

Paweł Króliczak i Artur Nowak

Akademia Rolnicza, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Poznań

Kultury tkankowe roślin jako źródło metabolitów wtórnych

Wprowadzenie

Rośliny są źródłem wielu cennych metabolitów komórkowych. Substancje te, izolowane często w formie czystej, mają szerokie zastosowanie w farmacji, chemii, przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz w rolnictwie. Część używanych dotychczas związków chemicznych otrzymuje się przez syntezę chemiczną, jednakże większość z nich ma tak złożoną budowę, że ich sztuczne otrzymywanie jest albo bardzo kosztowne, albo wręcz niemożliwe. Inną przyczyną, dla której rezygnuje się z używania syntetycznych substytutów, jest wzrost zainteresowania konsumentów produktami pochodzenia naturalnego. W USA ok. 25% wszystkich leków oparty jest na naturalnych związkach pochodzenia roślinnego. Przykładowo można tutaj wymienić takie leki, jak atropina, skopolamina, digoksyna, winblastyna, winkrystyna, morfina czy kodeina.

Większość otrzymywanych z roślin produktów to tzw. metabolity wtórne. Uważa się, że odgrywają one ważną rolę w integracji roślin z otoczeniem, choć nie zawsze wiążą się z ich głównymi szlakami metabolicznymi. Każdy gatunek roślin produkuje specyficzny dla siebie zestaw metabolitów wtórnych. Dotychczas pozyskiwanie niektórych z nich na skalę przemysłową odbywało się poprzez ekstrakcję z materiału roślinnego. Należy jednak odnotować, że nie wszystkie rośliny produkujące metabolity wtórne o znaczeniu przemysłowym są uprawiane masowo.

Współczesna biotechnologia stworzyła podstawy do nowych rozwiązań. Są nimi hodowle tkanek lub zawiesiny komórek wyspecjalizowanych w syntezie specyficznych metabolitów. Proces jest prowadzony w bioreaktorach w ściśle kontrolowanych warunkach. Dzięki temu staje się możliwe sterowanie szlakami metabolicznymi komórek i optymalizowanie warunków hodowli dla wzmożonej syntezy (nadprodukcji) określonych metabolitów. Wyniki prac badawczych wskazują, że wydajność produkcji niektórych metabolitów wtórnych w bioreaktorach jest 10–1000 razy wyższa niż w uprawie polowej. Za rozpowszechnieniem metod *in vitro* przemawia brak ograniczeń związanych z dostępnością materiału roślinnego, którego jakość zależy od

Tabela 1. Wydajność produkcji niektórych metabolitów wtórnych w warunkach in vitro

Metabolit	Roślina	Udział w	
		s.m. [%]	pożywce [g/l]
Kwas rozmarynowy	<i>Coleus blumei</i>	21,5	5,6
Szikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	23,2	3,0
Berberyna	<i>Coptis japonica</i>	13,2	2,5
Serpentyna	<i>Catharanthus roseus</i>	1,5	0,6

miejsca pochodzenia, panujących tam warunków klimatycznych czy też od stopnia porażenia roślin chorobami.

Produkcja biomasy komórkowej w kulturach in vitro zależy od czynników kontrolowanych przez człowieka. Efektywne wykorzystanie potencjału metabolicznego roślin w produkcji wtórnych metabolitów wymaga selekcji odpowiednich linii komórkowych, optymalizacji składu pożywek wzrostowych i produkcyjnych, stosowania swoistych induktorów syntezy oraz coraz częściej wykorzystania technik klonowania genów zwiększających zdolności metaboliczne roślin.

Dzięki tego typu zabiegom możliwe staje się otrzymywanie metodami in vitro metabolitów, które wprawdzie występują w danym gatunku roślin, lecz ze względu na ich niską koncentrację nie jest opłacalne ich ekstrahowanie. Metody hodowli kultur tkankowych i ich zastosowanie do produkcji metabolitów wtórnych zostały opisane przez Chmiela [3].

Produkcja metabolitów wtórnych w hodowlach komórkowych in vitro stanowi przedmiot intensywnych badań. Ciągły rozwój biotechnologii komórek roślinnych dostarcza wciąż nowych naturalnych produktów, które szybko znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach życia. Nadzieje na sukcesy handlowe zostały rozbudzone po wprowadzeniu na rynki światowe, i to z dużym sukcesem handlowym, szikoniny produkowanej przez kulturę *Lithospermum erythrorhizon* (Japonia). Jest to barwnik czerwony, który zdobył rynek kosmetyków związany z produkcją szminek do ust.

Warto jednak podkreślić, że mimo dużego wysiłku ośrodków badawczych, tylko nieliczne produkty doczekały się opracowania metod ich produkcji w skali przemysłowej. Głównym problemem w rozwoju tych technologii jest przede wszystkim aspekt ekonomiczny, jak również brak wiedzy podstawowej w kierowaniu szlakami metabolicznymi roślin. Mimo to postęp w tej dziedzinie jest coraz szybszy. Prezentowana publikacja stanowi przegląd prac związanych z produkcją metabolitów wtórnych. Omówiono źródła i wykorzystanie wtórnych metabolitów roślinnych w różnych gałęziach przemysłu oraz w medycynie. Zwrócono szczególną uwagę na barwniki, substancje o znaczeniu farmakologicznym i enzymy roślinne.

Barwniki

Barwniki są jedną z wielu grup metabolitów wytwarzanych przez rośliny. Znaczenie barwników dla człowieka opiera się na możliwości ich wykorzystania do barwienia produktów żywnościowych, kosmetycznych i innych. Metody hodowli tkankowych *in vitro* pozwalają na szerokie pozyskiwanie w ten sposób różnych rodzajów barwników.

Dużą ich grupę stanowią flawonoidy. Są to związki chemiczne o barwie najczęściej żółtej, od kremowożółtej do ciemnopomarańczowej. Gromadzą się wewnątrz komórek, w wakuolach lub chromoplastach. Ich różnorodność jest ogromna. Należą do tej grupy zarówno antocyjany, jak i flawony. Wszystkie te związki łączy wspólny element budowy, a mianowicie układ chalkonu.

Różnorodność antocyjanów bierze się stąd, że taki sam barwnik antocyjanowy w zależności od pH soku komórkowego i od obecności jonów nieorganicznych w komórce może mieć różną barwę — od fioletowej do czerwonej. Ilość gromadzonych antocyjanów jest większa, gdy w środowisku komórki panuje niskie stężenie jonów azotanowych i fosforanowych.

Ważnym czynnikiem regulującym syntezę antocyjanów jest też źródło węgla. Przykładowo, komórki marchwi (*Daucus carota*) rosną lepiej, gdy w pożywce jest sacharoza, ale produkcja antocyjanów jest większa, gdy źródłem węgla będzie glukoza. Z przeprowadzonego przez Zwayyeda doświadczenia, w którym dodawano do pożywki glukozę, fruktozę i sacharozę w różnych kombinacjach, wynika, że najwięcej pożądanego barwnika gromadzi się wówczas, kiedy jedynym źródłem węgla jest glukoza [35]. Przy jej stężeniu 15 g/l otrzymuje się ok. 90 µg antocyjanów na litr prowadzonej kultury. Zastępowanie glukozy fruktozą czy sacharozą powoduje zmniejszenie ilości produkowanych antocyjanów prawie o połowę.

Oprócz marchwi antocyjany produkowane są przez kultury tkankowe takich roślin, jak: len (*Linum usitatissimum*), winorośl (*Vitis vinifera*), kukurydza (*Zea mays*), słonecznik (*Helianthus tuberosus*) i wiele innych. Barwniki antocyjanowe cenione są jako naturalne barwniki żywności, a także wykorzystuje się je do barwienia tkanin artystycznych, przede wszystkim gobelinów.

Spośród flawonów stosowanych jako barwniki można wymienić apigeninę, pozyskiwaną z soi (*Glycine max*), daidzeinę — z fasoli (*Phaseolus aureus*), formononetynę — z grochu włoskiego (*Cicer arietinum*), a także morynę — z morwowatego drzewa amerykańskiego (*Maclura pomifera*). Ta ostatnia roślina jest źródłem nie tylko moryny, ale i innych flawonoidów. Optymalizacja ich produkcji była przedmiotem badań prowadzonych przez Pasqua i in. [24]. Autorzy ci stwierdzili, że odpowiednio dobrana pożywka w hodowlach *in vitro* może zwiększyć ilość produkowanych i pozyskiwanych metabolitów o ponad połowę w porównaniu do ilości barwników produkowanych przez rośliny w uprawach naturalnych. Większość wymienionych wyżej flawonów stosuje się do barwienia wełny i innych materiałów włókienniczych.

Wśród chinonów produkowanych przez rośliny można znaleźć barwniki wykorzystywane przemysłowo. Przykładem takich związków jest alizaryna, stosowana jako czerwony barwnik w farbiarstwie. Jej źródłem jest przytulia wiosenna (*Galium mollugo*). Maksymalna produkcja alizaryny z tkanki tej rośliny została uzyskana w pożywce płynnej zawierającej 7% sacharozy, a stymulatorem hormonalnym był NAA w stężeniu 2,7 ppm [1].

Intensywne badania prowadzone są nad optymalizacją produkcji szikoniny z *Lithospermum erythrorhizon*. Ten czerwony barwnik stosowany od wielu lat w przemyśle kosmetycznym i spożywczym jest już pozyskiwany metodą *in vitro* na skalę przemysłową od roku 1983 [8, 10]. Problemem w produkcji szikoniny jest to, że w komórkach gromadzi się ona między błoną cytoplazmatyczną a ścianą komórkową, przez co hamowany jest dalszy wzrost hodowanej tkanki oraz synteza metabolitu [8]. Okazało się jednak, iż problem ten może być pominięty, gdy tkanką gromadzącą szikoninę są korzenie włośnikowe. Transformowanie tych korzeni szczepem *Agrobacterium rhizogenes* 15834 i odpowiednio dobrana pożywka powodują, że szikonina jest uwalniana do pożywki, a ciągła jej produkcja w bioreaktorze może trwać ponad 200 dni ze stałą wydajnością dobową — 5 mg/l [32].

Dużą wydajność w krótkotrwałych hodowlach (3–10 dni) osiągnięto też w kulturach zawiesinowych, wprowadzając do nich — jako stymulator syntezy — grzyb *Penicillium* sp. oraz stosując ciągłą ekstrakcję produktu. W tym przypadku otrzymano nawet 60 mg szikoniny/l [16].

We wszystkich roślinach mających zdolność do fotosyntezy występuje chlorofil. Jest to zielony barwnik mający dość szerokie zastosowanie. Barwi się nim mydła, tłuszcze, woski, wyroby cukiernicze, napoje alkoholowe, konfitury, a także kosmetyki, perfumy i skórę. Jego popularność w świecie roślinnym powoduje, że można go produkować drogą kultur tkankowych wielu roślin: z cykorii (*Cichorium endiva*), marchwi (*Daucus carota*), jęczmienia (*Hordeum vulgare*), sałaty (*Lactuca sativa*), mięty (*Mentha arvensis*), tytoniu (*Nicotiana tabacum*), pietruszki (*Petroselinum hortense*), anyżu (*Pimpinella anisum*) i wielu innych.

Karotenoidy to grupa barwników należących do tetraterpenów, o barwie żółtej, pomarańczowej lub czerwonej. Są bardzo rozpowszechnione w świecie roślin, szczególnie ksantofil, α -karoten i β -karoten. W kulturach *in vitro* izoluje się je z ruty (*Ruta graveolens*), marchwi (*Daucus carota*), jęczmienia (*Hordeum vulgare*), tytoniu (*Nicotiana tabacum*) oraz z petunii (*Petunia hybrida*). Karotenoidy stosuje się przede wszystkim jako barwniki w przemyśle spożywczym.

Mniej rozpowszechnioną grupą barwników są betalainy. Występują one u niektórych roślin rzędu *Centrospermae* zamiast popularnych w innych roślinach antocyjanów. Betalainy to pochodne kwasu betalainowego, który — łącząc się z aminokwasami — tworzy barwny kompleks. Betalainy o zabarwieniu czerwono-fioletowym to betacyjaniny, zaś o zabarwieniu żółtym — betaksantyny. Do betacyjanin należy m.in. betanina, a do betaksantyn m.in. wulgaksantyna I i II oraz DOPA-ksantyna. Układy,

z których pozyskuje się wyżej wymienione barwniki, stosowane później w przemyśle spożywczym jako dodatki barwiące, to głównie kultury komórkowe buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris*) oraz *Portulaca grandiflora*. Otrzymywanie barwników z *P. grandiflora* oraz ich charakterystykę przedstawił ostatnio Böhm i in. [2]. Burak ćwikłowy jest od dawna znany jako źródło wielu betalain [4,21]. W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzono wiele doświadczeń nad optymalizacją procesu produkcji i ekstrakcji tych barwników, indukując do ich wytwarzania korzenie włóśnikowe buraka transformowane *Agrobacterium rhizogenes* [32] czy też odpowiednio regulując stosunek auksyn do cytokinin w pożywce [11]. Leathers i in. opisali produkcję barwników betalainowych przy użyciu kultury kalusowej buraka ćwikłowego. Dzięki zastosowaniu specjalnych technik indukcji kalusa, doborowi odpowiednich proporcji między auksyną (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy — 2,4-D) i cytokininą (6-benzylaminopuryna — 6-BAP) oraz poprzez izolację fragmentów kalusa o określonej barwie udało się uzyskać kultury produkujące pojedyncze barwniki: żółty, pomarańczowy, czerwony i fioletowy.

Substancje lecznicze

W przemyśle farmaceutycznym wykorzystywana jest obecnie duża liczba naturalnych związków izolowanych z roślin. Pomimo ogromnych nakładów poniesionych na otrzymywanie leków syntetycznych i masową produkcję antybiotyków z wykorzystaniem fermentacji mikrobiologicznej, preparaty farmaceutyczne pochodzenia roślinnego odgrywają ciągle znaczną rolę. Postęp w biotechnologii roślin i wzrost zainteresowania farmaceutykami pochodzenia roślinnego otworzył nowe perspektywy dla genetycznego ulepszania roślin i produkcji leków roślinnych. Duże nadzieje wiąże się z opanowaniem syntezy poszczególnych substancji w kulturach hodowanych w bioreaktorach.

Z roślin z rodzaju *Hyoscyamus* czy *Duboisia* otrzymywane są hioscyamina i skopolamina. Rodzaj *Duboisia* obejmuje trzy gatunki *D. myoporoides* R. Br., *D. leichhardtii* F. Muell i *D. hopwoodii* F. Muell, które pochodzą z Australii. Kultury komórkowe rodzaju *Duboisia* były bardzo szeroko badane pod względem ich zdolności do wytwarzania alkaloidów tropanowych. Kalus, kultury komórkowe i zróżnicowane pędy w zasadzie nie wytwarzają alkaloidów tropanowych. Jednak wytworzone z kalusa korzenie i kultury korzeni produkują normalny zestaw alkaloidów tropanowych, podobnie jak rośliny regenerowane z hodowli tkankowej. Korzenie wielu roślin z rodziny *Solanaceae* są miejscem syntezy alkaloidów i dlatego też zawartość alkaloidów w kulturach korzeni *in vitro* jest większa niż w kulturach komórkowych, czy nawet w całych roślinach [21]. Badania Kitamury i in. pokazują, że kultury korzeni *D. myoporoides* i *D. leichhardtii* wytwarzają alkaloidy tropanowe i pirydynowe [18]. W hodowli *D. leichhardtii* uzyskuje się nie tylko atropinę i skopolaminę, ale także

apoptozę. Poprawę wzrostu i zwiększenie produkcji alkaloidów można uzyskać na pożywce z wyższą koncentracją sacharozy (7–10%). Oprócz tego wymagana jest staranna selekcja rośliny matecznej i kultury korzeni [18].

Duże zdolności do produkcji alkaloidów tropanowych wykazują rośliny z rodzaju *Hyoscyamus*. Kultury korzeni *Hyoscyamus albus*, transformowane różnymi szczepami *Agrobacterium rhizogenes*, mogą być cennym źródłem hioscyjminy. Korzenie transformowane (włośnikowate) uzyskuje się w wyniku zakażenia roślin lub ich fragmentów bakteriami *A. rhizogenes*. Fragment bakteryjnego plazmidu Ri (root inducing plasmid) wbudowuje się do genomu komórki roślinnej, powodując zmianę metabolizmu komórki, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju korzeni włośnikowatych. Korzenie te charakteryzują się szybkim przyrostem biomasy, a synteza metabolitów wtórnych utrzymywana jest na stałym poziomie. Kultury korzeni włośnikowatych w odpowiednich warunkach hodowli i przy właściwie dobranej koncentracji fitohormonów wytwarzają jako główny metabolit wtórny hioscyjminę. Zawartość skopolaminy jest większa w hodowlach korzeni prowadzonych na świetle [30]. Biosynteza alkaloidów tropanowych odbywa się w korzeniach roślin, skąd hioscyjmina jest transportowana ksylemem do naziemnych części rośliny, gdzie zachodzi jej przemiana w skopolaminę [20]. Stwierdzono, że w korzeniach *H. albus*, transformowanych i nie transformowanych, hodowanych przy dostępie światła, zawartość alkaloidów, a szczególnie skopolaminy jest większa niż w hodowli korzeni utrzymywanej bez dostępu światła [30].

Skopolamina stosowana jest w postaci bromowodorku jako lek antycholinergiczny o działaniu obwodowym i ośrodkowym. Stosowana jest także miejscowo w okulistyce oraz doustnie i pozajelitowo w stanach pobudzenia ruchowego. Jest cennym surowcem do produkcji półsyntetycznych pochodnych. Hioscyjmina jest również lekiem antycholinergicznym. Stosuje się ją w chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy oraz jako środek przeciwnowotworowy.

Bardzo interesującą rośliną jest *Catharanthus roseus*, wytwarzająca szeroki wachlarz alkaloidów indolowych, w tym kilka związków o znaczeniu farmakologicznym. Związki te oprócz funkcji hamujących rozwój mikroorganizmów, mogą pełnić rolę ochronną przed promieniowaniem UV i rolę związków magazynujących i transportujących azot. Większość badań poświęconych tej roślinie jest ukierunkowana na zastosowania medyczne. Pozyskiwane z korzeni monomeryczne alkaloidy — ajmalicyna i serpentyna — są używane w leczeniu chorób serca i krążenia, natomiast dimeryczne alkaloidy — winblastyna i winkrystyna — są potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi [25]. Winblastyna i winkrystyna powstają przez połączenie dwóch różnych monomerycznych alkaloidów indolowych — windoliny i katarantyny. Windolina jest akumulowana w roślinach w stosunkowo wysokich ilościach w przeciwieństwie do katarantyny. Dlatego też konieczne jest opracowanie efektywnego sposobu zwiększania produkcji katarantyny *in vitro*, aby przez połączenie jej z

windoliną, uzyskiwaną w wyniku ekstrakcji z roślin uprawnych, otrzymać winblastynę i winkrystynę [15].

Kultury korzeni transformowanych przez *Agrobacterium rhizogenes* — ze względu na ich wysoką stabilność genetyczną — są bardziej przydatne do produkcji wartościowych metabolitów wtórnych aniżeli kultury zawieszinowe. Oprócz tego można prowadzić selekcję klonów transformowanych korzeni, które szybciej rosną i produkują więcej pożądaných metabolitów [13].

Wyższy poziom katarantyny w hodowli *Catharanthus roseus* można uzyskać z kultur transformowanych korzeni hodowanych na pożywce, w której źródło węgla stanowią monocukry. Glukoza, a głównie fruktoza — obecne w pożywce, zwiększają poziom katarantyny prawie dwukrotnie w porównaniu z poziomem uzyskiwanym w pożywce z sacharozą. Ponieważ na pożywce z sacharozą plon uzyskiwanej biomasy jest dwukrotnie wyższy, rozwija się obecnie hodowlę dwuetapową: z sacharozą w pierwszym i fruktozą — w drugim etapie hodowli. Pozwala to zwiększyć wydajność zarówno katarantyny, jak i biomasy komórkowej. Przypuszcza się, że zmiana sacharozy na fruktozę powoduje zmianę metabolizmu węglowodanów w transformowanych korzeniach, co stymuluje metabolizm drugorzędowy [15].

Cytokininy, obok swego działania regulującego rozwój roślin, wykazują także duży wpływ na produkcję alkaloidów. W kulturach komórkowych *Catharanthus roseus* dodatek cytokinin do pożywki pozbawionej 2,4-D powoduje wzrost produkcji ajmalicyny. Działanie to może być dodatkowo wzmocnione przez dodatek CaCl_2 [7]. Powiększenie skali produkcji alkaloidów wymaga kilku zmian w warunkach hodowli kultur *Catharanthus roseus*. Bez tych zmian kultury przeniesione z kolbek do bioreaktora stają się ciemne i wytwarzanie ajmalicyny jest znacznie zahamowane. Bardzo istotną rolę odgrywa ścisła kontrola składu gazowego w bioreaktorze, a szczególnie recyrkulacja wprowadzanego powietrza. Dzięki temu wytwarzanie ajmalicyny jest 3–4-krotnie większe aniżeli w hodowli bez kontroli napowietrzania. Warunki gazowe wywierają również duży wpływ na wydzielanie ajmalicyny do pożywki. Wykorzystując recyrkulację gazów, prawie 100% ajmalicyny jest wydzielane do pożywki, podczas gdy w normalnych warunkach ilość ta jest znacznie mniejsza. Mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze poznany, choć — jak widać — środowisko gazowe wytwarzane przez komórki roślinne jest istotne dla życia komórek i dla tworzenia metabolitów wtórnych [31].

W medycynie wykorzystywana jest również berberyna, alkaloid izochinolinowy, która jest zwykle pozyskiwana przez ekstrakcję z korzeni i kory roślin należących do rodzin *Ranunculaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae* i *Berberidaceae*. Berberyna ma dość silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwpierwotniakowe, żółciopędne i spazmolityczne. Stosowana jest czasem w postaci siarczanu jako środek przeciwbiegunkowy i pierwotniakobójczy. Oprócz zastosowania w farmacji berberyna jest także wykorzystywana jako marker fluorescencyjny do wielu badań medycznych [17].

Berberyna wytwarzana jest w kulturach komórkowych wielu roślin. Najwyższą produkcję — 7 g/l — uzyskano w hodowli *Coptis japonica*; jest to największa ilość produktu, jaką kiedykolwiek otrzymano w roślinnych kulturach komórkowych [33]. Berberyna wytwarzana jest również przez inne rośliny, w tym szczególną uwagę zwrócono na gatunki z rodzaju *Thalictrum*.

Roślinne kultury komórkowe mają bardzo różne charakterystyki wzrostu i produkcji metabolitów. Relacja pomiędzy wzrostem komórek a wytwarzaniem wtórnych metabolitów jest bardzo istotnym czynnikiem, który musi być brany pod uwagę przy rozwijaniu efektywnych metod produkcji. Nie ma jednej uniwersalnej metody, która może być zastosowana we wszystkich rodzajach kultur i w produkcji wtórnych metabolitów. We wstępnych badaniach nad kulturami zawiesinowymi *Thalictrum rugosum* okazało się, że kwas 3-indoliloctowy (IAA) jest najlepszym roślinnym regulatorem wzrostu, jeżeli chodzi o produkcję berberyny. Zwiększenie produkcji tej substancji, w porównaniu do hodowli z dodatkiem 2,4-D, wynosi ponad 60%, a zastosowanie CuSO_4 w późnej fazie wzrostu lub na początku fazy stacjonarnej zwiększa szybkość syntezy i wydzielanie berberyny do pożywki. Na podstawie tych wyników próbowano ustalić optymalną strategię produkcji berberyny w kulturach zawiesinowych *Thalictrum rugosum*. Najbardziej wydajna okazała się hodowla dwuetapowa na pożywkach, w których stężenie sacharozy wynosiło 8%. Stwierdzono, że istotną rolę w wydzielaniu berberyny do pożywki odgrywa dodatek CuSO_4 [17].

Cennym źródłem berberyny okazała się tropikalna roślina medyczna, będąca na wymarciu, *Cosciniium fenestratum*. Kultury zawiesinowe otrzymane z kalusa tej rośliny wytwarzają berberynę począwszy od wczesnej fazy logarytmicznej, a maksymalna akumulacja następuje w późnej fazie logarytmicznej. Równocześnie wzrasta ilość berberyny w pożywce. W fazie stacjonarnej hodowanej kultury tkankowej zawartość berberyny stabilizuje się. Pozytywne działanie na produkcję berberyny wywiera kwas naftalenoctowy (NAA), natomiast kwas 3-indoliloctowy (IAA) wstrzymuje zarówno wzrost, jak i syntezę berberyny [14]. Dalsze badania nad pozyskiwaniem berberyny z *Cosciniium fenestratum* będą dotyczyć głównie optymalizacji warunków hodowli w celu zwiększenia wydajności otrzymywania berberyny.

Do najbardziej pospolitych alkaloidów purynowych występujących w roślinach należą kofeina, teobromina i teofilina. Alkaloidy purynowe zostały wykryte w przynajmniej 20 rodzinach, a powszechnie występują w gatunkach dwuliściennych strefy subtropikalnej. Ze względów ekonomicznych ważne są trzy gatunki roślin: *Coffea arabica* L. (kawa), *Camellie sinensis* L. (herbata) i *Theobroma cacao* L. (kakao). Kawa i herbata akumulują głównie kofeinę, natomiast kakao gromadzi teobrominę. W medycynie kofeina jest stosowana w stanach wyczerpania fizycznego i umysłowego, w ostrym zatruciu alkoholem i atropiną, w zapaści i podciśnieniu. Kofeina jest lekiem o działaniu pobudzającym pracę serca. Rozszerza naczynia wieńcowe, nerkowe i opon mózgowych. Teobromina rozszerza naczynia nerkowe, zwiększa przepływ krwi przez nerki i również rozszerza naczynia wieńcowe. Stosowana jest rzadko jako

lek pomocniczy w przewlekłej niewydolności krążenia z obrzękami oraz w chorobie wieńcowej. Natomiast teofilina zwiększa siłę skurczu mięśnia sercowego, działa miolitycznie, rozszerza oskrzela. Teofilina powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych, łącznie z wieńcowymi. Stosowana jest w dychawicy oskrzelowej, chorobie wieńcowej oraz jako środek moczopędny.

Kultury tkankowe *Theobroma cacao* mogą syntetyzować i gromadzić alkaloidy purynowe typowe dla normalnych, całych roślin. W kulturach kalusowych wytwarzanie alkaloidów utrzymuje się na poziomie ok. 10% produkcji *in vivo*, a w kulturach zawiesinowych produktywność jest jeszcze mniejsza. Produkcja alkaloidów purynowych w kulturach zawiesinowych jest mniej stabilna niż w kulturach kalusowych i często obecność teofiliny i kofeiny nie jest wykrywana. Alkaloidy są wytwarzane na początku fazy wzrostu i są wydzielane i/lub degradowane, kiedy następuje spowolnienie wzrostu i rozpoczyna się faza stacjonarna [12]. W hodowli kalusa *Camellia sinensis* kofeina jest wytwarzana pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu i dalej w fazie stacjonarnej, podobnie jak teobromina [23]. Tak jak w hodowli *Theobroma cacao*, kultury zawiesinowe *Coffea arabica* mają znacznie mniejszą produktywność niż kultury kalusa. Większość alkaloidów purynowych jest syntetyzowana podczas fazy stacjonarnej i połowa wytwarzanej teobrominy, jak i kofeiny jest wydzielana do pożywki [9,12]. Synteza teobrominy w kulturach *Theobroma cacao* i kofeiny w kulturach *Coffea arabica* i *Camellia sinensis* jest dodatkowo skorelowana ze wzrostem masy komórkowej [12].

Enzymy

Rośliny dysponują ogromnym potencjałem enzymatycznym. Enzymy katalizują reakcje hydrolizy, redukcji, oksydacji, hydroksylacji, glikozylacji, metylacji, demetylacji i wiele innych. Wykorzystanie tych zdolności roślin w warunkach *in vitro* może być przeprowadzone dwoma drogami: albo przez izolację pożądaných enzymów z biomasy tkanki roślinnej lub płynów pochodzących, podobnie jak postępuje się z innymi metabolitami wtórnymi, albo też enzymów tych używa się jako katalizatorów reakcji biokonwersji, w wyniku której z prekursora dodanego do wzrastającej kultury *in vitro* otrzymuje się pożądaný produkt.

Przykładem pierwszej drogi jest pozyskiwanie amylazy z tytoniu (*Nicotiana tabacum*), kukurydzy (*Zea mays*) lub trzciny cukrowej (*Saccharum ssp.*), produkcja katalazy ze słonecznika (*Helianthus tuberosus*) i z winorośli (*Vitis vinifera*), inwertazy z tytoniu (*N. tabacum*), kukurydzy (*Z. mays*) lub gruszy (*Pyrus communis*), peroksydazy z wilczej jagody (*Atropa belladonna*), pomidora (*Lycopersicon esculentum*) czy fasoli (*Phaseolus vulgaris*). W podobny sposób można uzyskać proteazy, wykorzystując głównie kultury tkankowe tytoniu (*N. tabacum*), a także z kultur komórkowych *Carica papaya*, *Asclepias syriaca* czy *Ficus carica*. Z *F. carica* otrzymuje się

termostabilne proteazy cysteinowe, których mieszanina przypomina swoimi właściwościami ficynę. Ten kompleks enzymów ma szerokie zastosowanie jako substytut podpuszczki w koagulacji mleka czy też czynnik kruszący mięso [5].

Wiele prekursorów pożądaných związków chemicznych nie może być poddanych procesom modyfikacji przy użyciu metod chemicznych czy też przy użyciu preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego. Można je natomiast modyfikować za pomocą enzymów roślinnych. Enzymy te mogą katalizować reakcje regio- i stereospecyficzne, co dla syntezy chemicznej jest trudno osiągalne. Biokonwersja może nie tylko dostarczać nowych produktów, ale także modyfikować już istniejące, nie wpływając przy tym na ich stabilność, dostępność i aktywność. Szczególnie obiecujące są procesy prowadzone przy użyciu hydrolaz i glikozylaz [28].

Procesy biokonwersji mogą być prowadzone w dwojaki sposób: albo enzymy są bezpośrednio wydzielane z rosnącej tkanki do pożywki, wówczas prekursor jest dodawany do rosnącej kultury, albo też enzymy są wcześniej izolowane i używane w postaci roztworów lub w systemie immobilizowanym. W celu prowadzenia biokonwersji wyizolowano m.in. syntazę kwasu rozmarynowego z *Coleus blumei* [27]. Natomiast biokonwersję zachodzącą przy udziale enzymów obecnych w rosnącej kulturze *in vitro* wykorzystano przy otrzymywaniu winblastyny, kodeiny, arbutyny, progesteronu, a także metylodigoksyny. Substratem wyjściowym do biosyntezy były odpowiednio: anhydrowinblastyna, kodeinon, hydroksychinon, pregnenolon i metylodigitoksyna, źródłem zaś pożądaných enzymów — odpowiednio kultury *Catharanthus roseus*, *Papaver somniferum*, *Agrostemma githago*, *Daucus carota* [1] i *Digitalis lanata* [26].

Mimo że komórki roślinne są źródłem wielu enzymów, niestety, wydajność syntezy tych enzymów jest bardzo ograniczona. Z tego powodu często niemożliwe jest powiększenie skali ich produkcji czy też skali przeprowadzanych z ich udziałem biokonwersji. Myśli się wprawdzie o tym, aby enzymy roślinne poprzez manipulacje genetyczne mogły być produkowane przez mikroorganizmy, ale wiadome jest, że wiele kompleksów enzymatycznych jest związanych ze strukturami występującymi wyłącznie w komórkach roślinnych. Tak więc tylko szczegółowe badania szlaków biochemicznych tych komórek mogą w przyszłości stworzyć warunki pełnego wykorzystania zdolności enzymatycznych roślin.

Perspektywy zastosowań przemysłowych

Jest rzeczą oczywistą, że oczekiwania związane z prowadzonymi badaniami są duże. Należy jednak podkreślić, że większość opisywanych procesów nie wyszła poza stadium badawcze. Nieliczne wypowiedzi na temat perspektyw przemysłowej produkcji metabolitów wtórnych poprzez hodowle tkankowe są dosyć sprzeczne i oscylują od entuzjazmu do pesymizmu.

Ocena szans dla wdrożeń przemysłowych jest niezmiernie utrudniona przez brak publikowanych danych. Obecnie na skalę przemysłową produkowana jest szikonina (Mitsui Petrochemicals, Japonia) i enzym fosfodiesteraza (Bethesda Res. Lab., USA). Publiczne wypowiedzi Japończyków i Niemców wskazują, że w krajach tych zostanie w najbliższym czasie uruchomiona produkcja innych substancji. Wymienia się berberynę (zastosowania medyczne), sanguinarynę (pasty do zębów), kapsaicynę (medycyna) i wanilinę (przem. spożywczy). Ocenia się, że koszty produkcyjne, przeliczone na jednostkę biomasy roślinnej uzyskanej *in vitro*, są ok. 10–30 % większe od kosztów produkcji biomasy w uprawach polowych. Należy jednak podkreślić, że koszty produkcyjne zależą w dużym stopniu od stosowanej technologii i skali produkcji. Najbliższe lata powinny dać odpowiedź odnośnie perspektyw rozwoju przemysłowej produkcji metabolitów roślinnych przy zastosowaniu technik bioreaktorowych.

Literatura

- [1] Atkinson B. 1991. Plant cell culture in Biochemical engineering and biotechnology handbook. 367–445, Macmillan Publishers Ltd.
- [2] Böhm H., Böhm L., Rink E. 1991. Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 75–82.
- [3] Chmiel A. 1992. Biotechnologia komórek roślinnych. *Biotechnologia* 4(19): 5–16.
- [4] Constabel F., Nassif-Makki H. 1971. Betalainbildung in beta-callusculturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 84(10): 629–636.
- [5] Cormier F., Charest Ch., Dufresne Ch. 1989. Partial purification and properties of proteases from fig (*Ficus carica*) callus culture. *Biotechnology Letters* 11(11): 797–802.
- [6] Danka Á.(red) 1990. Leksykon farmacji. PZWL Warszawa.
- [7] Decendit A., Liu D., Ouelhazi L., Doireau P., Merillon J.M., Rideau M. 1992. Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloid in *Catharanthus roseus* cell cultures. The factors affecting the cytokinin response. *Plant Cell Reports* 11: 400–403.
- [8] Deno H., Suga C., Morimoto T., Fujita Y. 1987. *Plant Cell Reports* 6: 197–199.
- [9] Frischknecht P.M., Baumann T. W. 1980. The pattern of purine alkaloid formation in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Planta Medica* 40: 245–249.
- [10] Fujita Y., Maeda Y., Suga C., Morimoto T. 1987. *Plant Cell Reports* 2: 192–193.
- [11] Girard P., Zr.d J. 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 1–12.
- [12] Gurney K.A., Evans L.V., Robinson D.S. 1992. Purine alkaloid production and accumulation in Cocoa callus and suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 43(251): 769–775.
- [13] Hamill J.D., Parr A.J., Rhodes M.J.C., Robins R.J., Walton N.J. 1987. *Bio/Technology* 5: 800–804.
- [14] Jayakumaran Nair A., Sudhakaran P.R., Madhusudana Rao J., Ramakrishna S.V. 1992. Berberine synthesis by callus and cell suspension cultures of *Coscium fenestratum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29: 7–10.
- [15] Jung K.H., Kwak S.S., Kim S.W., Lee H., Choi C.Y., Liu J.R. 1992. Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. *Biotechnology Letters* 14(8): 695–700.

- [16] Kim D.J., Chang H.N. 1990. Increased shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* suspension culture with in situ extraction and fungal cell treatment (elicitor). *Biotechnology Letters* **12**(6): 443–446.
- [17] Kim D.J., Pedersen H., Chin C.K. 1991. Development of process strategies for berberine production in plant cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology* **1**: 201–208.
- [18] Kitamura Y., Sugimoto Y., Samejima T., Hayashida K., Miura H. 1991. Growth and alkaloid production in *Duboisia myoporoides* and *D. leichhardtii* root cultures. *Chem. Pharm. Bull.* **39**(5): 1263–1266.
- [19] Leathers R.R., Davin C., Zr.d J.P. 1992. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. *bikores monogerm* (red beet). *In Vitro Cell. Biol.* **28P**: 39–45.
- [20] Leete E. 1990. Recent developments in the biosynthesis of tropane alkaloids. *Planta Medica* **56**: 339–352.
- [21] Lin G.D., Griffin W.J. 1992. Biotechnology of *Duboisia* alkaloids. *Biotechnology* **2**(1):
- [22] Nilsson T. 1970. Studies into the pigments in beetroot. *Lantbrukshogskolans Annal.* **36**: 179–219.
- [23] Ogotuga D.B.A., Northcote D.H. 1970. Caffeine formation in tea callus tissue. *Journal of Experimental Botany* **21**: 258–273.
- [24] Pasqua G., Monacelli B., Cuteri A., Finocchiaro O., Botta B., Vitali A., Delle Monache G. 1991. Cell suspension cultures of *Maclura pomifera*: optimization of growth and metabolite production. *J. Plant Physiol.* **139**: 249–251.
- [25] Pasquali G., Goddijn O.J. M., Waal A., Verpoorte R., Schilperoort R.A., Hoge J.H.C., Memelink J. 1992. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Molecular Biology* **18**: 1121–1131.
- [26] Petersen M., Alfermann A.W., Reinhard E., Seitz H.U. 1987. Immobilisation of digoxin 12 β -hydroxylase, a cytochrome P-450-dependent enzyme from cell cultures of *Digitalis lanata* EHRH. *Plant Cell Reports* **6**: 200–203.
- [27] Petersen M., Alfermann A.W. 1988. Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Z. Naturforsch* **43C**: 501–504.
- [28] Pras N. 1992. Bioconversion of naturally occurring precursors and related synthetic compounds using plant cell cultures. *Journal of Biotechnology* **26**: 29–62.
- [29] Rumińska A., Suchorska K., Węglarz Z. 1990. *Rośliny lecznicze i specjalne — wiadomości ogólne*. Wydawnictwo SGGW-AR Warszawa.
- [30] Sauerwein M., Wink M., Shimomura K. 1992. Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. *J. Plant. Physiol.* **140**: 147–152.
- [31] Schlatmann J.E., Nuutila A.M., van Gulik W.M., Ten Hoopen H.J.G., Verpoorte R., Heijden J.J. 1993. Scale-up of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengineering* **41**: 253–262.
- [32] Shimomura K., Sudo H., Saga H., Kamada H. 1991. Shikonin production and secretion by hairy roots cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* **10**: 282–285.
- [33] Taya M., Mine K., Kino-Oka M., Tone S., Ichi T. 1992. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **73**(1): 31–36.
- [34] Verpoorte R., van der Heijden R., Schripsema J. 1993. Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status nad prospects. *Journal of Natural Products* **56**(2): 186–207.
- [35] Zwayyed S.K., Frazier G.C., Dougall D.K. 1991. Growth and anthocyanin accumulation in carrot cell suspension cultures growing on fructose, glucose or their mixtures. *Biotechnol. Prog.* **7**: 288–290.