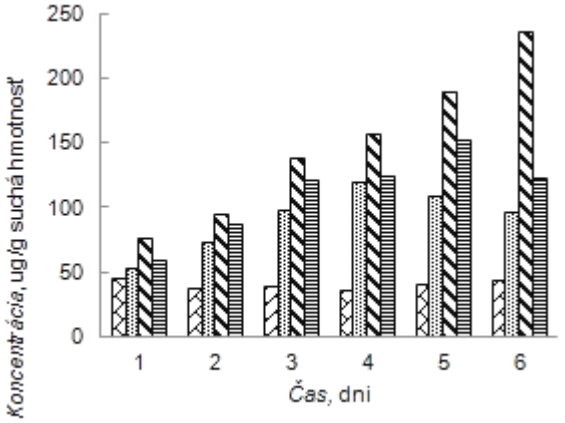
Vplyv fungálneho elicitora na produkciu resveratrol 3-β-D-glukozidu (POL)

Elicitor pripravený z *Fusarium oxysporum* spôsobil zvýšenú produkciu POL v elicitovaných bunkových kultúrach (obr. 3). Najlepšia koncentrácia stimulujúca produkciu POL s mininálnym letálnym účinkom na bunkové kultúry bola POE2.

Vysoká akumulácia POL bola zaznamenaná vo všetkých bunkových kultúrach už na druhý deň po elicitácii, čo mohlo byť spôsobené spustením obranných mechanizmov. Nameraná koncentrácia POL bola v kontrole približne rovnaká, od 36,5 do 45,9 μg g^{-1} suchej váhy (sv), počas celej doby odberu vzoriek. Koncentrácia POL na druhý deň elicitácie dosiahla hodnoty 72,5 μg g^{-1} sv v prípade POE1, 95,3 μg g^{-1} sv pri POE2 a 87,2 μg g^{-1} sv pri POE3. Tento nárast bol v porovnaní s kontrolou 1,9 ~ 2,5× vyšší a postupne stúpal aj do tretieho dňa po elicitácií. Koncentrácia POL na piaty deň klesla v prípade bunkových kultúr elicitovaných POE1 zo 120,0 na 108,4 μg g^{-1} sv. V bunkových kultúrach elicitovaných POE1 klesala koncentrácia POL aj na ďalší deň, a to z 108,4 na 96,8 mg g^{-1} sv. Tento pokles mohol byť spôsobený nízkou koncentráciou fungálneho elicitora, a preto aj bunková kultúra postupne znižovala produkciu POL.

V prípade bunkových kultúr elicitovaných fungálnym elicitorom POE3 bol tiež zaznamenaný pokles akumulácie POL v posledných dňoch kultivácie, a to zo 153,2 na 123,7 μg g^{-1} sv. Podobný pokles v produkcii sekundárnych metabolitov bol zaznamenaný aj u iných rastlinných systémov[21,22]. Tento pokles je možne vysvetliť vplyvom dlhšej inkubačnej doby, pričom stresové metabolity, akými sú napríklad fytoalexíny, nemusia predstavovať finálny produkt biochemickej dráhy a sú ďalej metabolizované na menej toxické fytochemikálie[23].

Koncentrácia POL v bunkovej kultúre bola na šiesty deň po elicitácii POE2 najvyššia, a to 236,4 μg g^{-1} sv, čo bolo 5,4× viac ako v kontrole. Na rozdiel od bunkových



Obr. 3. **Koncentrácie resveratrol 3-β-D-glucozidu v bunkových kultúrach počas kultivácie 6 dní po elicitácií;** kontrola ▨, elicitor 30 mg KE/l ▩, elicitor 60 mg KE/l ▧, elicitor 120 mg/l KE ▤

kultúr elicitovaných POE1 a POE3, koncentrácia oproti predchádzajúcim dňom vzrástla. Tento nárast môžeme vysvetliť vhodnou koncentráciou fungalného elicitora, ktorý spustil sekundárny metabolizmus bunkovej kultúry, pričom POE2 nepôsobil letálne ako POE3. Podobnú produkciu vykazovali suspenzné kultúry *Calendula officinalis* po elicitácií biotickými elicitormi[24] a suspenzné kultúry *Plumbago rosea* L. elicitované sekundárnymi metabolitmi mikroorganizmov[25].

Záver

V tejto práci sme sa zamerali na sledovanie produkcie resveratrol 3-β-D-glukozidu z bunkových kultúr viniča odrody Váh (*Vitis vinifera*) v *in vitro* podmienkach. Použitím polysacharidového elicitora pripraveného z *Fusarium oxysporum* sa nám podarila zvýšiť produkcia niekoľkonásobne. Bunkové kultúry majú niekoľko výhod v porovnaní s rastlinou, ako napríklad celoročná dostupnosť, produkciu sekundárnych metabolitov je možné zvýšiť viacerými spôsobmi, bunkové kultúry nepodliehajú chorobám a sekundárny metabolit môžeme extrahovať aj mimo vegetačného obdobia. Resveratrol 3-β-D-glukozid vďaka svojím zdraviu prospešným účinkom a širokospektrálnemu uplatneniu v kozmetickom, farmaceutickom a potravinárskom priemysle je zaujímavou chemickou zlúčeninou, v prípade ktorej má význam hľadať moderné spôsoby získavania. Výsledky tejto práce ukazujú, že moderným biotechnologickým spôsobom je možné efektívne získavať resveratrol 3-β-D-glukozid a následne ho aplikovať do priemyselnej praxe.

Táto práca bola podporená projektom Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0550-11.

LITERATÚRA

1. Bravo L.: Nutr. Rev. *56*, 317 (1998).
2. Ross J. A., Kasum C. M.: Annu. Rev. Nutr. *22*, 19 (2002).
3. Teszlák P., Gaál K., Nikfardjam M. S. P.: Anal. Chim. Acta *543*, 275 (2005).
4. Delaunay A., Pflieger D., Barrault M. B., Vinh J., Toledano M. B.: Cell *111*, 471 (2002).
5. Vitrac X., Krisa S., Decendit A., Vercauteren J., Nührich A., Monti J.-P., Deffieux G., Mérillon J.-M.: J. Biotechnol. *95*, 49 (2002).
6. Panickar K. S., Polansky M. M., Anderson R. A.: Exp. Neurol. *216*, 420 (2009).
7. Zheng C., Choquer M., Zhang B., Ge H., Hu S., Ma H., Chen S.: Fung. Bio. *115*, 815 (2011).
8. Holthoff J. H., Woodling K. A., Doerge D. R., Burns S.T., Hinson J. A., Mayeux P. R.: Biochem. Pharmacol. *80*, 1260 (2010).
9. Dicosmo F., Misawa, M.: Biotechnol. Adv. *13*, 425 (1995).
10. Kolbe A., Schneider B., Porzel A., Voigt B., Krauss G., Adam G.: Phytochem. *36*, 671 (1994).
11. Pasqua G., Pinarosa A., Monacelli B., Santamaria A. R., Pia Argentieri M.: Plant Sci. *165*, 977 (2003).
12. Wei Zhang , Chris Curtin, Mami Kikuchi, Franco C.: Plant Sci. *162*, 459 (2002).
13. Caia Z., Knorr D., Smetanska I.: Enzyme Microb. Technol. *50*, 29 (2012).
14. Saw N. M. M. T., Riedel H., Cai Z., Kütük O., Smetanska I.: Plant Cell, Tissue Organ Cult. *108*, 47 (2012).
15. Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. *15*, 473 (1962).
16. Albalasmeh A. A., Berhe A. A., Ghezzehei T. A.: Carbohydr. Polym. *97*, 253 (2013).
17. Kortekamp A.: Plant Physiol. Biochem. *44,* 58 (2006).
18. Chen H., Chen F.: Process Biochem. *35*, 837 (2000).
19. Zhong J.-J., Chen F., Hu W.-W.: Process Biochem. *35*, 491(1999).
20. Cheng X. Y., Wei T., Guo B., Ni W., Liu C. Z.: Process Biochem. *40*, 3119 (2005).
21. Liu W., Liu C., Yang C., Wang L., Li Sh.: Food Chem. *122*, 475 (2010).
22. Ferri M., Dipalo S. C. F., Bagni N., Tassoni A.: Food Chem. *124*, 1473 (2011).
23. Miguel M. G., Barroso J. G.: Phytochem. *35*, 371 (1994).
24. Wiktorowska E., Długosz M., Janiszowska W.: Enzyme Microb. Technol. *46*, 14 (2010).
25. Komaraiah P., Amrutha R. N., Kavi Kishor P. B., Ramakrishna S. V.: Enzyme Microb. Technol. *31*, 634 (2002).

M. Sák[a,b], I. Dokupilová[b], and J. Šajbidor[a]
([a] Institute of Biotechnology and Food Industry, Slovak Technical University, Bratislava, [b] Research Institute of Viticulture and Enology – National Agriculture and Food centre, Slovakia): **Monitoring Production of Resveratrol 3-β-D-Glucoside in *Vitis* Cell Cultures after Dressing with Fungal Elicitor**

The main aim of this study is to monitor the impact of biotic elicitor on resveratrol 3-β-D-glucoside production in cell culture of *Vitis vinifera* cv.Váh. Suspension cultures were treated with different concentrations of fungal elicitor with the aspect on polysaccharide components. The highest concentration of resveratrol 3-β-D-glucoside 236 mg g^{-1} (dry weight of plant cells) was determined in suspension culture on sixth day of cultivation after treatment with fungal elicitor with polysaccharide total content 60 mg (carbohydrate equivalent)/L. This concentration was 5,44 times more than in the control suspension culture.