

**Wybrane aspekty biotechnologicznego
otrzymywania zespołu bioflawonoidów oraz
ksantonów w kulturach *in vitro* roślin
z rodzaju *Cyclopia***

Rozprawa doktorska



Adam Kokotkiewicz

Promotor: dr hab. n. farm. Maria Łuczkiewicz, prof. nadzw.

Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2012

Składam serdeczne podziękowania

Profesor Marii Łuczkiewicz, za wskazanie tematu pracy, poświęcony czas, pomoc, cierpliwość oraz przyjazną atmosferę towarzyszącą prowadzonym badaniom

Mojej Rodzinie, a w szczególności Rodzicom, za wsparcie podczas wykonywania pracy doktorskiej

Profesor Mirosławie Krauze-Baranowskiej, kierownikowi Katedry i Zakładu Farmakognozji w Gdańsku, za stworzenie warunków dla realizacji projektu badawczego

Koleżankom i Kolegom z Katedry Farmakognozji, za życzliwość i okazaną pomoc
Zespołowi Katedry i Zakładu Biofarmacji Collegium Medicum w Bydgoszczy, za pomoc w czasie prowadzenia analiz chromatograficznych

Praca obejmuje wyniki dotychczas niepublikowane oraz zawarte w następujących publikacjach:

Oryginalne prace doświadczalne:

Kokotkiewicz, A., Wnuk, M., Buciuński, A., Łuczkiwicz, M. (2009). *In vitro* cultures of *Cyclopia* plants (honeybush) as a source of bioactive xanthenes and flavanones. *Zeitschrift für Naturforschung C – a Journal of Biosciences*, 64, 533-540.

Kokotkiewicz, A., Łuczkiwicz, M., Hering, A., Ochocka, R., Goryński, K., Buciuński, A., Sowiński, P. (2012). Micropropagation of *Cyclopia genistoides*, an endemic South African plant of economic importance. *Zeitschrift für Naturforschung C – a Journal of Biosciences*, 67, 65-76.

Kokotkiewicz, A., Łuczkiwicz, M., Sowiński, P., Glód, D., Goryński, K., Buciuński, A. (2012). Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and *in vitro* cultures. *Food Chemistry*, 133, 1373-1382.

Prace teoretyczne:

Kokotkiewicz, A., Łuczkiwicz, M. (2009). Honeybush (*Cyclopia* sp.) – a rich source of compounds with high antimutagenic properties. *Fitoterapia*, 80, 3-11.

Rozdział w książce:

Kokotkiewicz, A., Łuczkiwicz, M. (2013). Honeybush tea (*Cyclopia* sp.): a traditional South-African tisane. W: *Tea in Health and Disease Prevention* (Preedy, V. R., ed.). Amsterdam: Elsevier, str. 141-159.

Spis treści

Wstęp i cel pracy	8
I. Część teoretyczna	12
I.1. Charakterystyka roślin z rodzaju <i>Cyclopia</i>	12
I.1.1. Stanowisko systematyczne	12
I.1.2. Opis botaniczny i uprawa	12
I.1.3. Produkcja herbaty honeybush	14
I.1.4. Zastosowanie	16
I.1.5. Skład chemiczny	17
I.1.6. Własności antyoksydacyjne i aktywność biologiczna	21
I.2. Produkcja metabolitów wtórnych pochodzenia roślinnego w instalacjach laboratoryjnych, półtechnicznych oraz przemysłowych	30
I.2.1. Rodzaje produkowanych związków	31
I.2.2. Wybór biomasy	34
I.2.3. Wybór konstrukcji bioreaktora	37
Wykaz skrótów stosowanych w badaniach eksperymentalnych (rozdz. II i III)	52
II. Badania własne	54
II.1. Badania biotechnologiczne	55
II.1.1. Wyprowadzenie kultur <i>in vitro</i> wybranych gatunków z rodzaju <i>Cyclopia</i>	57
II.1.1.1. Kiełkowanie nasion i potwierdzenie tożsamości poszczególnych gatunków	57
II.1.1.2. Wyprowadzenie kultur kalusowych	58
II.1.1.3. Wyprowadzenie kultur organowych	64
II.1.1.4. Akumulacja związków polifenolowych w roślinach macierzystych oraz kulturach <i>in vitro</i> <i>Cyclopia</i> sp.	68
II.1.2. Kultury parenchymatyczne <i>Cyclopia subternata</i>	79
II.1.2.1. Wpływ czynników fizycznych na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych <i>Cyclopia subternata</i>	79
II.1.2.1.1. Wpływ warunków oświetleniowych na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych <i>Cyclopia subternata</i>	81
II.1.2.1.2. Wpływ promieniowania ultrafioletowego na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych <i>Cyclopia subternata</i>	86
II.1.2.1.3. Wpływ temperatury na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych <i>Cyclopia subternata</i>	92
II.1.2.2. Kultury zawieszinowe <i>Cyclopia subternata</i>	99
II.1.2.2.1. Wyprowadzenie kultur zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	100
II.1.2.2.2. Wytrząsane hodowle zawieszinowe <i>Cyclopia subternata</i>	102
II.1.2.2.2.1. Podstawowa wytrząsana hodowla zawieszinowa <i>Cyclopia subternata</i>	102
II.1.2.2.2.1.1. Profil wzrostowy podstawowej wytrząsanej hodowli zawieszinowej <i>Cyclopia subternata</i>	102
II.1.2.2.2.1.2. Biosynteza związków polifenolowych w podstawowej wytrząsanej hodowli zawieszinowej <i>Cyclopia subternata</i>	104
II.1.2.2.2.2. Wpływ braku oświetlenia na wzrost biomasy i biosyntezę związków polifenolowych w wytrząsanych kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	108
II.1.2.2.2.2.1. Profil wzrostowy wytrząsanej hodowli zawieszinowej <i>Cyclopia subternata</i> prowadzonej w warunkach całkowitej ciemności	109

II.1.2.2.2.2. Biosynteza związków polifenolowych w wytrząsanych kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> prowadzonych w warunkach całkowitej ciemności	111
II.1.2.2.2.3. Wpływ dokarmiania zawieszin <i>Cyclopia subternata</i> prekursorem biosyntezy oraz złożonymi substancjami odżywczo-regulatorowymi na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych	113
II.1.2.2.2.3.1. Wzrost kultur zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> suplementowanych prekursorem biosyntezy oraz złożonymi substancjami odżywczo-regulatorowymi	114
II.1.2.2.2.3.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> suplementowanych prekursorem biosyntezy oraz złożonymi substancjami odżywczo-regulatorowymi	117
II.1.2.2.2.4. Wpływ elicytacji na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	119
II.1.2.2.2.4.1. Wzrost biomasy w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> elicytowanych za pomocą chitosanu	120
II.1.2.2.2.4.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> elicytowanych za pomocą chitosanu	122
II.1.2.2.2.4.3. Wzrost biomasy w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> elicytowanych za pomocą jasmonianu metylu	125
II.1.2.2.2.4.4. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> elicytowanych za pomocą jasmonianu metylu	127
II.1.2.2.2.5. Wpływ immobilizacji na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	129
II.1.2.2.2.5.1. Wpływ dodatku korka i żywicy Amberlite™ XAD4 na wzrost kultur zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	130
II.1.2.2.2.5.2. Wpływ dodatku korka i żywicy Amberlite™ XAD4 na akumulację polifenoli w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	131
II.1.2.2.3. Kultury zawieszinowe <i>Cyclopia subternata</i> prowadzone w bioreaktorze	135
II.1.2.2.3.1. Wzrost biomasy w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> prowadzonych w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym	137
II.1.2.2.3.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> prowadzonych w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym	140
II.1.2.2.3.3. Wpływ braku oświetlenia i dodatku wody kokosowej na wzrost zawiesziny <i>Cyclopia subternata</i> w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym	142
II.1.2.2.3.4. Wpływ braku oświetlenia i dodatku wody kokosowej na akumulację związków polifenolowych w zawieszynie <i>Cyclopia subternata</i> namnażanej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym	144
II.1.3. Kultury pędowe <i>Cyclopia genistoides</i>	148
II.1.3.1. Mikrorozmnażanie <i>Cyclopia genistoides</i>	149
II.1.3.1.1. Multiplikacja pędów	151
II.1.3.1.2. Elongacja pędów	156
II.1.3.1.3. Ukorzenianie i aklimatyzacja	158
II.1.3.1.4. Zawartość związków polifenolowych w biomasach <i>Cyclopia genistoides</i> uzyskanych na poszczególnych etapach mikrorozmnażania	160
II.1.3.2. Kultury pędowe <i>Cyclopia genistoides</i> ukierunkowane na akumulację wybranych związków polifenolowych	165
II.1.3.2.1. Płynne stacjonarne kultury pędowe <i>Cyclopia genistoides</i> prowadzone na systemie LifeRaft®	167
II.1.3.2.1.1. Wzrost biomasy w płynnych stacjonarnych kulturach pędowych <i>Cyclopia genistoides</i>	167

II.1.3.2.1.2. Akumulacja związków polifenolowych w płynnych stacjonarnych kulturach pędowych <i>Cyclopia genistoides</i>	169
II.1.3.2.2. Kultury pędowe <i>Cyclopia genistoides</i> prowadzone w bioreaktorze okresowo-zalewowym	174
II.1.3.2.2.1. Wzrost kultur pędowych <i>Cyclopia genistoides</i> namnażanych w systemie okresowo-zalewowym	175
II.1.3.2.2.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach pędowych <i>Cyclopia genistoides</i> namnażanych w systemie okresowo-zalewowym	177
II.2. Badania fitochemiczne	182
II.2.1. Przygotowanie frakcji polifenolowych z materiału gruntowego oraz biomas <i>in vitro</i> roślin z rodzaju <i>Cyclopia</i>	183
II.2.2. Oznaczenia jakościowe i ilościowe związków polifenolowych w biomasach <i>in vitro</i> i roślinach gruntowych <i>Cyclopia</i> sp.	184
II.2.2.1. Wybór metody analitycznej	184
II.2.2.2. Analizy jakościowe	186
II.2.2.3. Analizy ilościowe	200
II.2.3. Izolacja związków polifenolowych z biomas <i>in vitro</i> i roślin gruntowych <i>Cyclopia</i> sp.	206
II.2.3.1. Wybór materiału roślinnego	206
II.2.3.2. Izolacja związków polifenolowych	207
II.2.4. Identyfikacja związków polifenolowych	216
III. Część doświadczalna	221
III.1. Badania biotechnologiczne	221
III.1.1. Surowiec do badań	221
III.1.2. Technika badań	221
III.1.3. Odczynniki i podłoża doświadczalne	222
III.1.4. Pomiar przyrostu namnażanych biomas	223
III.1.4.1. Wyznaczanie świeżej (FW) i suchej masy (DW) oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi)	223
III.1.4.2. Badanie morfologiczne biomas roślinnych	224
III.1.5. Wyprowadzenie kultur <i>in vitro</i>	224
III.1.5.1. Sterylizacja nasion i uzyskanie jałowych siewek	224
III.1.5.2. Kultury inicjalne	224
III.1.5.3. Uzyskanie stabilnych kultur stacjonarnych <i>Cyclopia</i> sp.	225
III.1.6. Kultury parenchymatyczne <i>Cyclopia subternata</i>	226
III.1.6.1. Wpływ czynników fizycznych na wzrost biomas oraz produkcję związków polifenolowych w hodowli kalusowej <i>Cyclopia subternata</i>	226
III.1.6.2. Kultury zawieszinowe <i>Cyclopia subternata</i>	228
III.1.6.2.1. Wyprowadzenie hodowli wytrząsanych	228
III.1.6.2.2. Wzrost biomas oraz produkcja związków polifenolowych w podstawowej hodowli zawieszinowej <i>Cyclopia subternata</i>	229
III.1.6.2.3. Wpływ braku oświetlenia na wzrost biomas oraz produkcję związków polifenolowych w zawieszinie <i>Cyclopia subternata</i>	229
III.1.6.2.4. Wpływ dokarmiania i elicytacji na wzrost biomas oraz produkcję polifenoli w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	229
III.1.6.2.5. Wpływ immobilizacji na wzrost biomas oraz produkcję polifenoli w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i>	231
III.1.6.2.5.1. Przygotowanie czynników immobilizujących	231
III.1.6.2.5.2. Przebieg doświadczenia	231

III.1.6.2.6. Wzrost biomasy oraz produkcja związków polifenolowych w hodowli zawieszinowej <i>Cyclopia subternata</i> prowadzonej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym	232
III.1.6.2.6.1. Konstrukcja bioreaktora	232
III.1.6.2.6.2. Przebieg eksperymentu	233
III.1.6.2.6.3. Wpływ dokarmiania i warunków hodowli na wzrost biomasy i produkcję związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych <i>Cyclopia subternata</i> prowadzonych w bioreaktorze	234
III.1.7. Kultury pędowe <i>Cyclopia genistoides</i>	234
III.1.7.1. Mikrorozmnażanie <i>Cyclopia genistoides</i>	234
III.1.7.1.1. Multiplikacja pędów	234
III.1.7.1.2. Wydłużanie pędów	234
III.1.7.1.3. Ukorzenianie i aklimatyzacja	236
III.1.7.1.4. Wpływ morfogenezy na biosyntezę związków polifenolowych	236
III.1.7.2. Wzrost biomasy oraz produkcja związków polifenolowych w płynnych kulturach pędowych <i>Cyclopia genistoides</i>	237
III.1.7.2.1. Hodowle wytrząsane	237
III.1.7.2.2. Płynne hodowle stacjonarne	237
III.1.7.3. Wzrost biomasy oraz produkcja związków polifenolowych w kulturach pędowych <i>Cyclopia genistoides</i> prowadzonych w bioreaktorze okresowo-zalewowym	237
III.1.7.3.1. Konstrukcja bioreaktora	237
III.1.7.3.2. Przebieg eksperymentu	239
III.2. Badania fitochemiczne	239
III.2.1. Surowiec do badań	239
III.2.2. Odczynniki	240
III.2.3. Jakościowe oraz ilościowe analizy chromatograficzne HPLC	240
III.2.3.1. Przygotowanie próbek do badań	240
III.2.3.2. Aparatura	241
III.2.3.3. Procedury analityczne	242
III.2.3.3.1. Warunki rozdzielania	242
III.2.3.3.2. Detekcja DAD i ESI-MS	242
III.2.3.3.3. Analizy jakościowe	242
III.2.3.3.4. Analizy ilościowe	243
III.2.4. Izolacja wybranych związków polifenolowych z badanych matryc roślinnych	244
III.2.4.1. Przygotowanie frakcji polifenolowych do chromatografii preparatywnej	244
III.2.4.2. Aparatura i technika badań	249
III.2.4.2.1. Semipreparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa	249
III.2.4.2.2. Analizy jakościowe frakcji i związków pozyskanych w toku prac preparatywnych	249
III.2.4.3. Procedury izolacji	250
III.2.5. Identyfikacja związków	251
III.3. Analiza statystyczna	259
Streszczenie	260
Summary	272
Wyniki i wnioski	283
Piśmiennictwo	297

Wstęp i cel pracy

Polifenole są współcześnie jedną z najintensywniej badanych, pod względem aktywności biologicznej, grup związków pochodzenia roślinnego. Szereg połączeń ze wspomnianej klasy wywiera wyraźnie zaznaczone efekty prozdrowotne, spośród których wymienić należy m.in. działania: antyoksydacyjne, antymutagenne, fitoestrogenne, przeciwzapalne, jak również ochronny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na związek pomiędzy regularnym dostarczaniem określonych związków polifenolowych wraz ze składnikami diety, a zmniejszoną zapadalnością na choroby serca i układu krążenia, cukrzycę oraz niektóre typy nowotworów (Clifford i Brown, 2006; Heinrich i Prieto, 2008; Jaganath i Crozier, 2010; Quideau i wsp., 2011). Dużą popularność zdobywają w tym względzie produkty zaliczane do tzw. „nutraceutyków” oraz „żywności funkcjonalnej”, zawierające bogate w polifenole wyciągi roślinne i/lub izolowane związki ze wspomnianej grupy (Espín i wsp., 2007). Dodatkowy atut stanowi niska toksyczność połączeń polifenolowych i związane z tym bezpieczeństwo stosowania zawierających je preparatów (Clifford i Brown, 2006).

W ostatnich latach, dużo uwagi poświęca się badaniom nad punktami uchwytu oraz mechanizmom działania polifenoli. Powyższe eksperymenty, wchodzące w zakres biologii molekularnej, biochemii oraz farmakologii, dowiodły, że połączenia naturalne z niniejszej klasy, ze względu na zróżnicowaną aktywność biologiczną, mogą stanowić składniki bezpiecznych preparatów, skutecznych przede wszystkim w zapobieganiu i leczeniu tzw. „schorzeń cywilizacyjnych”. Badania farmakologiczne, których ostatecznym celem jest opracowanie nowych preparatów leczniczych pochodzenia naturalnego, przeprowadza się najczęściej, zgodnie z wymogami nowoczesnej medycyny, z wykorzystaniem wyizolowanych i oczyszczonych wtórnych metabolitów roślinnych (Clifford i Brown, 2006; Jaganath i Crozier, 2010; Quideau i wsp., 2011). Jak dotąd, ich źródłem są głównie rośliny gruntowe, pozyskiwane ze stanowisk naturalnych bądź upraw polowych (Matkowski, 2008; Wang, 2008; Jaganath i Crozier, 2010).

Ograniczona dostępność poszczególnych gatunków roślinnych, ich endemiczny charakter oraz niska zawartość pożądaných metabolitów wtórnych, skutkują ciągłym poszukiwaniem alternatywnych metod pozyskiwania omawianych związków (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Wang, 2008). Metody klasycznej syntezy chemicznej, jakkolwiek skuteczne w otrzymywaniu prostych związków o strukturze identycznej z metabolitami naturalnymi, napotykać na szereg trudności w przypadku pochodnych glikozydowych bądź związków o złożonej stereoizomerii (Oyama i wsp., 2011; Quideau i wsp., 2011). Z uwagi na powyższe, od szeregu lat podejmowane są próby otrzymywania wybranych metabolitów wtórnych w oparciu o kultury *in vitro* roślin wyższych, które ze względu na obecność układów enzymatycznych specyficznych dla gatunków macierzystych, mogą dostarczyć znacznych ilości wysokoproduktywnej biomasy niezależnie od pory roku i warunków środowiskowych (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Verpoorte i wsp., 2002; Matkowski, 2008;

Wang, 2008; Georgiev i wsp., 2009). Dodatkową zaletą roślinnych kultur tkankowych jest możliwość podwyższenia poziomów akumulacji pozyskiwanych połączeń na drodze wybranych strategii eksperymentalnych, obejmujących metody genetyczne oraz retrobiosyntetyczne, bazujące na mapowaniu szlaków biosyntezy wtórnych metabolitów oraz identyfikowaniu enzymów konstytucyjnych i regulatorowych (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Verpoorte i wsp., 2002; Matkowski, 2008; Georgiev i wsp., 2009). Nie bez znaczenia jest również możliwość dowolnego zwiększania skali doświadczeń *in vitro* przy użyciu instalacji technicznych o charakterze bioreaktorów (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Eibl i Eibl, 2008; Georgiev i wsp., 2009).

Z uwagi na powyższe, sformułowano zasadniczy cel pracy, którym było opracowanie roślinnych systemów *in vitro* do wybiórczego pozyskiwania wybranych połączeń polifenolowych o ustalonej bądź spodziewanej aktywności biologicznej.

Przeprowadzona kwerenda literaturowa wskazała na południowoafrykańskie krzewy z rodzaju *Cyclopia* (miodokrzew), wykorzystywane do produkcji herbaty ziołowej „honeybush”, jako na gatunki charakteryzujące się bogatym metabolizmem wtórnym w zakresie biosyntezy polifenoli (Ferreira i wsp., 1998; Kamara i wsp., 2003, 2004; Joubert i wsp., 2008a). Ze względu na unikatowy aromat, a także określone właściwości prozdrowotne, napary z fermentowanych oraz nie poddanych fermentacji części nadziemnych opisywanych roślin, zyskują coraz większą, ogólnosiwiatową popularność jako napoje do codziennego użytku (Joubert i wsp., 2008a, 2011). Przeprowadzone badania biomedyczne wskazały, że ekstrakty z *Cyclopia* sp. wykazują m.in. aktywność: antyoksydacyjną, antymutageną i fitoestrogeną, obserwowaną w warunkach *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* (McKay i Blumberg, 2007; Joubert i wsp., 2008a). Poza obecnością szeregu połączeń z grupy pochodnych fenylopropanu (flawanony, flawony, izoflawony), powyższe gatunki wykazują unikatową zdolność do akumulacji rzadko spotykanych w rodzinie Fabaceae ksantonów (Joubert i wsp., 2008a): mangiferyny, posiadającej m.in. własności antyoksydacyjne, przeciwzapalne i przeciwcukrzycowe (Masibo i He, 2008; Vyas i wsp., 2012), a także słabo rozpoznanej pod względem aktywności biologicznej izomangiferyny. Spośród metabolitów istotnych z punktu widzenia potencjału prozdrowotnego miodokrzewów wymienić należy także flawanon – hesperydinę, stosowaną w zaburzeniach krążenia żylnego (Garg i wsp., 2001; Benavente-García i Castillo, 2008), jak również izoflawony (formononetyna, kalikozyna), wykazujące szeroko rozumiane działanie fitoestrogenne i ochronne na układ chrzęstno-kostny (Choi i wsp., 2007; Ha i wsp., 2010; Huh i wsp., 2010). Zdolność do biosyntezy wymienionych powyżej, różnorodnych grup połączeń polifenolowych, wskazuje na obecność w roślinach z rodzaju *Cyclopia* rozbudowanych układów enzymatycznych, charakterystycznych dla szlaku fenylopropanowego. Tym samym, miodokrzewy należy uznać za matryce roślinne odpowiednie do prowadzenia badań biotechnologicznych, z uwagi na możliwość ukierunkowania uzyskanych kultur *in vitro* na wybiórczą produkcję wyselekcjonowanych związków aktywnych biologicznie. Do projektu naukowego wybrano 3 gatunki opisywanych roślin o znaczeniu komercyjnym, charakteryzujące się wysoką zawartością polifenoli: *C. genistoides* L. Vent., *C. intermedia* E. Mey. i *C. subternata* Vogel (Joubert i wsp.,

2003, 2008a, c). Jak wynika z danych piśmiennictwa, dotychczas nie otrzymano i nie badano kultur *in vitro* miodokrzewów.

Zasadnicze cele badawcze zamierzano realizować na dwóch komplementarnych płaszczyznach: biotechnologicznej oraz fitochemicznej.

W ramach eksperymentów biotechnologicznych, postanowiono wyprowadzić kultury *in vitro* miodokrzewów, a następnie uzyskać, na drodze selekcji biomas, aplikacji wybranych strategii doświadczalnych, a także zwiększania skali hodowli, przy użyciu prototypowych bioreaktorów, wysokoproduktywne systemy do pozyskiwania określonych połączeń polifenolowych. Równolegle prowadzone badania fitochemiczne obejmować miały opracowanie metod ekstrakcji oraz chromatograficznego oznaczania ksantonów i bioflawonoidów, które wykorzystywano następnie do analiz skryningowych powyższych związków w kulturach tkankowych i surowcach gruntowych *Cyclopia* sp. W toku wykonywanych prac postanowiono również wyizolować, a następnie określić tożsamość niezidentyfikowanych do tej pory składników polifenolowych, występujących w matrycach roślinnych ze stanu naturalnego oraz z kultur *in vitro* miodokrzewów.

W ramach podjętych badań biotechnologicznych planowano, poprzez modyfikacje pożywek wzrostowych w zakresie soli mineralnych, węglowodanów, witamin oraz roślinnych regulatorów wzrostu, uzyskać biomasę *in vitro* *Cyclopia* sp. różniące się stopniem cytodyferencjacji. Kultury tkankowe miodokrzewów o największej zawartości ksantonów i/lub bioflawonoidów zamierzano następnie przeznaczyć do dalszych doświadczeń, obejmujących modyfikacje warunków fizycznych hodowli (oświetlenie, temperatura), suplementację podłoży prekursorami biosyntezy polifenoli oraz substancjami odżywczymi, elicytację, a także immobilizację biomas. Opisywane zabiegi biotechnologiczne miały doprowadzić do zwiększenia poziomów akumulacji wybranych metabolitów wtórnych w wyselekcjonowanych biomasach. Ostatni etap planowanych eksperymentów stanowić miała adaptacja kultur o największej produktywności względem wybranych połączeń naturalnych, czyli tzw. „superproducentów”, do wzrostu w instalacjach technicznych o charakterze bioreaktorów, skonstruowanych w ramach realizacji projektu.

Z uwagi na endemiczny charakter roślin z rodzaju *Cyclopia*, a także zagrożenia związane z nadmierną eksploatacją stanowisk naturalnych miodokrzewów (Joubert i wsp., 2008a, 2011), postanowiono dodatkowo opracować metodę mikrorozmnażania powyższych roślin, mogącą znaleźć zastosowanie zarówno do odnowy populacji gatunków rzadkich, jak również namnażania badanych krzewów dla celów komercyjnych.

Badania fitochemiczne, wchodzące w zakres niniejszej pracy, obejmować miały, w pierwszej kolejności, opracowanie metody przygotowywania ekstraktów z matryc *in vitro* i *in vivo* *Cyclopia* sp., z przeznaczeniem do jakościowych i ilościowych analiz chromatograficznych występujących w nich związków polifenolowych. W toku dalszych doświadczeń, zamierzano zoptymalizować sposób rozdzielania zespołów ksantonów i bioflawonoidów z poszczególnych biomas, przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem detekcji UV-DAD i ESI-MS. Zwaliowana metoda HPLC miała być następnie wykorzystana do analiz skryningowych biomas

Cyclopia sp., uzyskanych w toku prac biotechnologicznych. Tym samym, możliwa byłaby ocena skuteczności stosowanych strategii doświadczalnych, ukierunkowanych na stymulację biosyntezy polifenoli w kulturach *in vitro* miodokrzewów.

Integralną część projektu stanowiły również prace izolacyjne, prowadzone równolegle do opisanych wyżej analiz jakościowych oraz ilościowych, zmierzające do pozyskania, z biomas *in vitro* miodokrzewów, połączeń niezidentyfikowanych uprzednio w gatunkach macierzystych. Z uwagi na fakt, że rozpoznany do tej pory skład chemiczny roślin z rodzaju *Cyclopia* nie tłumaczy w pełni aktywności biologicznych stwierdzonych dla przygotowywanych z nich wyciągów (Verhoog i wsp., 2007b; Mfenyana i wsp., 2008), do prac preparatywnych postanowiono przeznaczyć również surowce gruntowe badanych gatunków. Izolację związków polifenolowych zamierzano prowadzić z wykorzystaniem technik łączonych, obejmujących frakcjonowaną ekstrakcję, grawitacyjną chromatografię kolumnową oraz wysokosprawną, semipreparatywną chromatografię cieczową. Tożsamość pozyskanych połączeń postanowiono następnie określić na drodze jedno- i dwukierunkowych eksperymentów ^1H i ^{13}C NMR, a także analiz LC-DAD i LC-ESI-MS.

W zakresie badań fitochemicznych, oboczny cel projektu stanowiło określenie wpływu fermentacji części nadziemnych miodokrzewów, przeznaczonych do sporządzania herbaty honeybush, na zawartość w nich znanych, a także nowo wyizolowanych, w toku prowadzonych doświadczeń, połączeń polifenolowych. W tym celu, niefermentowane (tzw. „zielone”) oraz poddane fermentacji surowce roślinne zamierzano poddać analizom LC-DAD i LC-ESI-MS, z uwagi na obecność badanych metabolitów wtórnych.

Podsumowując, zaplanowany cykl doświadczeń biotechnologicznych oraz fitochemicznych miał umożliwić pełną realizację podstawowego celu pracy, którym było uzyskanie systemów *in vitro* do wybiórczego pozyskiwania ksantonów i bioflawonoidów, w oparciu o kultury tkankowe roślin z rodzaju *Cyclopia*. Opracowanie procedur *upstream*, obejmujących namnażanie biomas miodokrzewów w instalacjach o charakterze bioreaktorów, a także *downstream*, związanych z izolacją poszczególnych polifenoli, powinno zapewnić wydajną produkcję wybranych wtórnych metabolitów metodami biotechnologicznymi, z przeznaczeniem do badań nad ich aktywnością biologiczną.

I. Część teoretyczna

I.1. Charakterystyka roślin z rodzaju *Cyclopia*

I.1.1. Stanowisko systematyczne

Królestwo:	Eukaryota (jądrowe)	Cronquist (1981)
Podkrólestwo:	Phytobionta (rośliny)	
Gromada:	Spermatophyta (nasienne)	
Podgromada:	Magnoliophytina (okrytonasienne)	
Klasa:	Magnoliopsida (dwuliścienne)	
Podklasa:	Rosidae (różowe)	
Nadrząd:	Fabanae (strączkowe)	
Rząd:	Fabales (strączkowce)	
Rodzina:	Fabaceae (bobowate)	
Podrodzina:	Faboideae (bobowate właściwe)	
Plemię:	Podalyrieae	Van der Bank i wsp. (2002)
Rodzaj:	<i>Cyclopia</i> (miodokrzew)	
Gatunek:	<i>Cyclopia genistoides</i> (L.) Vent. <i>Cyclopia intermedia</i> E. Mey. <i>Cyclopia subternata</i> Vogel	Joubert i wsp. (2011)

I.1.2. Opis botaniczny i uprawa

Rodzaj *Cyclopia* obejmuje ponad 20 gatunków endemicznych krzewów wchodzących w skład formacji roślinnej fynbos (południowoafrykański odpowiednik śródziemnomorskiej makii) na terenie Państwa Przylądkowego (Capensis) w Republice Południowej Afryki. Pomimo stosunkowo niewielkiej powierzchni (4% obszaru RPA), wspomniany region charakteryzuje się obecnością ponad 8000 gatunków roślin naczyniowych, spośród których 65% to endemity (Goldblatt, 1997). Oprócz swej unikalności i znaczenia czysto naukowego, szereg gatunków typowych dla Państwa Przylądkowego jest istotnych z gospodarczego punktu widzenia, stanowiąc źródło surowców wykorzystywanych w przemyśle spożywczym, a także do produkcji leków roślinnych i nutraceutyków (Turpie i wsp., 2003; Van Wyk, 2008, 2011a, b). Zasięg występowania miodokrzewów rozciąga się od gór Cederberg do Półwyspu Przylądkowego (Prowincja Przylądkowa Zachodnia) i Port Elizabeth (Prowincja Przylądkowa Wschodnia) (Schutte-Vlok, 1998). Większość gatunków preferuje piaszczyste, kwaśne gleby o niskiej zawartości azotu i fosforu, wykazując zarazem zdolność do wiązania azotu atmosferycznego dzięki obecności symbiotycznych bakterii z rodzaju *Rhizobium* (Joubert i wsp., 2007; Spriggs i Dakora, 2007, 2009a, b; Sprent i wsp., 2010). Częste pożary roślinności doprowadziły do wykształcenia dwóch odmiennych strategii przetrwania miodokrzewów. Części nadziemne gatunków określanych mianem „reseeders”, których przedstawicielem jest m.in. *C. subternata*

Vogel, są przeważnie całkowicie niszczone przez ogień, a odbudowa populacji dokonuje się z udziałem znajdujących się w glebie nasion. Przedstawiciele drugiej grupy („resprouters”), jak *C. intermedia* E. Mey. i *C. genistoides* (L.) Vent., wytwarzają silnie zdrewniałą część podziemną, tzw. *lignotuber*, zdolną do przetrwania pożaru i wytwarzającą następnie nowe pędy (Sutcliffe i Whitehead, 1995; Schutte-Vlok, 1998; Joubert i wsp., 2011). Niezależnie od wymienionych powyżej różnic, wszystkie gatunki miodokrzewów charakteryzują się obecnością trójlistkowych liści, parzystych, zrosniętych przykwiatków oraz żółtych kwiatów (Fot. 1A), o charakterystycznym, miodowym zapachu (Du Toit i wsp., 1998; Schutte-Vlok, 1998; Van der Bank i wsp., 2002; Joubert i wsp., 2011).



Fot. 1. Wysuszone i rozdrobnione części nadziemne miodokrzewów: A, *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. i B, *Cyclopia intermedia* E. Mey.

Liście poszczególnych miodokrzewów różnią się wielkością: w przypadku gatunku *C. intermedia* mają one długość 18-28 mm i szerokość do 5 mm (Fot. 1B), *C. genistoides* zaś posiada liście węższe (1-2 mm), długości do 20 mm (Fot. 1A) (Du Toit i Joubert, 1998b; Joubert i wsp., 2011).

Do gatunków o znaczeniu gospodarczym, pozyskiwanych w różnych regionach RPA i dostarczających surowca do produkcji herbaty honeybush, należą przede wszystkim *C. intermedia* E. Mey, *C. subternata* Vogel, *C. genistoides* (L.) Vent. i *C. sessiliflora* Eckl. and Zeyh (Tab. 1). Przez wiele lat, materiał roślinny otrzymywany był wyłącznie ze stanu naturalnego, co w obliczu rosnącego zapotrzebowania na herbatę honeybush stwarzało ryzyko nadmiernej eksploatacji dzikich stanowisk (Du Toit i wsp., 1998; Joubert i wsp., 2011). W ostatnich latach podjęto próby zakładania plantacji miodokrzewów, mogących zaspokoić rosnący popyt na herbaty ziołowe. Do projektu wyselekcjonowano gatunki *C. subternata* i *C. genistoides*, charakteryzujące się szybkim wzrostem i wysoką zawartością związków polifenolowych (Joubert i wsp., 2008a, 2011).

Tab. 1. Gatunki roślin z rodzaju *Cyclopia* o znaczeniu gospodarczym.

Gatunek	Nazwy zwyczajowe (w jęz. afrikaans oraz angielskim)	Obszar występowania	Pozyskiwanie surowca
<i>C. intermedia</i> E. Mey.	Bergtee ("mountain tea") ^{ab}	od Swellendam (Zachodnia Prowincja Przylądkowa) do Uitenhage (Wschodnia Prowincja Przylądkowa), pasma górskie Langeberg, Swartberg i Kouga ^{abc}	zbiór ze stanu naturalnego ^{ac}
<i>C. subternata</i> Vogel	Vleitee ("valley tea") ^{ab}	od Heidelbergu (Zachodnia Prowincja Przylądkowa) do Uitenhage (Wschodnia Prowincja Przylądkowa), pasma górskie Tsitsikamma i Outeniqua, dolina Langkloof ^{abc}	uprawy, zbiór ze stanu naturalnego ^a
<i>C. genistoides</i> (L.) Vent.	Kustee ("coastal tea") ^{ab}	Zachodnia Prowincja Przylądkowa, tereny przybrzeżne od Yzerfontein do rzeki Gourits, rejon Overberg ^{abc}	uprawy, zbiór ze stanu naturalnego ^a
<i>C. sessiliflora</i> Eckl. and Zeyh.	Heidelbergtee ^{ab}	góry Langeberg w okolicach Heidelbergu (Zachodnia Prowincja Przylądkowa) ^{abc}	zbiór ze stanu naturalnego ^a

^a Joubert i wsp. (2008a)

^b Schutte-Vlok (1998)

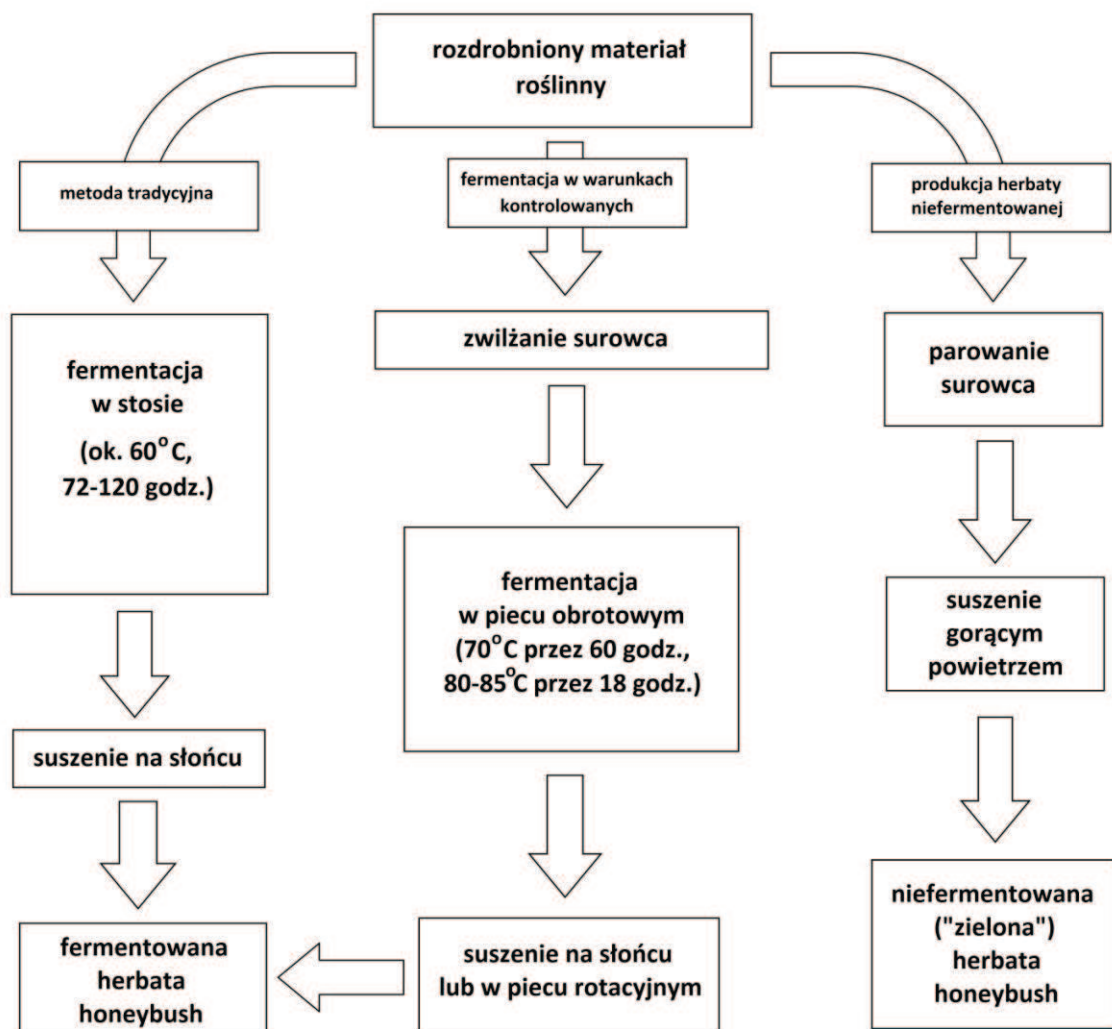
^c Du Toit i wsp. (1998)

I.1.3. Produkcja herbaty honeybush

Przez wiele lat materiał do produkcji herbaty honeybush pozyskiwany był tradycyjnie w okresie kwitnienia roślin, przypadającym na maj lub wrzesień, w zależności od gatunku (Du Toit i wsp., 1998; Schutte-Vlok, 1998). Zwiększone zapotrzebowanie na surowiec spowodowało wydłużenie okresu zbioru przez producentów herbaty (Du Toit i wsp., 1998). Obecnie, w celu zmniejszenia stresu wywieranego na rośliny, materiał pozyskuje się przed kwitnieniem (Joubert i wsp., 2008a).

Zebrany surowiec rozdrabnia się, a następnie poddaje oksydacji (określanej także mianem fermentacji), w celu nadania produktowi charakterystycznego, brązowego zabarwienia oraz słodkiego, miodowego aromatu. W przypadku produkcji herbaty honeybush metodą tradycyjną, świeży materiał formuje się w pryzmy (średnica do 5 m, wysokość ok. 2 m., 1,5-2,5 tony surowca), przykrywane następnie płótnem. W wyniku zachodzących reakcji egzotermicznych temperatura wewnątrz stosu wzrasta do ok. 60°C. Okresowe przetrzucanie stosu (przeciętnie raz na 12 godzin) ma zapewnić odpowiednie napowietrzenie pryzmy oraz równomierną fermentację. Po 3-5 dniach, surowiec umieszcza się na arkuszach płótna i suszy na słońcu (Ryc. 1) (Du Toit i wsp., 1998). Opisany sposób produkcji, pomimo prostoty i niskich kosztów, został obecnie

niemal całkowicie zarzucony (Joubert i wsp., 2008a, 2011). Przyczyną tego były przede wszystkim niewielkie możliwości kontroli procesu, którego przebieg uzależniony był w dużej mierze od warunków pogodowych. Słabe napowietrzenie przyzmy oraz niskie temperatury panujące w jej zewnętrznych warstwach skutkowały uzyskaniem znacznych partii materiału niesfermentowanego, a przez to pozbawionego charakterystycznych cech organoleptycznych (Du Toit i wsp., 1998). Dodatkowy problem stanowił nadmierny wzrost pleśni oraz bakterii, wynikający z długiego okresu fermentacji we względnie niskiej temperaturze. Nadmierna ilość drobnoustrojów powoduje istotne pogorszenie własności organoleptycznych surowca, jak również dyskwalifikuje go pod względem sanitarnym (Du Toit i wsp., 1999). O wadze problemu świadczy przypadek zanieczyszczenia materiału bakteriami *Salmonella*, który znacząco zahamował rozwój przemysłu opartego o herbaty rooibos, pozyskiwanej z *Aspalathus linearis* (N.L.Burm) R.Dahlgr., w latach 80-tych ubiegłego wieku (Du Toit i wsp., 1998).



Ryc. 1. Schemat produkcji herbaty honeybush.

W celu polepszenia jakości produkowanej z miodokrzewów herbaty, zdecydowano się na wprowadzenie kontrolowanych metod fermentacji surowca w podwyższonej temperaturze, z wykorzystaniem pieców. Wykazano, że oksydacja materiału roślinnego w temperaturze 90 °C przez 36 godzin (lub 70 °C przez 60 godzin) zapewnia uzyskanie herbaty o doskonałych własnościach organoleptycznych, wolnej od drobnoustrojów (Ryc. 1). Stwierdzono zarazem, że obecność kwiatów, jakkolwiek pożądana, nie jest niezbędna do powstawania charakterystycznego aromatu surowca (Du Toit i Joubert, 1999; Du Toit i wsp., 1999). Korzystne jest także wstępne zwilżenie materiału roślinnego, zapewniające bardziej równomierną fermentację. Inaktywacja enzymów – peroksydazy i oksydazy polifenolowej, przez gorącą wodę nie wpływa zarazem negatywnie na proces oksydacji, co wskazuje na jego czysto chemiczny, a nie biologiczny charakter (Du Toit i Joubert, 1998a). Przeprowadzone badania wykazały ponadto, że proces suszenia nie wywiera znaczącego wpływu na aromat produkowanej herbaty, a tradycyjne rozkładanie surowca na płachtach brezentu może być z powodzeniem zastąpione przez proces wysokotemperaturowy zachodzący w piecu (Du Toit i Joubert, 1998b). Obecnie fermentację surowca prowadzi się najczęściej w piecach rotacyjnych, a jego suszenie odbywa się na słońcu lub, w czasie niekorzystnych warunków pogodowych, w suszarkach bębnowych (Ryc. 1) (Joubert i wsp., 2008a).

Jakkolwiek najbardziej popularną odmianą herbaty honeybush jest jej wersja fermentowana, w ostatnich latach rośnie popularność naparów przygotowywanych z surowca nie poddanego oksydacji, występującego pod nazwą „green honeybush”. Przyczyną tego jest wyższa zawartość związków polifenolowych w materiale roślinnym, i co za tym idzie, właściwości antyutleniające surowca niefermentowanego (Joubert i wsp., 2008c, 2010). Produkcja wspomnianej herbaty jest prostsza, obejmuje bowiem jedynie suszenie rozdrobnionego surowca roślinnego. Pewien problem stanowi natomiast enzymatyczny rozkład chlorofilu oraz polifenoli podczas ogrzewania, skutkujący nadmiernym brązowieniem liści i nadaniem im wyglądu słabej jakościowo herbaty fermentowanej (Joubert i wsp., 2010). Opisanym powyżej zjawiskom zapobiega traktowanie surowca parą wodną bezpośrednio po rozdrobnieniu, celem dezaktywacji enzymów, a następnie jego szybkie wysuszenie (Ryc. 1). Zachowaniu zielonej barwy sprzyja również przechowywanie gotowego produktu w obniżonej temperaturze (Joubert i wsp., 2010).

W porównaniu do bardziej popularnego rooibos, przemysł związany z produkcją herbaty honeybush jest stosunkowo niewielki (poniżej 300 ton surowca rocznie), począwszy od lat 90-tych ubiegłego wieku został on jednak znacząco unowocześniony. W efekcie, uzyskiwany produkt roślinny stanowi w przeważającej mierze towar eksportowy, trafiający na rynki europejskie, azjatyckie oraz do Stanów Zjednoczonych (Joubert i wsp., 2008a, 2011).

I.1.4. Zastosowanie

Rośliny z rodzaju *Cyclopia* były wykorzystywane od dawna w celach leczniczych przez miejscową ludność. Szereg tradycyjnych zastosowań przetrwało do dziś, doniesienia o ich skuteczności mają jednak charakter anegdotyczny i nie odnoszą

się z reguły do konkretnego gatunku miodokrzewów. Wśród działań leczniczych niniejszych roślin wymienia się między innymi pobudzanie apetytu, działanie wykrztuśne, spazmolityczne, stymulację laktacji u kobiet karmiących, łagodzenie bólów artretycznych i usuwanie dolegliwości skórnych (Du Toit i wsp., 1998; Joubert i wsp., 2008a). Jakkolwiek ekstrakty z miodokrzewów w dalszym ciągu znajdują zastosowanie w medycynie ludowej, obecnie są one wykorzystywane przede wszystkim w charakterze napoju do użytku codziennego. Brak kofeiny i niska zawartość garbników sprawiają, że herbata honeybush może być stosowana u dzieci, jak również pacjentów z problemami sercowo-naczyniowymi bądź zaburzeniami trawienia. Tradycyjnie, napary podawane są na gorąco, często z dodatkiem mleka i cukru, bądź po ochłodzeniu w połączeniu z sokami lub owocami (Du Toit i wsp., 1998). Wyciąg przygotowuje się najczęściej poprzez zalanie porcji surowca gorącą wodą i zaparzenie przez ok. 10 min. W przypadku użycia większej ilości surowca stosuje się niekiedy zaparzenie wielokrotne. Uzyskany wyciąg można przechowywać przez kilka dni, jednak powinien być on wówczas utrzymywany w podwyższonej temperaturze, w celu zachowania aromatu. Innym sposobem przygotowania herbaty honeybush jest gotowanie 4-6 g surowca przez 10-15 minut (Du Toit i wsp., 1998). Ze względu na niepraktyczność, opisane wyżej sposoby zaparzania nie są już praktycznie wykorzystywane we współczesnych gospodarstwach domowych, napar przygotowuje się natomiast podobnie jak w przypadku herbaty czarnej, *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, poprzez zalanie małej ilości surowca (często w formie torebkowanej) gorącą wodą. Dostępne są również mieszanki herbaty honeybush z rooibos, a także innymi afrykańskimi roślinami (Joubert i wsp., 2008a).

I.1.5. Skład chemiczny

Podstawową grupą metabolitów wtórnych obecnych w ziele roślin z rodzaju *Cyclopia* są polifenole. Całkowita zawartość niniejszych związków w omawianych surowcach jest jednak niższa w porównaniu z herbatami czarną i zieloną (*C. sinensis*), a także rooibos (*A. linearis*) (Joubert i wsp., 2008c). Stosunkowo niski jest również udział garbników, stanowiących 16-30% polifenoli w fermentowanym materiale *Cyclopia maculata* (Andrews) Kies (Du Toit i Joubert, 1998a). Do podstawowych składników o charakterze polifenolowym należą ksantony i flawanony, których obecność w miodokrzewach stwierdzono w latach 90-tych ubiegłego wieku. Analizy materiału gruntowego szeregu gatunków z rodzaju *Cyclopia* wykazały, że podstawowymi składnikami o charakterze fenolowym są w ich przypadku mangiferyna (ksanton) oraz bliżej nieokreślony *O*-glikozyd hesperetyny (flawanon) (De Nysschen i wsp., 1996). W dalszych badaniach nad składem chemicznym omawianych roślin koncentrowano się na gatunkach o znaczeniu komercyjnym, tj. *C. intermedia*, *C. subternata*, *C. genistoides* i *C. sessiliflora* (Joubert i wsp., 2008a). Potwierdziły one, że dominującymi składnikami polifenolowymi miodokrzewów są ksantony: mangiferyna i izomangiferyna, a także flawanon hesperydyna. Oprócz wymienionych połączeń, w ziele wspomnianych gatunków zidentyfikowano szereg związków o charakterze flawanonów, flawonów, flawonoli, izoflawonów, flawanów i kumestanów (Tab. 2). Tożsamość poszczególnych

polifenoli określona została metodami spektroskopowymi, takimi jak: NMR (Ferreira i wsp., 1998; Kamara i wsp., 2003, 2004), bądź przy użyciu technik LC-MS (Joubert i wsp., 2008c; De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010).

Tab. 2. Związki polifenolowe obecne w wybranych gatunkach roślin z rodzaju *Cyclopia*.

Związek	Występowanie*
<i>Ksantony</i>	
Mangiferyna	<i>C. int.</i> ^{abcdefg} , <i>C. sub.</i> ^{defghij} , <i>C. gen.</i> ^{acdefgklm} , <i>C. sess.</i> ^{acdfg}
Izomangiferyna	<i>C. int.</i> ^{bcef} , <i>C. sub.</i> ^{defij} , <i>C. gen.</i> ^{cdefjm} , <i>C. sess.</i> ^{cdf}
<i>Flawanony</i>	
Hesperetyna (3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanon)	<i>C. int.</i> ^{bdg} , <i>C. gen.</i> ^g
Hesperydyna (7- <i>O</i> -rutynozyd hesperetyny)	<i>C. int.</i> ^{bcdefg} , <i>C. sub.</i> ^{defghij} , <i>C. gen.</i> ^{cdefgikm} , <i>C. sess.</i> ^{cdefg}
Eriodykcjol (3',4',5,7-tetrahydroksyflawanon)	<i>C. int.</i> ^b
Eriocytryna (7- <i>O</i> -rutynozyd eriodykcjolu)	<i>C. int.</i> ^{def} , <i>C. sub.</i> ^{defghij} , <i>C. gen.</i> ^{gj} , <i>C. sess.</i> ^{dfg}
5- <i>O</i> -glukozyd eriodykcjolu	<i>C. int.</i> ⁿ
7- <i>O</i> -glukozyd eriodykcjolu	<i>C. int.</i> ⁿ
Naryngenina (4',5,7-trihydroksyflawanon)	<i>C. int.</i> ^b
Prunina (7- <i>O</i> -glukozyd naryngeniny)	<i>C. int.</i> ⁿ
Narirutyna (7- <i>O</i> -rutynozyd naryngeniny)	<i>C. int.</i> ^{dg} , <i>C. sub.</i> ^{dhg} , <i>C. gen.</i> ^d , <i>C. sess.</i> ^{dg}
5- <i>O</i> -rutynozyd naryngeniny	<i>C. int.</i> ⁿ
Butyna (3',4',7-trihydroksyflawanon)	<i>C. int.</i> ^o , <i>C. sub.</i> ^o , <i>C. sess.</i> ^o
7- <i>O</i> -glukozyd izosakuranetyny (7- <i>O</i> -glukozyd 5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu)	<i>C. int.</i> ^a , <i>C. gen.</i> ^a
<i>Flawony</i>	
Luteolina (3',4',5,7-tetrahydroksyflawon)	<i>C. int.</i> ^b , <i>C. sub.</i> ^{dhij} , <i>C. gen.</i> ^{djm} , <i>C. sess.</i> ^d
Skolimozyd (7- <i>O</i> -rutynozyd luteoliny)	<i>C. sub.</i> ^{hi}
5-deoksyluteolina	<i>C. sub.</i> ^h
Diosmetyna (3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawon)	<i>C. int.</i> ⁿ
wicenina-2 (6,8-di- <i>C</i> -glukozyd apigeniny)	<i>C. int.</i> ^o , <i>C. sub.</i> ^o , <i>C. sess.</i> ^o
<i>Flawonole</i>	
5- <i>O</i> -glukozyd kemferolu	<i>C. int.</i> ⁿ
6- <i>C</i> -glukozyd kemferolu	<i>C. sub.</i> ^h
8- <i>C</i> -glukozyd kemferolu	<i>C. int.</i> ⁿ
3- <i>O</i> ,6- <i>C</i> -diglukozyd kemferolu	<i>C. int.</i> ⁿ
3-Hydroksy-6-[<i>O</i> - α -apiofuranozylo-(1'' \rightarrow 6'')- β -D-glukopiranozyloksy]-3',4'-metylenodioksyflawonol	<i>C. int.</i> ^m

Tab. 2. Związki polifenolowe obecne w wybranych gatunkach roślin z rodzaju *Cyclopia* – kontynuacja.

Związek	Występowanie*
<i>Flawan-3-ole</i>	
3- <i>O</i> -galusan (-)-epigalokatechiny	<i>C. sub.</i> ^h
<i>Flawany</i>	
5- <i>O</i> -glukozyd 3',4',5,7-tetrahydroksyflawanu	<i>C. sub.</i> ^h
<i>Izoflawony</i>	
Formononetyna (7-hydroksy-4'-metoksyizoflawon)	<i>C. int.</i> ^b
7-[<i>O</i> - α -apiofuranozylo-(1'' \rightarrow 6'')- β -D-glukopiranozyloksy]-4'-metoksyizoflawon (7- <i>O</i> -diglikozyd formononetyny)	<i>C. int.</i> ⁿ
3'-Hydroksydaidzeina (3',4',7-trihydroksyizoflawon)	<i>C. int.</i> ^o , <i>C. sub.</i> ^o , <i>C. sess.</i> ^o
Orobol (3',4',5,7-tetrahydroksyizoflawon)	<i>C. sub.</i> ^h
Afformozyna (4',6-dimetoksy-7-hydroksyizoflawon)	<i>C. int.</i> ^b
Wistyna (7- <i>O</i> -glukozyd afformozyny)	<i>C. int.</i> ⁿ
Kalikozyina (3',7-dihydroksy-4'-metoksyizoflawon)	<i>C. int.</i> ^b
Pseudobaptygenina (7-hydroksy-3',4'-metylenodioksyizoflawon)	<i>C. int.</i> ^b
Fudzikinetyna (7-hydroksy-6-metoksy-3',4'-metylenodioksyizoflawon)	<i>C. int.</i> ^b
<i>Kumestany</i>	
Medikagol	<i>C. int.</i> ^b
Flemichapparyna	<i>C. int.</i> ^b
Soforakumestan B	<i>C. int.</i> ^b

* *C. int.*, *C. intermedia*
C. sub., *C. subternata*
C. gen., *C. genistoides*
C. sess., *C. sessiliflora*

^a De Nysschen i wsp. (1996)

^b Ferreira i wsp. (1998)

^c Joubert i wsp. (2003)

^d Joubert i wsp. (2008c)

^e Kokotkiewicz i wsp. (2009)

^f De Beer and Joubert (2010)

^g Verhoog i wsp. (2007a)

^h Kamara i wsp. (2004)

^l De Beer i wsp. (2009)

^j Mfenyana i wsp. (2008)

^k Joubert i wsp. (2006)

^l Joubert i wsp. (2008c)

^m Verhoog i wsp. (2007b)

ⁿ Kamara i wsp. (2003)

^o De Nysschen i wsp. (1998)

Przeprowadzone analizy fitochemiczne wykazały istnienie wyraźnych różnic w składzie jakościowym i ilościowym frakcji polifenolowych dla poszczególnych gatunków miodorzewów. Najwyższą zawartość mangiferyny (2900-5900 mg/100 g DW) oraz izomangiferyny (540-1370 mg/100 g DW) odnotowano w przypadku *C. genistoides*, gatunek *C. intermedia* charakteryzuje się natomiast znaczną zawartością hesperydyny (1660-1760 mg/100 g DW) (Joubert i wsp., 2003). Związkami charakterystycznymi dla *C. subternata*, obecnymi w stężeniu do ok. 500 mg/100 g DW, są flawanon eriocytryna oraz jej flawonowy analog – skolimozyd (Joubert i wsp., 2010). Różnice w zawartości polifenoli odnotowano ponadto w obrębie tego samego gatunku. Wykazano na przykład, że *C. genistoides* odmiany Overberg zawiera więcej

mangiferyny, podczas gdy dominującym składnikiem roślin odmiany West Coast jest hesperydyna. Wyraźny wpływ na zawartość mangiferyny miał również czas zbioru (spadek stężenia od 5940 do 5210 mg/100 g DW w okresie od marca do czerwca) (Joubert i wsp., 2003).

Fermentacja surowca warunkuje znaczące obniżenie stężenia polifenoli. Wykazano, że proces 60-godzinnej oksydacji w temperaturze 70 °C spowodował odpowiednio 13-17 i 23% spadek całkowitej zawartości polifenoli w materiale *C. intermedia* i *C. maculata* (Du Toit i Joubert, 1998a, 1999). W innym badaniu stwierdzono ponadto, że zmniejszenie stężenia związków polifenolowych na skutek fermentacji jest najslabiej zaznaczone w przypadku gatunku *C. genistoides* (77 % pierwotnej zawartości), silniej natomiast w *C. subternata*, *C. sessiliflora* i *C. intermedia* (< 60% ilości początkowej) (Joubert i wsp., 2008c). W czasie produkcji „zielonej” herbaty honeybush, nie poddawanej procesowi fermentacji, spadek zawartości polifenoli ma głównie podłoże enzymatyczne i wywołany jest przede wszystkim rozdrabnianiem i suszeniem surowca. W celu zapobieżenia wspomnianemu zjawisku, rośliny poddaje się przed suszeniem działaniu pary wodnej (Joubert i wsp., 2010).

Rośliny z rodzaju *Cyclopia* nie zawierają występujących w wielu gatunkach z rodziny Fabaceae alkaloidów chinolizydynowych, a także kofeiny (De Nysschen i wsp., 1998; Joubert i wsp., 2008a). Oprócz opisanych wcześniej składników o charakterze polifenolowym, części nadziemne miodokrzewów charakteryzują się obecnością pochodnych tyrozolu i benzaldehydu, kwasów organicznych oraz alkoholu cukrowego – pinitolu (Tab. 3). W ziele *C. genistoides* zidentyfikowano ponadto szereg połączeń lotnych, przy czym dominującym składnikiem surowca niefermentowanego był 6-metylo-5-hepten-2-on, fermentowanego zaś linalol (Tab. 3) (Le Roux i wsp., 2008). Herbata honeybush zawiera pewne ilości makro- i mikroelementów, nie stanowi jednak szczególnie bogatego źródła substancji nieorganicznych. W porównaniu z herbatami czarną i zieloną, stężenia poszczególnych minerałów w wyciągach wodnych są stosunkowo niewielkie, z wyjątkiem wapnia (8,5–14,8 mg l⁻¹), żelaza (0,06–0,09 mg l⁻¹) i magnezu (10,8–15,8 mg l⁻¹) (Malik i wsp., 2008). Zawartość fluoru w naparach jest niska (0,03–0,09 mg/l), jakkolwiek w niektórych badaniach odnotowywano również wyższe jego stężenia (0,59 mg/l) (Joubert i wsp., 2008a; Malinowska i wsp., 2008).

Poza określeniem składu chemicznego poszczególnych gatunków miodokrzewów, prowadzone badania fitochemiczne miały na celu opracowanie szybkich i dokładnych metod analitycznych, służących kontroli jakości surowca przeznaczonego do celów konsumpcyjnych. Wykazano, że metoda spektrofotometryczna z użyciem chlorku glinu może być wykorzystana do oznaczania zawartości mangiferyny w niefermentowanym materiale *C. genistoides* (Joubert i wsp., 2008b). Spośród innych metod spektroskopowych na uwagę zasługuje spektroskopia bliskiej podczerwieni (NIRS), znajdująca zastosowanie do oceny zawartości mangiferyny i hesperydyny w surowcu pozyskanym z wymienionego wcześniej gatunku. Technika NIRS jest szczególnie użyteczna w przypadku analiz skryningowych partii materiału o wysokiej zawartości wspomnianych połączeń. Do jej zalet należy brak konieczności przygotowywania ekstraktu, a więc możliwość szybkiego przeanalizowania dużej ilości próbek (Joubert i wsp., 2006, 2008a).

Tab. 3. Inne metabolity wtórne obecne w roślinach z rodzaju *Cyclopia*.

Związek	Występowanie
<i>Kwasy organiczne</i>	
Kwas p-kumarowy (kwas 4-hydroksycynamonowy)	<i>C. int.^a, C. sub.^b</i>
Kwas (±)-szikimowy	<i>C. sub.^b</i>
<i>Pochodne benzaldehydu</i>	
4-[<i>O</i> - α -apiofuranozylo-(1'' \rightarrow 2')- β -D-glukopiranozyloksy]benzaldehyd	<i>C. int.^c</i>
<i>Pochodne alkoholu fenetylowego</i>	
Tyrozol (alkohol p-hydroksyfenetylowy)	<i>C. int.^c</i>
2-{4-[<i>O</i> - α -apiofuranozylo-(1'' \rightarrow 6')- β -D-glukopiranozyloksy]fenylo}etanol (diglikozyd tyrozolu)	<i>C. int.^c</i>
4-glukozylotyrozol	<i>C. sub.^b</i>
<i>Składniki lotne</i>	
6-metylo-5-hepten-2-on	<i>C. gen.^d</i>
Linalol	<i>C. gen.^d</i>
α -terpineol	<i>C. gen.^d</i>
Geraniol	<i>C. gen.^d</i>
Nerol	<i>C. gen.^d</i>
Limonen	<i>C. gen.^d</i>
Heksanal	<i>C. gen.^d</i>
<i>Alkohole cukrowe</i>	
(+)-Pinitol	<i>C. int.^a, C. sub.^b</i>

^a Ferreira i wsp. (1998)^c Kamara i wsp. (2003)^b Kamara i wsp. (2004)^d Le Roux i wsp. (2008)

Wewnątrz- i międzygatunkowe różnice w składzie jakościowym miodokrzewów sprawiają, że wymienione metody spektroskopowe są przydatne jedynie do przeprowadzenia analiz szacunkowych. Dokładne oznaczenie zawartości poszczególnych składników zespołu polifenolowego jest możliwe z użyciem metod chromatograficznych LC-DAD i LC-MS (Joubert i wsp., 2008a; De Beer i Joubert, 2010).

1.1.6. Własności antyoksydacyjne i aktywność biologiczna

Obok rooibos, honeybush należy obecnie do grupy najintensywniej badanych, pod względem działania farmakologicznego, surowców pochodzenia południowoafrykańskiego (McKay i Blumberg, 2007; Joubert i wsp., 2008a). Wysoka zawartość połączeń polifenolowych w roślinach z rodzaju *Cyclopia* wiąże się z

wyraźnie zaznaczonymi własnościami antyoksydacyjnymi i biologicznymi przygotowywanych z nich wyciągów. W niniejszym podrozdziale zawarto opis przeprowadzonych do tej pory doświadczeń z zakresu aktywności ekstraktów uzyskiwanych z miodokrzewów. Wyniki wspomnianych badań, wraz z opisami zastosowanych modeli doświadczalnych, zawarto w tabeli 4.

Aktywność antyutleniającą ekstraktów z miodokrzewów wykazano w szeregu badaniach, przy czym w większości wypadków była ona niższa w porównaniu do herbaty zielonej, czarnej oraz rooibos. Efekty antyoksydacyjne badano z wykorzystaniem różnych modeli eksperymentalnych, zwłaszcza testów zmiatania wolnych rodników ABTS – 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian), DPPH – 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl, rodników hydroksylowych, jonów nadtlennokowych, jak również utleniania kwasu linolowego (Du Toit i wsp., 2001; Lindsey i wsp. 2002; Steenkamp i wsp., 2004; Ivanova i wsp., 2005). Rezultaty wymienionych doświadczeń nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących siły działania antyutleniającego wyciągów z miodokrzewów względem innych herbat, jako że w wielu przypadkach niedostępne były informacje dotyczące rodzaju surowca, jego składu chemicznego oraz gatunku (Tab. 4). Najobszerniejsze badanie porównawcze przeprowadzone zostało z wykorzystaniem niefermentowanego oraz fermentowanego materiału pozyskiwanego z gatunków *Cyclopia* istotnych z komercyjnego punktu widzenia, jak również herbaty czarnej, zielonej oraz rooibos (Joubert i wsp., 2008c). W większości przeprowadzonych testów, najsilniejszym działaniem antyutleniającym charakteryzowały się wyciągi z herbaty zielonej i niefermentowanego rooibos, jakkolwiek aktywność wybranych ekstraktów z *Cyclopia* spp. była porównywalna. W badaniu FRAP (zdolność antyoksydacyjna osocza, ang. *ferric reducing ability of plasma*), wyciąg z niefermentowanego surowca *C. genistoides* wykazywał działanie porównywalne, a z *C. intermedia* silniejsze niż herbaty rooibos (fermentowana), czarna i ulung. Aktywność ekstraktów z części nadziemnych *C. subternata* i *C. sessiliflora* była z kolei zbliżona do herbaty czarnej. W teście peroksydacji lipidów, niefermentowany materiał z *C. sessiliflora* wykazywał działanie hamujące podobne do fermentowanego rooibos. W większości zastosowanych modeli eksperymentalnych, herbaty fermentowane cechowała niższa aktywność antyoksydacyjna od tzw. herbat „zielonych”. Ze względu na różnice, w składzie chemicznym i całkowitej zawartości polifenoli, obserwowane pomiędzy poszczególnymi gatunkami miodokrzewów, a także między surowcami niefermentowanymi i poddanymi oksydacji, trudno jednoznacznie określić, która z badanych roślin charakteryzuje się najwyższym potencjałem antyoksydacyjnym (Joubert i wsp., 2008a, c). Aktywność antyoksydacyjna herbaty honeybush wynika w dużej mierze z obecności mangiferyny, będącej jednym z najsilniejszych antyutleniaczy występujących w roślinach z rodzaju *Cyclopia* (Joubert i wsp., 2008a, 2009).

Wyniki badań *in vitro* mogą być znacząco odmienne od działania antyoksydacyjnego polifenoli obserwowanego w warunkach *in vivo* (Espín i wsp., 2007; Joubert i wsp., 2009). Eksperymenty z użyciem zwierząt wykazały, że mangiferyna słabo wchłania się z przewodu pokarmowego, podlegając zarazem rozkładowi bakteryjnemu do noratyriolu (1,3,6,7-tetrahydroksyksanton), a w dalszej

kolejności do kwasów fenolowych (Bock i wsp., 2008; Joubert i wsp., 2009; Bock i Ternes, 2010). W osoczu zwierząt karmionych wyciągami z *C. genistoides* nie stwierdzono mangiferyny, obecne były natomiast jej metabolity, w tym właśnie noratyriol (Bock i wsp., 2008). Wyniki wspomnianych eksperymentów należałoby uwzględnić w planowaniu dalszych badań aktywności biologicznej miodokrzewów, a także poszczególnych związków polifenolowych charakterystycznych dla roślin z rodzaju *Cyclopia*, w warunkach *in vivo*.

Oprócz aktywności antyoksydacyjnej, dobrze poznanym aspektem działania roślin z rodzaju *Cyclopia* są wywierane przez nie, w warunkach *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*, efekty antymutagenne. W teście porównawczym z użyciem bakterii *Salmonella typhimurium* (test Ames), wyciągi z *C. intermedia* wykazywały silniejsze działanie przeciwko mutagenom wymagającym aktywacji metabolicznej, tj. 2-acetyloaminofluorenowi (2-AAF) i aflatoksynie B₁ (AFB₁), niż przeciw mutagenom działającym bezpośrednio, takim jak metanosulfonian metylu (MMS), nadtlenuk wodoru i wodoronadtlenek kumylu (CHP). Oznaczona w omawianym badaniu aktywność antymutagenna przeciwko 2-AAF była silniejsza niż w przypadku herbaty rooibos, przeciwko AFB₁ zaś zbliżona do wspomnianego surowca (Marnewick i wsp., 2000). Rozszerzone badanie z użyciem testu Ames wykazało, że aktywność niefermentowanej herbaty *C. intermedia* i *C. subternata* przeciwko AFB₁ jest zbliżona do fermentowanej rooibos. Podobną siłą działania antymutagennego względem 2-AAF charakteryzowała się fermentowana herbata rooibos oraz niefermentowane surowce *C. intermedia* i *C. sessiliflora*. Najniższą aktywność antymutagenną przeciwko 2-AAF i AFB₁ odnotowano natomiast w przypadku fermentowanych części nadziemnych *C. intermedia* (Van der Merwe i wsp., 2006). Eksperymenty *ex vivo* z wykorzystaniem frakcji cytozolowych i mikrosomalnych wątrób szczurów karmionych wyciągami z *C. intermedia* wykazały zdolność ekstraktów do hamowania mutageny wywołanej przez AFB₁ i 2-AAF. Działanie antymutagenne frakcji cytozolowych względem obydwu wymienionych substancji zaobserwowano w przypadku surowca niefermentowanego, zaś frakcje pozyskane ze zwierząt karmionych materiałem fermentowanym wykazywały efekt hamujący jedynie w przypadku AFB₁. Frakcje mikrosomalne pochodzące zarówno od szczurów karmionych wyciągami z surowca fermentowanego, jak i nie poddanego oksydacji, wywierały efekt antymutageny jedynie w przypadku AFB₁ (Marnewick i wsp., 2004). Badania *in vivo* wykazały z kolei, że wątroby szczurów karmionych ekstraktami z miodokrzewów charakteryzowały się podwyższonym poziomem glutationu (GSH) oraz zwiększonym współczynnikiem GSH:GSSG (stosunek stężenia glutationu do disiarczku glutationu) w odniesieniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono ponadto wzrost aktywności S-transferazy glutationowej alfa (GST- α) oraz UDP-glukuronozylotransferazy. Obserwowane efekty mogą być w pewnym stopniu odpowiedzialne za opisaną wcześniej aktywność antymutagenną, możliwe jest jednak, że wynika ona także z bezpośrednich interakcji pomiędzy mutagenem a składnikami badanych wyciągów (Marnewick i wsp., 2003).

Tab. 4. Dotychczasowe badania aktywności biologicznej, przeciwdrobnoustrojowej i antyoksydacyjnej wyciągów *Cyclopia* sp. oraz przemian metabolicznych związków polifenolowych obecnych w miodokrzewach.

Badane zjawisko	Badane gatunki ^a	Materiał roślinny ^b	Rodzaj ekstraktu ^c	Model eksperymentalny ^d	Wyniki eksperymentu ^e	Literatura
aktywność antymutagenna	<i>C. int.</i>	NF, F	wodny	<i>in vitro</i> ; test Ames (szczypty <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100 i TA102)	zaznaczona aktywność przeciwko mutagenom wymagającym aktywacji metabolicznej (2-AAF lub AFB ₁ w obecności frakcji S9 homogenatu wątroby szczura); słaba aktywność wobec mutagenów działających bezpośrednio (MMS, CHP i H ₂ O ₂)	Mamewick i wsp. (2000)
	<i>C. int.</i> <i>C. sub.</i> <i>C. sess.</i> <i>C. gen.</i>	NF, F	wodny	<i>in vitro</i> ; test Ames (szczypty <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100 i TA102)	zaznaczona aktywność wyciągów <i>C. int.</i> , <i>C. sub.</i> i <i>C. sess.</i> przeciwko mutagenom wymagającym aktywacji metabolicznej (2-AAF lub AFB ₁ w obecności frakcji S9 homogenatu wątroby szczura); wzmocnienie działania mutagennego 2-AAF w obecności wyciągu z niefermentowanego surowca <i>C. gen.</i>	Van der Merwe i wsp. (2006)
	<i>C. int.</i>	NF, F	wodny	<i>ex vivo</i> ; test Ames z użyciem subkomórkowych frakcji wątrobowych samców szczurów Fischer karmionych ekstraktami <i>Cyclopia</i> przez 10 tygodni	hamujący efekt frakcji cytozolowych przeciwko 2-AAF i AFB ₁ ; osłabienie działania AFB ₁ i zwiększenie aktywności mutagennej 2-AAF przez frakcje mikrosomalne	Mamewick i wsp. (2004)
aktywność antymutagenna i antyoksydacyjna, wpływ na aktywność enzymów wątrobowych	<i>C. int.</i>	NF, F	wodny	<i>in vivo</i> ; samce szczurów Fischer poddane działaniu DEN (inicjacja), a następnie karmione FB ₁ przez 21 dni, począwszy od 3 tygodnia po podaniu DEN, w celu spowodowania uszkodzenia wątroby	nieznaczne zmniejszenie ilości patologicznych zmian w wątrobach zwierząt karmionych ekstraktami <i>Cyclopia</i> począwszy od 1 tygodnia po podaniu DEN do końca trwania eksperymentu; przeciwdziałanie zmniejszeniu aktywności CAT i zwiększeniu stosunku GSH:GSSG, wywołanemu przez podanie DEN/FB ₁ ; zmniejszenie poziomu peroksydacji lipidów (test TBARS) w grupie zwierząt karmionych wyciągami z <i>Cyclopia</i>	Mamewick i wsp. (2009)
aktywność antyoksydacyjna, wpływ na aktywność enzymów wątrobowych	<i>C. int.</i>	NF, F	wodny	<i>in vivo</i> ; samce szczurów Fischer karmione wyciągami <i>Cyclopia</i> przez 10 tygodni	zmniejszenie stężenia GSSH i zwiększenie ilości GSH w wątrobach szczurów; zwiększenie stosunku GSH:GSSH; zwiększenie aktywności cytoplazmatycznej GST- α (obydwą rodzaże surowca); zwiększenie aktywności UDP-GT (surowiec niefermentowany); niezmienione osoczowe poziomy całkowitej i związanej bilirubiny, kreatyniny, cholesterolu całkowitego, białka całkowitego oraz żelaza całkowitego; niezmieniona aktywność ALAT, AspAT i ALKP	Mamewick i wsp. (2003)

Tab. 4. Dotychczasowe badania aktywności biologicznej, przeciwdrobnoustrojowej i antyoksydacyjnej wyciągów *Cyclopia* sp. oraz przemian metabolicznych związków polifenolowych obecnych w miodokrzewach – kontynuacja.

Badane zjawisko	Badane gatunki ^a	Materiał roślinny ^b	Rodzaj ekstraktu ^c	Model eksperymentalny ^d	Wyniki eksperymentu ^e	Literatura
aktywność fitoestrogenna	<i>C. int.</i> <i>C. sub.</i> <i>C. sess.</i> <i>C. gen.</i>	NF, F	wodny, MeOH	<i>in vitro</i> ; komórki COS-1 przejściowo transfekowane receptorami ER α lub ER β	zaznaczona aktywność fitoestrogenna (głównie w stosunku do receptorów ER β) wyciągów z <i>C. genisioioides</i> i <i>C. subternata</i> ; większa aktywność odnotowana w przypadku wyciągów metanolowych z niefermentowanego materiału; duże zróżnicowanie wyciągów z <i>C. genisioioides</i> pod względem siły działania estrogennego; słaba aktywność estrogenna ekstraktów z <i>C. intermedia</i> i <i>C. sessiliflora</i> ; brak działania estrogennego w przypadku mangiferyny i hesperydyny	Verhoog i wsp. (2007a)
aktywność fitoestrogenna	<i>C. gen.</i>	NF	MeOH	<i>in vitro</i> ; komórki COS-1 przejściowo transfekowane receptorami ER α lub ER β	transaktywacja promotorów genów zawierających ERE tylko za pośrednictwem receptorów ER β (komórki COS-1); zwiększenie proliferacji komórek raka piersi linii MCF-7-BUS wrażliwej na estrogeny pod wpływem wyciągów z <i>Cyclopia</i> i zawartych w nich polifenoli; indukcja proliferacji komórek linii MDA-MB-231 niewrażliwej na estrogeny pod wpływem wyciągów z <i>Cyclopia</i> ; zahamowanie proliferacji komórek MCF-7-BUS, wywołanej estradiolem, przez wyciągi z <i>Cyclopia</i> ; duże zróżnicowanie wyciągów z <i>C. genisioioides</i> pod względem siły działania estrogennego	Verhoog i wsp. (2007b)
aktywność fitoestrogenna	<i>C. gen.</i> <i>C. sub.</i>	NF	wodny, MeOH, wyciągi sekwencyjne i niesekwencyjne (OE, EtOH, MeOH, 50% MeOH, woda)	<i>in vitro</i> ; komórki MCF-7-BUS (test aktywności estrogenna stwierdzona dla jednego wyciągu metanolowego z <i>C. genisioioides</i> i jednego z <i>C. subternata</i> (wszystkie testy); duże zróżnicowanie wyciągów z <i>C. subternata</i> pod względem siły działania estrogennego; największa siła działania ERE (test promoter-reporter), komórki Ishikawa Var-1 (test fosfatazy alkalicznej)	porównywalna z preparatami komercyjnymi o działaniu estrogennym) stwierdzona dla sekwencyjnych wyciągów metanolowych i octanowych z <i>C. subternata</i> ; znacząca aktywność estrogenna stwierdzona dla wyciągów wodnych (testy <i>E-screen</i> i fosfatazy alkalicznej)	Mfienyana i wsp. (2008)
aktywność fotoprotekcyjna	<i>C. int.</i>	NF, F	frakcje wyciągów EtOH rozp. w EtOH/DMK	<i>in vivo</i> ; samice myszy SKH-1 poddane działaniu promieniowania UVB	zmniejszone objawy oparzenia słonecznego i obrzęk, niższa aktywność enzymów (CAT, dysmutaza nadlenkowa, COX-2 i ODC) oraz zmniejszona peroksydacja lipidów w grupie zwierząt poddanych miejscowemu działaniu wyciągów z <i>Cyclopia</i> , przed naswietleniem promieniowaniem UVB (codziennie przez 10 dni); mniejsza aktywność fotoprotekcyjna odnotowana w przypadku czystej mangiferyny i hesperydyny	Petrova i wsp. (2011)

Tab. 4. Dotychczasowe badania aktywności biologicznej, przeciwdrobnoustrojowej i antyoksydacyjnej wyciągów *Cyclopia* sp. oraz przemian metabolicznych związków polifenolowych obecnych w miodokrzewach – kontynuacja.

Badane zjawisko	Badane gatunki ^a	Materiał roślinny ^b	Rodzaj ekstraktu ^c	Model eksperymentalny ^d	Wyniki eksperymentu ^e	Literatura
aktywność przeciwnowotworowa	<i>C. int.</i>	NF, F	frakcje wyciągów <i>in vivo</i> ; MeOH rozp. w EtOH/DMK	myszki poddane działaniu DMBA, po uprzedniej aplikacji TPA, w celu wywołania nowotworów skóry	zahamowanie wzrostu guzów (o 90 i 84 % odpowiednio dla surowca i wsp. okresie pomiędzy inicjacją nowotworzenia (DMBA) i podaniem promotora (TPA).	Mamewick (2005)
	<i>C. int.</i>	NF, F	wodny	<i>in vivo</i> ; samec szczurów poddane działaniu MBN, w celu wywołania brodawczaków przełyku	Fischer zmniejszenie ilości guzów (o 45,5 %) oraz ich wielkości (o 94 %) w wyniku karmienia zwierząt wyciągiem z niefermentowanego surowca przez 25 tygodni, począwszy od 7 dnia po aplikacji MBN; słabsze efekty odnotowane w przypadku surowca fermentowanego; wyraźna korelacja pomiędzy zmniejszoną ilością guzów nowotworowych a zwiększoną zawartością flawonoli/flawonów/ksantonów w podawanym ekstrakcie	Sissing i wsp. (2011)
aktywność przeciwdrobnoustrojowa	<i>C. sub.</i> <i>C. gen.</i>	NF	wodny	<i>in vitro</i> ; <i>Escherichia coli</i> (szczep DH50), <i>Botrytis cinerea</i> (szczep STEU 6253)	efekt bakteriostatyczny przeciwko <i>E. coli</i> , słabnący po 48h (wyciągi z <i>C. subternata</i> i <i>C. genistoides</i>); stymulacja wzrostu <i>B. cinerea</i> przez wyciąg z <i>C. subternata</i> (10 mg ml ⁻¹); osłabione kiełkowanie spor <i>B. cinerea</i> w obecności wyciągu z <i>C. genistoides</i> (100 mg ml ⁻¹)	Coetzee i wsp. (2008)
aktywność antyoksydacyjna	<i>C. int.</i> <i>C. sub.</i> <i>C. sess.</i> <i>C. gen.</i>	NF, F	wodny	testy ABTS, FRAP, lipidów mikrosomalnych	hamowanie peroksydacji lipidów, wywołanej jonami Fe ²⁺ , o 24-42 %, w zależności od gatunku i rodzaju surowca; wyższy potencjał antyoksydacyjny herbat niefermentowanych (z wyjątkiem <i>C. genistoides</i> w teście peroksydacji lipidów mikrosomalnych); aktywność antyoksydacyjna wyciągów z <i>Cyclopia</i> zbliżona lub niższa od stwierdzonej dla herbat rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>) oraz czarnej i zielonej (<i>Camellia sinensis</i>)	Joubert i wsp. (2008c)
	<i>C. int.</i>	F	wodny	testy zmiatania rodników nadtlennokowych i hydroksylowych	aktywność antyoksydacyjna wyciągów z <i>Cyclopia</i> wyższa od ketmii (<i>Hibiscus sabdariffa</i>), niższa od herbaty rooibos	Steenkamp i wsp. (2004)
	<i>C. int.</i>	NO	wodny	test ABTS	aktywność antyoksydacyjna wyciągów z <i>Cyclopia</i> niższa od herbaty rooibos	Ivanova i wsp. (2005)

Tab. 4. Dotychczasowe badania aktywności biologicznej, przeciwdrobnoustrojowej i antyoksydacyjnej wyciągów *Cyclopia* sp. oraz przemian metabolicznych związków polifenolowych obecnych w miodokrzewach – kontynuacja.

Badane zjawisko	Badane gatunki ^a	Materiał roślinny ^b	Rodzaj ekstraktu ^c	Model eksperymentalny ^d	Wyniki eksperymentu ^e	Literatura
aktywność antyoksydacyjna	NO	NO	wodny	test DPPH	aktywność antyoksydacyjna wyciągów z <i>Cyclopia</i> znacząco niższa od herbaty rooibos	Du Toit i wsp. (2001)
	NO	NO	wodny, EtOH, heksanowy	test oksydacji kwasu linolowego	aktywność antyoksydacyjna wyciągów wodnych z <i>Cyclopia</i> niższa od rooibos, ketmii i zielonej herbaty; aktywność antyoksydacyjna wyciągów etanolowych i heksanowych wyższa od herbaty rooibos, niższa od kwiatów hibiskusa	Lindsey i wsp. (2002)
przemiany metaboliczne mangiferyny i hesperydyny	<i>C. gen.</i>	NF	woda:EtOH (80:20)	<i>in vivo</i> ; samice świń karmione wyciągami z <i>Cyclopia</i> przez 11 dni	obecność noratryliolu (aglikon mangiferyny) oraz brak mangiferyny w osoczu krwi; sześć metabolitów mangiferyny i hesperydyny wykrytych w moczu (noratryliol, monoglukuronid noratryliolu, metylomangiferyna, hesperetyna, monoglukuronid hesperetyny i monoglukuronid eriodykcjolu); obecność mangiferyny i noratryliolu oraz brak hesperydyny i jej metabolitów w kale zwierząt	Bock i wsp. (2008)
przemiany metaboliczne mangiferyny	<i>C. gen.</i>	NF	woda:EtOH (80:20)	<i>in vivo</i> ; samice świń karmione wyciągami z <i>Cyclopia</i> przez 11 dni	Obecność szeregu fenolokwasów (kwas 4-hydroksybenzoesowy, kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, kwas 2,4,5-trihydroksybenzoesowy, kwas 2,4,6-trihydroksybenzoesowy, kwas 3-hydroksyfenylooctowy, kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy) w kale zwierząt	Bock i Ternes (2010)

^a *C. int.*, *C. intermedia*; *C. sub.*, *C. subternata*; *C. sess.*, *C. sessiliflora*; *C. gen.*, *C. genistoides*; *NO*, gatunek nieokreślony.

^b *NF*, materiał niefermentowany; *F*, materiał fermentowany; *NO*, stan surowca nieokreślony.

^c *2-AAF*, 2-acetyloaminofluoren; *ABTS*, 2,2-azyzobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian); *AFB₁*, aflatoksyna B₁; *ALAT*, aminotransferaza alaninowa; *ALKP*, fosfataza alkaliczna; *AspAT*, aminotransferaza asparaginianowa; *CAT*, katalaza; *CHP*, wodoronadtlenek kumylu; *COX-2*, cykloksygenaza-2; *DEN*, dietylonitrozoamina; *DMBA*, 7,12-dimetylobenz[*a*]antracen; *DMK*, aceton; *DPPH*, 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl; *OE*, octan etylu; *ERα*, receptor estrogenowy alfa; *ERβ*, receptor estrogenowy beta; *ERE*, estrogenowy element odpowiedzi; *EtOH*, etanol; *FB₁*, fumonizyna B₁; *FRAP*, *ferric ion reducing antioxidant power*; *GSH*, glutation; *GSSG*, disiarczek glutationu; *GST-α*, S-transferaza glutationu alfa; *MBN*, metylobenzylonitrozoamina; *MeOH*, metanol; *MMS*, siarczan dimetylu; *ODC*, dekarboksylaza ornityny; *TBARS*, *thiobarbituric acid reactive substances*; *TPA*, 13-octan 12-*O*-tetradekanoiloforbolu; *UDP-GT*, UDP-glukuronozylotransferaza.

W innym badaniu *in vivo*, karmienie szczurów wyciągami z *C. intermedia*, w znaczącym stopniu zahamowało peroksydację lipidów wątrobowych wywołaną podaniem dietylonitrozoaminy (DEN) oraz fumonizyny B₁ (FB₁). Wyraźnie zmniejszona została ponadto liczba zaobserwowanych zmian nekrotycznych, wywołanych podaniem wspomnianych substancji hepatotoksycznych, w wątrobach zwierząt (Marnewick i wsp., 2009).

Kolejne doświadczenia udowodniły, że wyciągi z miodokrzewów wykazują działanie ochronne i antyoksydacyjne również w przypadku podania zewnętrznego. Aplikacja ekstraktu na skórę myszy skutecznie łagodziła efekty naświetlania promieniowaniem UVB, co przekładało się na zmniejszoną peroksydację lipidów oraz obniżoną aktywność enzymów: katalazy, dysmutazy nadtlenkowej i cykloksygenazy-2 (Petrova i wsp., 2011).

Oprócz opisanych powyżej efektów, ekstrakty z miodokrzewów posiadają wyraźnie zaznaczone działanie przeciwnowotworowe w warunkach *in vivo*. Wykazano, że aplikacja wyciągów z *C. intermedia* na skórę myszy skutecznie hamowała rozwój guzów nowotworowych wywołanych aplikacją 7,12-dimetylobenz[*a*]antracenu (DMBA). Zarówno surowiec fermentowany jak i nie poddany oksydacji wykazywał działanie silniejsze od rooibos, jednak znacząco słabsze od herbaty zielonej (Marnewick i wsp., 2005). Aktywność przeciwnowotworową *C. intermedia* stwierdzono również w przypadku podania *per os*. Wykazano, że karmienie szczurów wyciągami z materiału niefermentowanego i fermentowanego skutecznie hamowało rozwój brodawczaków przełyku u zwierząt poddanych działaniu metylobenzylonitrozoaminy (MBN) (Sissing i wsp., 2011).

Oprócz szeroko rozumianego działania antyoksydacyjnego i antymutagennego, ekstrakty otrzymany z roślin z rodzaju *Cyclopia* charakteryzują się wyraźnie zaznaczonym potencjałem fitoestrogennym, wykazany jednak jak dotąd jedynie w warunkach *in vitro*. Najsilniejsze działanie, głównie w stosunku do receptorów ER β , stwierdzono w przypadku niefermentowanego materiału roślinnego *C. subternata* i *C. genistoides* (Verhoog i wsp., 2007a). Wykazano jednocześnie znaczne zróżnicowanie aktywności estrogennej w obrębie jednego gatunku, np. dla *C. genistoides*. Ekstrakty z surowca pochodzącego z różnych partii charakteryzowały się powinowactwem wobec receptorów ER α , ER β , lub obydwu typów jednocześnie (Verhoog i wsp., 2007b). Co ciekawe, mangiferyna i hesperydyna, będące podstawowymi polifenolami obecnymi w opisywanych roślinach, nie wykazywały właściwości fitoestrogennych. Sugeruje to, że wspomniana aktywność może wynikać z obecności, w opisywanych roślinach, niezidentyfikowanych dotąd połączeń (Verhoog i wsp., 2007a, b). Jednocześnie, siła działania wybranych frakcji polifenolowych, otrzymanych na drodze sekwencyjnej ekstrakcji surowca, jest porównywalna z komercyjnymi preparatami o działaniu fitoestrogennym (Mfenyana i wsp., 2008). Zdecydowanie wyższą aktywnością estrogeną, a przez to przydatnością do produkcji leków ziołowych bądź suplementów diety, charakteryzują się surowce niefermentowane. Problem stanowić może jednak duża rozbieżność siły działania hormonalnego pomiędzy partiami materiału pochodzącymi z różnych zbiorów (Verhoog i wsp., 2007b).

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wyciągów z miodokrzewów jest jak dotąd słabo poznana. Działanie hamujące wzrost bakterii *Escherichia coli* oraz kiełkowanie spor *Botrytis cinerea* stwierdzono, w wybranych zakresach stężeń, dla ekstraktów *C. subternata* i *C. genistoides* (Coetzee i wsp., 2008). Wobec powyższego, możliwe wydaje się zastosowanie wspomnianych wyciągów jako naturalnych pestycydów oraz środków konserwujących.

Przeprowadzone do tej pory badania, jakkolwiek bazujące w dużej mierze na modelach *in vitro*, świadczą o znacznym potencjale herbaty honeybush w zakresie działania prozdrowotnego. Na uwagę zasługuje zwłaszcza jej silnie zaznaczona aktywność antyoksydacyjna, antymutagenna oraz fitoestrogenna. Ze względu na powyższe, rośliny z rodzaju *Cyclopia* mogą być w przyszłości wykorzystane do produkcji nutraceutyków, żywności funkcjonalnej, a także odgrywać rolę prewencyjną w profilaktyce chorób nowotworowych. Z uwagi na wyższą zawartość związków polifenolowych i korzystniejsze z reguły wyniki doświadczeń biomedycznych, wydaje się, że szczególnie wartościowe pod względem użytkowym są stosunkowo niedawno wprowadzone na rynek surowce niefermentowane (Joubert i wsp., 2008a, 2011). Uzasadnienie wymienionych zastosowań wymagałoby jednakże silniejszego oparcia w badaniach naukowych, szczególnie eksperymentach klinicznych z udziałem ludzi. Dodatkowy problem stanowi znaczne zróżnicowanie wewnątrz- i międzygatunkowe miodokrzewów pod względem zawartości polifenoli i działania biologicznego (Joubert i wsp., 2003, 2008a; Verhoog i wsp., 2007a, b). Nie wykazano ponadto jak dotąd jednoznacznej zależności pomiędzy aktywnością fitoestrogenną roślin z rodzaju *Cyclopia* a obecnością w nich znanych wtórnych metabolitów (Mfenyana i wsp., 2008). Uzyskane wyniki wskazują, że do wyjaśnienia mechanizmów działania biologicznego wyciągów z miodokrzewów konieczne będą dalsze badania składu chemicznego opisywanych roślin. Ze względu na wspomniane wcześniej różnice w zawartości połączeń polifenolowych, konieczna może być ponadto staranna selekcja materiału do produkcji nutraceutyków, przy użyciu metod chromatograficznych.

I.2. Produkcja metabolitów wtórnych pochodzenia roślinnego w instalacjach laboratoryjnych, póltechnicznych oraz przemysłowych

Od szeregu lat, roślinne kultury *in vitro* postrzegane są jako alternatywne, w stosunku do roślin gruntowych, źródło substancji naturalnych o znaczeniu użytkowym, wykorzystywanych jako leki i odgrywających rolę w profilaktyce wybranych schorzeń, bądź stanowiących składniki diety o określonych właściwościach prozdrowotnych (Mühlbach, 1998; Zhong, 2001; Verpoorte i wsp., 2002; Wang, 2008; Georgiev i wsp., 2009). Szereg metabolitów roślinnych stanowią ponadto barwniki znajdujące zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym (Zhang i Furusaki, 1999; Georgiev i wsp., 2008), a także związki o właściwościach biobójczych wykorzystywane jako naturalne pestycydy (Suresh i wsp., 2005; Prakash i Srivastava, 2008). Biomasy *in vitro* stanowiąc mogą potencjalnie nieograniczone źródło określonych substancji, umożliwiające ich pozyskiwanie niezależnie od wpływu czynników środowiskowych, strefy klimatycznej, pory roku, zasobów naturalnych rośliny macierzystej oraz uwarunkowań politycznych (Mühlbach, 1998; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Georgiev i wsp., 2009; Ruffoni i wsp., 2010). Dzięki metodom inżynierii genetycznej możliwe jest ponadto wykorzystanie roślin do produkcji białek transgenicznych o znaczeniu leczniczym (Huang i McDonald, 2009; Tiwari i wsp., 2009). Do istotnych zalet kultur *in vitro* należy potencjał wielokrotnego zwiększenia produktywności biomasy roślinnej, pod względem określonego związku, w porównaniu z materiałem gruntowym (Ruffoni i wsp., 2010). Oprócz zdolności do biosyntezy wybranych substancji *de novo*, kultury *in vitro* roślin wyższych wykazują możliwość biotransformacji substratów dostarczanych egzogennie, katalizując przebieg reakcji niejednokrotnie trudnych do przeprowadzenia metodami chemicznymi (Kreis i Reinhard, 1992; Giri i wsp., 2001; Skrzypczak-Pietraszek i wsp., 2005). Obecność, w roślinach gruntowych, kompartmentów wewnątrzkomórkowych i sprzężonych z nimi układów enzymatycznych sprawia zarazem, że niemożliwe jest często pełne odtworzenie szlaków biosyntezy metabolitów roślinnych w komórkach zmodyfikowanych genetycznie mikroorganizmów. Z uwagi na powyższe, kultury *in vitro* wydają się być w wielu przypadkach jedyną alternatywą dla upraw gruntowych poszczególnych roślin. Podwyższenie poziomu biosyntezy wybranych metabolitów wtórnych w warunkach *in vitro* może zostać osiągnięte na drodze selekcji odpowiednich linii komórkowych, optymalizacji warunków hodowlanych, zabiegów retrobiosyntetycznych i/lub modyfikacji genetycznych (DiCosmo i Misawa, 1995; Verpoorte i wsp., 2002; Georgiev i wsp., 2009; Ruffoni i wsp., 2010). W dalszej kolejności, strategia zwiększania produkcji danej substancji, z wykorzystaniem biomas *in vitro*, może być realizowana w oparciu o mikrorozmnażanie zmodyfikowanych genetycznie roślin oraz ich wprowadzenie do upraw gruntowych (Debnath i wsp., 2006; Tiwari i wsp., 2009), bądź poprzez wielkoskalowe kultury wysokoproduktywnych biomas prowadzone w bioreaktorach (Su, 1995; Roberts i Shuler, 1997; Zhong, 2001; Eibl i Eibl, 2008). Poważnym ograniczeniem pierwszego z wymienionych sposobów jest opłacalność metody, zadowalająca jedynie w przypadku szybko rosnących roślin,

mogących dostarczyć w krótkim czasie znacznych ilości biomasy. W tym miejscu należy zaznaczyć, że źródłem szeregu wartościowych substancji są rośliny o ograniczonym zasięgu występowania, wolno rosnące bądź trudne do uprawy (Tabata, 2004; Georgiev i wsp., 2009; Ruffoni i wsp., 2010). Powoduje to, że nieodłącznym elementem większości przedsięwzięć biotechnologicznych, ukierunkowanych na masową produkcję roślinnych metabolitów wtórnych, jest ograniczenie procedur jedynie do warunków *in vitro*, w których istotną rolę odgrywa zwiększanie skali kultur poprzez zastosowanie bioreaktorów. Różnorodność celów eksperymentalnych, w tym ich wybitnie aplikacyjny charakter, powoduje jednocześnie, że poszczególne doświadczenia ukierunkowane są z reguły na badanie wybranych aspektów kultur prowadzonych w fermentorach. Wykonywane są zarówno doświadczenia o charakterze biotechnologicznym (selekcja linii komórkowych, określanie wpływu składników podłoża na wzrost biomasy i biosyntezę metabolitów wtórnych, elicytacja, immobilizacja, permeabilizacja, modyfikacje genetyczne), jak również prace dotyczące aspektów technicznych badanej kultury (dobór specyficznego bioreaktora, zwiększanie skali hodowli, zagadnienia związane z napowietrzaniem, wymianą gazową, mieszaniem, reologią i stresem mechanicznym). Biorąc pod uwagę całokształt procesu biotechnologicznego, prowadzone badania można podzielić na związane z optymalizacją procesów o charakterze *upstream* (wybór linii komórkowej, opracowanie warunków wzrostowych biomasy, zwiększenie skali kultury, stymulowanie biosyntezy metabolitów wtórnych) oraz *downstream* (permeabilizacja biomas, odzyskiwanie produktu, ekstrakcja *in situ*) (Su, 1995; Kieran i wsp., 1997; Zhong, 2001; Mühlbach, 1998; Georgiev i wsp., 2009). Należy przy tym zaznaczyć, że rozmach prowadzonych badań uzależniony jest w znacznym stopniu od wartości rynkowej danej substancji. Konieczność stosowania kosztownych technologii oraz konkurencja w postaci upraw gruntowych sprawiają, że jedynie w stosunkowo nielicznych przypadkach eksperymenty osiągają etap produkcji przemysłowej (Sasson, 1992; Misawa, 1994; Verpoorte i wsp., 1994, 2002). Znakomita większość prac ma jak dotąd charakter typowo akademicki i prowadzona jest z użyciem bioreaktorów w skali laboratoryjnej, bądź wielkolaboratoryjnej. W niniejszym rozdziale przedstawiono wybrane aspekty dotyczące biosyntezy metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* roślin wyższych prowadzonych w bioreaktorach, z uwzględnieniem rodzajów wykorzystywanych biomas, produkowanych przez nie połączeń oraz stosowanych rozwiązań technicznych. Ze względu na obszerność zagadnień związanych z wykorzystaniem bioreaktorów, w opracowaniu nie uwzględniono wykorzystania kultur *in vitro* do produkcji białek transgenicznych, jak również mikrorozmnażania roślin przy użyciu fermentorów. Zestawienie związków biosyntezowanych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w reaktorach, zarówno na skalę laboratoryjną jak i przemysłową, zamieszczono w tabeli 5 znajdującej się na stronach od 41 do 50 niniejszego rozdziału.

I.2.1. Rodzaje produkowanych związków

Dotychczasowe badania nad roślinnymi kulturami *in vitro* wskazują, że mogą być one wykorzystane do pozyskiwania związków reprezentujących praktycznie

wszystkie grupy metabolitów wtórnych. Wśród biosyntezykowanych połączeń wymienić należy między innymi alkaloidy, terpenoidy, chinony, pochodne fenylopropanu oraz bioflawonoidy. Pomimo potencjalnej możliwości wykorzystania roślinnych kultur *in vitro* do produkcji każdego spośród roślinnych metabolitów wtórnych, w praktyce technologia ta napotyka na liczne ograniczenia. Wśród najważniejszych z nich wymienić należy znaczne obniżenie, bądź brak biosyntezy wybranych połączeń w warunkach kultur tkankowych. Wspomniane zjawisko jest najczęściej obserwowane w przypadku nieuorganizowanych biomas parenchymatycznych, co tłumaczy się brakiem charakterystycznego dla rośliny gruntowej zróżnicowania tkankowego i związanymi z tym zaburzeniami funkcjonowania układów enzymatycznych (Su, 1995; Verpoorte i wsp., 2002; Zhao i Verpoorte, 2007; Ruffoni i wsp., 2010). Sytuacja taka ma miejsce np. w przypadku alkaloidów tropanowych, których biosynteza zachodzi przede wszystkim w częściach podziemnych rośliny. Z tego względu, pozyskiwanie wspomnianych związków metodami biotechnologicznymi jest w praktyce zawężone do kultur korzeni włósnikowatych bądź odciętych (Palazón i wsp., 2008). Ograniczenie biosyntezy metabolitów wtórnych obserwowano także w kulturach *in vitro* bylicy rocznej (*Artemisia annua*), będącej źródłem artemizyniny, stanowiącej jeden z podstawowych środków w leczeniu malarii. Stwierdzono, że metabolit ten wytwarzany jest jedynie w biomasach uorganizowanych, tj. pędach i korzeniach włósnikowatych (Liu i wsp., 2006). Za spektakularny przykład niepowodzenia (biorąc pod uwagę długofalowość projektu i zainwestowane weń fundusze) uznać można próby wykorzystania kultur tkankowych *Catharanthus roseus* do produkcji alkaloidów o działaniu przeciwnowotworowym. Wprowadzenie powyższej rośliny do kultur *in vitro* spowodowało praktycznie całkowity zanik biosyntezy istotnych z terapeutycznego punktu widzenia pochodnych dwuindolowych (winkrystyna, winblastyna), pomimo zachowania przez nie zdolności do produkcji alkaloidów indolowych (m.in. ajmalicyny). Wspomniana blokada metaboliczna obserwowana była zarówno w przypadku kultur zawieszinowych jak i korzeni włósnikowatych, uniemożliwiając tym samym wykorzystanie powyższych biomas do pozyskiwania alkaloidów. Pewne nadzieje w tym zakresie wiązane są z technikami inżynierii genetycznej, które mogłyby być wykorzystane w celu przywrócenia biosyntezy pochodnych dwuindolowych. Pomimo zakrojonych na szeroką skalę badań i opracowania technologii prowadzenia kultur na skalę techniczną, nie udało się jak dotąd uzyskać opłacalnych, z komercyjnego punktu widzenia, systemów *in vitro* *C. roseus* (Zhao i Verpoorte, 2007). Innym przykładem grupy związków naturalnych, produkowanych w niewielkich ilościach w warunkach kultur tkankowych, są olejki eteryczne. Jakkolwiek szereg biomas *in vitro* zachowuje do pewnego stopnia zdolność do biosyntezy połączeń lotnych, to skład powstających mieszanin najczęściej znacząco odbiega od olejku pozyskiwanego z rośliny macierzystej (Hilton i wsp., 1995). Znaczącemu obniżeniu ulega ponadto zawartość frakcji lotnej. Jakkolwiek dobór warunków hodowlanych oraz modyfikacje genetyczne badanych biomas mogą skutkować zwiększeniem stężenia olejku eterycznego w kulturze *in vitro*, w większości wypadków pozostaje ono niższe w porównaniu z materiałem gruntowym. Znacznie lepszą wydajnością w tym względzie

charakteryzują się kultury mikroorganizmów, przeprowadzających reakcje biotransformacji wprowadzonych do podłoża prekursorów (Gounaris, 2010).

Opisane powyżej ograniczenia, wynikające ze stopnia uorganizowania prowadzonych kultur, mają praktyczne znaczenie w przypadku wybranych grup związków. Bardziej ogólnym problemem, odnoszącym się do biosyntezy większości metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro*, bez względu na morfologię biomasy, jest niska zawartość poszczególnych związków. W szeregu przypadków, stężenia substancji istotnych z użytkowego punktu widzenia są podobne, lub tylko nieznacznie wyższe w porównaniu z rośliną macierzystą. Fakt ten, w połączeniu ze stosunkowo wolnym przyrostem biomas roślinnych, sprawia, że w wielu wypadkach trudne jest stworzenie ekonomicznie opłacalnego systemu *in vitro* do produkcji związków naturalnych. Ze względu na wysoki koszt prowadzenia wielkoskalowych kultur *in vitro* oraz konkurencję w postaci upraw gruntowych, pozyskiwanie roślinnych metabolitów wtórnych metodami biotechnologicznymi jest opłacalne jedynie dla substancji o dużej wartości rynkowej oraz w przypadku ograniczonych zasobów surowca gruntowego będącego źródłem danego związku (Sasson, 1992; Zhao i Verpoorte, 2007). Kultywowana biomasa musi ponadto charakteryzować się wysokim potencjałem produkcyjnym, adekwatnym do aktualnego zapotrzebowania rynkowego. Najbardziej znanymi przykładami związków produkowanych na skalę komercyjną, przy użyciu roślinnych kultur *in vitro*, są taksany (alkaloidy diterpenowe, głównie paklitaksel, pozyskiwany z *Taxus* spp.) (Zhong, 2002; Tabata, 2004; Frense, 2007; Malik i wsp., 2011), ginsenozydy (saponiny triterpenowe *Panax* spp.) (Wu i Zhong, 1999; Paek i wsp., 2009; Baque i wsp., 2012) oraz szikonina (czerwony barwnik naftochinonowy z korzeni *Lithospermum erythrorhizon*) (Curtin, 1983; DiCosmo i Misawa, 1995; Mühlbach, 1998).

Akumulacja alkaloidów w korze roślin z rodzaju *Taxus* wiąże się z koniecznością niszczenia wieloletnich okazów w celu pozyskania względnie niewielkich ilości paklitakselu, znajdującego zastosowanie w leczeniu nowotworów. Duży popyt na wspomnianą substancję, w połączeniu z niską odnawialnością zasobów naturalnych sprawiają, że kultury *in vitro* są metodą z wyboru w pozyskiwaniu paklitakselu. Obecnie związek ten, jak również inne taksany, produkowany jest przez firmy Phyton Biotech (Ahrensburg, Niemcy) i Samyang Genex (Seul, Korea) na skalę przemysłową (reaktory do 75000 l pojemności) z wykorzystaniem kultur zawieszinowych *Taxus* sp. (Zhong, 2002; Tabata, 2004; Frense, 2007; Malik i wsp., 2011). Inną grupą połączeń, interesującą z punktu widzenia biotechnologii przemysłowej, są ginsenozydy, pozyskiwane z korzeni szeregu gatunków z rodzaju *Panax*. Powolny wzrost roślin oraz rosnąca popularność żeń-szenia jako surowca o właściwościach prozdrowotnych stanowiły bodziec dla opracowania alternatywnego źródła ginsenozydów, w postaci kultur *in vitro*. Wysoka produktywność biomas parenchymatycznych i korzeniowych przyczyniła się w znaczącym stopniu do sukcesu komercyjnego przedsięwzięcia. Do pozyskiwania ginsenozydów na skalę przemysłową wykorzystywane są obydwie z wymienionych typów biomas. Firma Nitto Denko (Osaka, Japonia) jako pierwsza opracowała system do produkcji biomasy *Ginseng* sp.

oparty o kultury zawieszinowe (reaktory do 20000-25000 l pojemności) (Wu i Zhong, 1999; Baque i wsp., 2012).

Trzeci z wymienionych związków, szikonina, jest zarazem pierwszym metabolitem wtórnym produkowanym na skalę przemysłową przy użyciu roślinnych kultur *in vitro*. Podobnie jak w przypadku biomas *in vitro* *Ginseng* sp., przyczyną poszukiwania alternatywy dla tradycyjnych sposobów pozyskiwania barwnika była jego wysoka cena oraz wolny wzrost korzeni roślin gruntowych *Lithospermum erythrorhizon*. Do produkcji szikoniny wykorzystano wysokoproduktywne linie komórkowe wspomnianej rośliny, zaadaptowane do hodowli na skalę techniczną w reaktorach pojemności do 250, 750 oraz 1000 l (Mitsui Petrochemical Industries, Tokio, Japonia) (Curtin, 1983; Sasson, 1992; DiCosmo i Misawa, 1995; Mühlbach, 1998).

Należy zaznaczyć, że sukces komercyjny opisanych wyżej aplikacji wynika w dużej mierze z nałożenia się szeregu korzystnych czynników, tzn. możliwości wyselekcjonowania linii o wysokiej produktywności, dużej wartości rynkowej substancji oraz ograniczonych zasobów naturalnych roślin macierzystych. Pomimo opracowania wydajnych systemów *in vitro*, źródłem szeregu związków istotnych z leczniczego punktu widzenia, m.in. artemizyny i podofilotoksyny, pozostają rośliny gruntowe (Farkya i wsp., 2004; Liu i wsp., 2006). Sytuacja taka ma miejsce w przypadku dobrej dostępności surowca i/lub problemów technicznych związanych z adaptacją kultury do skali przemysłowej.

I.2.2. Wybór biomasy

Specyfika biosyntezy oraz akumulacji metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* sprawia, że do pozyskiwania wybranych substancji na skalę techniczną mogą być wykorzystane zarówno kultury zawieszinowe, jak i organowe (pędy, korzenie odcięte lub włośnikowate). Wybór biomasy jest w znacznej mierze uwarunkowany jej zdolnością do biosyntezy określonej grupy związków, co opisano w podrozdziale I.2.1. Z technologicznego punktu widzenia, najkorzystniejsze do przemysłowej produkcji metabolitów wtórnych wydają się kultury zawieszinowe. Umożliwiają one zastosowanie klasycznych, względnie nieznacznie zmodyfikowanych konstrukcji bioreaktorów z mieszaniem mechanicznym (*stirred-tank*) lub pneumatycznym (reaktory balonowe, kolumnowe i *air-lift*), wykorzystywanych od lat w badaniach mikrobiologicznych. Zaletą kultur zawieszinowych jest ponadto możliwość ich względnie prostej adaptacji do instalacji przemysłowych. Homogenność zawiesziny w połączeniu z dobrym transferem masy i gazów sprawiają, że możliwe jest uzyskanie wysokoproduktywnych kultur o wysokiej gęstości. Dobry kontakt pomiędzy komórkami a medium wzrostowym zwiększa ponadto skuteczność technik elicytacji, permeabilizacji i dokarmiania, mających na celu stymulację produkcji metabolitów wtórnych. Wadą kultur zawieszinowych jest ich stosunkowo duża podatność na stres mechaniczny, ograniczająca możliwość ich prowadzenia przy użyciu klasycznych bioreaktorów mieszająco-napowietrzających (*stirred-tank*). Ograniczeniem dla przemysłowego zastosowania opisywanych biomas jest ponadto stosunkowo wolny wzrost komórek roślinnych, a także duża zmienność somaklonalna, mogąca generować

silne wahania produkcyjności i parametrów wzrostowych kultury (Su, 1995; Kieran i wsp., 1997, 2000; Zhong, 2001). Wymienione powyżej wady hodowli zawieszinowych, jakkolwiek istotne z technologicznego punktu widzenia, nie są najistotniejszymi czynnikami hamującymi rozwój biotechnologii przemysłowej opartej o kultury *in vitro* roślin wyższych. W praktyce, większość zakończonych sukcesem przedsięwzięć z wykorzystaniem biomas roślinnych, opartych jest właśnie o kultury zawieszinowe. Wśród najważniejszych z nich wymienić należy wspomniane już (rozdz. I.2.1.) przemysłowe pozyskiwanie taksolu, ginsenozydów i szikoniny, z użyciem bioreaktorów o pojemności od kilkuset do kilkudziesięciu tysięcy litrów. Wskazuje to, że problemy natury technicznej, związane ze zwiększaniem skali kultury, są drugorzędne w stosunku do niskiej z reguły produktywności niezróżnicowanych biomas parenchymatycznych (obserwowanej np. w przypadku *C. roseus*) (Sasson, 1992; Verpoorte i wsp., 2002; Zhao i Verpoorte, 2007).

Opisany wcześniej (rozdz. I.2.1.) brak lub niska zawartość szeregu metabolitów wtórnych w biomasach parenchymatycznych, spowodował wzrost zainteresowania kulturami organowymi, zachowującymi zróżnicowanie tkankowe roślin macierzystych. Spośród nich wymienić należy pędy i korzenie odcięte, rosnące na podłożach suplementowanych odpowiednimi regulatorami wzrostu, jak również korzenie włósnikowate i teratomy pędowe, powstałe w wyniku infekcji biomasy roślinnej odpowiednio bakteriami *Agrobacterium rhizogenes* i *Agrobacterium tumefaciens* (Verpoorte i wsp., 2002; Pistelli i wsp., 2010; Baque i wsp., 2012). Oprócz zdolności do produkcji związków charakterystycznych dla roślin gruntowych, kultury organowe cechuje z reguły mniejsza, w porównaniu z zawieszinami komórek, wrażliwość na stres hydrodynamiczny. W przeciwieństwie do biomas parenchymatycznych, prowadzenie kultur organowych w bioreaktorach wymaga jednakże zastosowania odmiennych rozwiązań technicznych. W szczególności utrudnione jest użycie klasycznych konstrukcji typu *stirred-tank*, z uwagi na obecność mieszadła mechanicznego uszkadzającego materiał biologiczny. W wielu wypadkach, problematyczna jest również adaptacja kultur organowych do skali przemysłowej, głównie ze względu na konieczność zastosowania systemów immobilizacji biomas oraz trudności związane z efektywnym wykorzystaniem przestrzeni reaktora (Uozumi i wsp., 2004; Sivakumar, 2006; Mishra i Ranjan, 2008).

Spośród kultur prowadzonych w bioreaktorach, najmniejszą produktywnością charakteryzują się z reguły hodowle pędowe. Napotykane trudności związane są zarówno z morfologią, jak i właściwościami fizjologicznymi opisywanych kultur. Jednym z podstawowych problemów, uniemożliwiających zastosowanie reaktora o dużej pojemności, przy zachowaniu wysokiego stopnia zagęszczenia biomasy, jest fotoautotroficzny wzrost pędów. Równomierne oświetlenie kultury, jakkolwiek możliwe przy zastosowaniu niewielkich zbiorników hodowlanych, jest problematyczne w przypadku instalacji przemysłowych (Hilton i wsp., 1995; Verpoorte i wsp., 2002). Niekorzystnym zjawiskiem jest również zamieranie i/lub zmiana właściwości fizjologicznych tkanek wewnątrz rozrastającej się biomasy pędowej, spowodowana niedostatecznym dostępem światła, tlenu i substancji odżywczych (Hilton i wsp., 1995). Rozwiązanie stanowić może w tym przypadku płaskie rozmieszczenie rosnących pędów

na ruszcie/półkach i podawanie pożywki w postaci mgły, ściekającego grawitacyjnie strumienia, bądź prowadzenie kultur okresowo-zalewowych (Hilton i wsp., 1995; Liu i wsp., 2003; Zobayed i wsp., 2004; Piątczak i wsp., 2005a). Zastosowanie wspomnianego systemu wydaje się jednak mało praktyczne w przypadku instalacji przemysłowych, m.in. ze względu na trudności z równomiernym rozmieszczeniem *inoculum*, jak również mało efektywne wykorzystanie przestrzeni reaktora. Obserwuje się ponadto niekorzystne zjawisko witrifikacji pędów, rosnących w systemach natryskowych (Piątczak i wsp., 2005a; Grzegorzczak i Wysokińska, 2010). Oprócz opisanych powyżej problemów, istotną przeszkodą dla komercyjnego wykorzystania kultur pędowych do pozyskiwania metabolitów wtórnych jest długi czas podwojenia biomasy oraz zawartość związków na poziomach najczęściej zbliżonych do roślin macierzystych (Verpoorte i wsp., 2002). Należy jednak zaznaczyć, że biomasy pędowe mogą być z powodzeniem wykorzystane do namnażania roślin na dużą skalę z użyciem bioreaktorów balonowych, z obrotowym bębniem, bądź instalacji okresowo-zalewowych (Paek i wsp., 2001, 2005).

W porównaniu z kulturami pędowymi, znacznie korzystniejszymi właściwościami, z punktu widzenia produkcji związków aktywnych biologicznie, charakteryzują się biomasy korzeniowe. Wykorzystywane są w tym celu zarówno kultury korzeni odciętych, wymagających najczęściej dostarczania egzogennych regulatorów wzrostu (Murthy i wsp., 2008; Baque i wsp., 2012), jak również korzeni włośnikowatych, rosnących na podłożach bez wspomnianej suplementacji (Georgiev i wsp., 2007; Pistelli i wsp., 2010).

Właściwości korzeni włośnikowatych czynią z nich potencjalnie znakomite źródło substancji o znaczeniu użytkowym. Do podstawowych zalet niniejszych kultur należą: krótki czas podwojenia biomasy, brak konieczności stosowania regulatorów wzrostu, zawartość metabolitów wtórnych przekraczająca często poziomy typowe dla roślin gruntowych oraz zdolność do biosyntezy połączeń nie występujących w materiale macierzystym (Guillon i wsp., 2006; Georgiev i wsp., 2007; Pistelli i wsp., 2010). Po wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji, obejmujących przede wszystkim zastosowanie systemu immobilizacji biomasy, korzenie włośnikowate mogą być z powodzeniem hodowane w większości typów reaktorów na skalę laboratoryjną. Z uwagi na wymienione wcześniej właściwości korzeni włośnikowatych, prowadzenie ich wielkoskalowych kultur wiąże się z koniecznością stosowania oryginalnych, często niedostępnych komercyjnie rozwiązań technicznych (Uozumi, 2004; Sivakumar 2006). Szybki wzrost biomasy, jakkolwiek korzystny ze względu na związaną z nim najczęściej wysoką produktywność kultury, jest jednocześnie przyczyną problemów dotyczących zapewnienia odpowiedniego natlenienia i odżywienia tkanek roślinnych. W przeciwieństwie do zawieszin komórek, mieszanie i wymiana gazowa są znacząco utrudnione w przypadku zwartych kultur korzeniowych o wysokiej gęstości. Szybki przyrost biomasy może ponadto powodować utratę właściwości fizjologicznych korzeni znajdujących się w głębszych jej warstwach, skutkując obniżeniem produktywności kultury (Curtis, 1993). W porównaniu do klasycznych konstrukcji bioreaktorów z mieszaniem mechanicznym bądź pneumatycznym, lepszym wzrostem oraz wyższymi stężeniami metabolitów wtórnych charakteryzują się korzenie rosnące w reaktorach z

natryskowym systemem podawania pożywki (Kim i wsp., 2002a, b; Ramakrishnan i Curtis, 2004). Niezależnie od zastosowanego systemu hodowli, wadą opisywanych kultur jest obecność opin, których toksyczność ogranicza zastosowanie w leczeniu surowej biomasy korzeniowej (Baque i wsp., 2012). Należy jednak zaznaczyć, że wspomniany problem jest mniej istotny w przypadku użycia korzeni do izolacji wybranych metabolitów wtórnych. Prace nad wykorzystaniem korzeni transformowanych do komercyjnego pozyskiwania związków naturalnych prowadzone są m.in. przez firmę ROOTec bioactives (Witterswil, Szwajcaria) (Wink i wsp., 2005).

W ostatnich latach, znaczące sukcesy w zakresie otrzymywania substancji naturalnych osiągnięto wykorzystując kultury korzeni odciętych. Wykazują one szereg zalet wspólnych z korzeniami włóśnikowatymi, w tym szybki wzrost, stosunkowo dużą odporność na stres hydrodynamiczny i często wysokie stężenia metabolitów wtórnych. Korzystną cechą korzeni odciętych jest ponadto brak opin, a co za tym idzie, możliwość wykorzystywania w leczeniu biomasy *in vitro* bez konieczności izolacji i oczyszczania poszczególnych połączeń aktywnych (Murthy i wsp., 2008; Paek i wsp., 2009; Baque i wsp., 2012). Podobnie jak korzenie włóśnikowate, kultury korzeni odciętych mogą być z powodzeniem prowadzone w większości typów bioreaktorów, z uwzględnieniem ograniczeń wynikających z charakteru biomasy. Wykazano ponadto, że możliwe jest pozyskiwanie korzeni odciętych na skalę techniczną, z wykorzystaniem bioreaktorów pojemności od kilkuset do 10000 l. Prowadzone są m.in. prace nad zastosowaniem wspomnianych systemów do komercyjnej produkcji korzeni *Panax ginseng*, *Echinacea purpurea* i *Morinda citrifolia* (CBN Biotech, Ch'öngju, Korea Południowa) (Paek i wsp., 2009; Baque i wsp., 2012).

I.2.3. Wybór konstrukcji bioreaktora

Specyfika roślinnych kultur *in vitro* sprawia, że do ich prowadzenia na skalę techniczną konieczne jest często stosowanie oryginalnych rozwiązań technicznych, nieobecnych w standardowych reaktorach wykorzystywanych do hodowli mikroorganizmów. W szczególności istotne jest ograniczenie stresu mechanicznego ze względu na większą wrażliwość komórek roślinnych w porównaniu z organizmami bakteryjnymi, jak również konieczność immobilizacji biomas organowych w przypadku niektórych rodzajów bioreaktorów (Kieran i wsp., 1997; Roberts i Shuler, 1997; Chattopadhyay i wsp., 2002a).

Najbardziej popularną konstrukcją, stosowaną najczęściej do prowadzenia kultur zawieszinowych, jest bioreaktor mieszająco-napowietrzający (*stirred-tank bioreactor*). Do jego podstawowych zalet należą: wydajne mieszanie i napowietrzenie hodowli oraz możliwość względnie prostego zwiększenia skali eksperymentu. Szereg procesów przemysłowych, w tym produkcja paklitakselu, ginsenozydów i szikoniny przy użyciu zawieszin komórek, wykorzystuje wspomniany typ reaktora. Bioreaktory *stirred-tank* są również powszechnie wykorzystywane w badaniach laboratoryjnych, o czym decyduje w dużej mierze niezawodność i bogata oferta rynkowa wymienionych konstrukcji. W celu ograniczenia stresu mechanicznego, tradycyjne mieszadła turbinowe mogą zostać

zastąpione mieszadłami płytowymi, ramowymi, ślimakowymi lub o budowie śruby okrętowej (Doran, 2000, 2010).

Prowadzenie kultur organowych w reaktorach mieszająco-napowietrzających wymaga także wyposażenia naczynia hodowlanego w system immobilizacji biomasy, który stanowi najczęściej siatka bądź układ półek wykonanych z tworzywa lub stali nierdzewnej. W przeciwieństwie do zawieszin komórek, trudne z technologicznego punktu widzenia jest jednak zwiększanie skali kultur organowych prowadzonych w bioreaktorach typu *stirred-tank* (Curtis, 1993; Sivakumar, 2006; Mishra i Ranjan, 2008).

Oprócz reaktorów z mieszaniem mechanicznym, jednymi z najczęściej wykorzystywanych systemów do prowadzenia roślinnych kultur *in vitro* są instalacje z napowietrzaniem pneumatycznym. Należą do nich bioreaktory balonowe (*balloon bioreactor*), kolumnowe (*column bioreactor*) oraz *air-lift*. Do podstawowych zalet wymienionych konstrukcji należy brak mieszadła mechanicznego, generującego duże siły ścinające i uszkadzającego biomasy organowe. Z uwagi na powyższe, możliwe jest wykorzystanie bioreaktorów pneumatycznych zarówno do prowadzenia kultur zawieszinowych, jak i pędowych oraz korzeniowych (Kieran i wsp., 1997; Chattopadhyay i wsp., 2002a; Baque i wsp., 2012). Brak mieszadła mechanicznego w reaktorach balonowych i kolumnowych, pozwala w wielu wypadkach na rezygnację z immobilizacji biomas korzeniowych. Prostota konstrukcji wspomnianych instalacji umożliwia zarazem względnie proste zwiększenie skali kultury do hodowli przemysłowej. W praktyce, do produkcji korzeni odciętych *Panax ginseng*, *Echinacea purpurea* czy *Hypericum perforatum* na skalę techniczną wykorzystywane są bioreaktory balonowe bądź bębnowe pojemności od kilkuset do dziesięciu tysięcy litrów (Paek i wsp., 2009; Baque i wsp., 2012). Reaktory opisywanego typu, pojemności 100-500 l sprawdziły się ponadto dobrze w przypadku kultur zawieszinowych *Taxus* sp. (Son i wsp., 2000; Zhong, 2002).

Innym typem bioreaktorów, wykorzystywanych głównie do prowadzenia hodowli zawieszinowych, są konstrukcje *air-lift*. W porównaniu do reaktorów balonowych i kolumnowych, charakteryzują się one występowaniem mniejszych sił ścianających i bardziej równomiernym mieszaniem. Bioreaktory *air-lift* stosowane są zarówno do prowadzenia kultur w skali laboratoryjnej, jak i wielkolaboratoryjnej oraz pilotażowej (reaktory odpowiednio do kilkunastu, kilkudziesięciu i kilkuset litrów pojemności) (Kieran i wsp., 1997; Son i wsp., 2000).

Jak już wspomniano powyżej (rozdz. I.2.2.), jednymi z podstawowych wad kultur korzeniowych, prowadzonych w bioreaktorach, jest utrudnione napowietrzanie oraz utrata własności fizjologicznych korzeni w przypadku hodowli o wysokiej gęstości. Z uwagi na powyższe, podjęte zostały próby opracowania instalacji technicznych uwzględniających specyficzne zapotrzebowania biomas korzeniowych. Odpowiednie wydają się konstrukcje z fazą gazową, w których korzenie rozmieszczone są równomiernie w przestrzeni reaktora za pomocą systemu półek lub haków ze stali nierdzewnej, a pożywka rozpylana jest za pomocą dyszy hydraulicznej, atomizera bądź przetwornika ultradźwiękowego (Curtis, 1993; Uozumi, 2004; Mishra i Ranjan, 2008). Zaletą opisanego powyżej reaktora jest dobry dostęp tlenu i substancji odżywczych do

rosnących biomas, przy jednoczesnym braku stresu mechanicznego. Z uwagi na powyższe, produktywność systemów natryskowych jest często wyższa w porównaniu do standardowych konstrukcji *stirred-tank*. Podstawową wadą bioreaktorów z fazą gazową są trudności techniczne związane ze zwiększaniem skali hodowli (Curtis, 1993; Ramakrishnan i Curtis, 2004). Jak dotąd, praktycznie wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem systemów natryskowych prowadzone są w skali laboratoryjnej lub wielkolaboratoryjnej. W większości przypadków, stosowane są ponadto konstrukcje prototypowe, ze względu na ograniczoną dostępność rozwiązań komercyjnych (Tab. 5). Prace nad wykorzystaniem bioreaktorów z fazą gazową do przemysłowej produkcji związków prowadzi m.in. firma ROOTec bioactives (Witterswil, Szwajcaria) (Wink i wsp., 2005; Guillon i wsp., 2006).

Oprócz klasycznych konstrukcji, wykonanych ze szkła (skala laboratoryjna) lub stali nierdzewnej (skala techniczna), od szeregu lat w badaniach nad biosyntezą metabolitów wtórnych wykorzystywane są bioreaktory określane mianem jednorazowych (*disposable*), bądź ekonomicznych (*low-cost*). Charakterystyczną cechą wspomnianych konstrukcji jest duży udział tworzyw sztucznych i (najczęściej) fabryczna sterylizacja. Spośród zalet należy wymienić niskie koszty eksploatacji powyższych urządzeń, związane z brakiem konieczności mycia oraz sterylizacji naczyń reakcyjnych, jak również zmniejszone ryzyko zakażenia i pasażowania drobnoustrojów pomiędzy kolejnymi cyklami hodowlanymi (bioreaktor używany jest tylko raz) (Eibl i Eibl, 2008; Eibl i wsp., 2009a, b). Oprócz wymienionych właściwości, szereg bioreaktorów jednorazowego użytku umożliwia prowadzenie kultur w warunkach niskiego stresu mechanicznego. Należą do nich reaktory workowe pracujące w systemach typu „*wave*” (płaski zbiornik umieszczony na ruchomej kołysce), lub „*slug bubble*” (mieszanie kultury na drodze generowania pojedynczych, dużych pęcherzy gazu w umieszczonym pionowo podłużnym worku). Opisane konstrukcje są odpowiednie do prowadzenia kultur wrażliwych na działanie sił ścinających, np. zawiesin komórek, jak również kultur organowych. Pomimo prostej konstrukcji, reaktory typu „*wave*” zapewniają znaczny stopień kontroli mieszania i napowietrzenia hodowli poprzez sterowanie mechanizmem kołyski. Poza wymienionymi wyżej aplikacjami, bioreaktory workowe mogą być również wykorzystane w systemach *air-lift* lub *bubble column* (np. LifeReactor™, Osmotek, Rechowot, Izrael). Z punktu widzenia przemysłowego pozyskiwania metabolitów wtórnych, wadą bioreaktorów workowych może być ich względnie niewielka maksymalna pojemność robocza, wynosząca obecnie ok. 500 l (Terrier i wsp., 2007; Eibl i Eibl, 2008; Eibl i wsp., 2009a, b). Niektóre opracowania wskazują jednak, że w określonych sytuacjach opłacalne może być prowadzenie kultur w szeregu mniejszych reaktorach w zastępstwie jednego zbiornika o dużej pojemności. Zaletą wspomnianego sposobu postępowania jest m.in. ograniczenie strat spowodowanych ewentualnym zakażeniem kultury, jak również możliwość ciągłej produkcji substancji dzięki synchronizacji cykli hodowlanych w poszczególnych reaktorach. Mniejsza objętość naczyń reakcyjnych wpływa ponadto na obniżenie kosztów procesów *downstream*, co wynika zarówno z możliwości zastosowania instalacji mniejszych rozmiarów (niższe zużycie rozpuszczalników, kolumn chromatograficznych, *etc.*), jak również wykorzystania jednego systemu

preparatywnego do odzyskiwania metabolitów z szeregu bioreaktorów (Rouf i wsp., 2000).

Spośród reaktorów wykonanych z tworzyw sztucznych, przeznaczonych do wielokrotnego użytku, ograniczone zastosowanie (głównie do celów mikrorozmnażania) znalazły bioreaktory małej pojemności typu „Growtek” (Tarsons, Kalkuta, Indie) (Sharma i wsp., 2011) oraz systemy okresowo-zalewowe RITA[®] (Cirad, Saint-Mathieu-de-Trévières, Francja) (Georgiev i wsp., 2008). Ze względu na specyfikę konstrukcji, dostosowaną do potrzeb kultur pędowych oraz małą objętość roboczą, reaktory te nie znalazły zastosowania w produkcji metabolitów wtórnych metodami biotechnologicznymi. Znacznie lepsze efekty uzyskuje się z użyciem tzw. ekonomicznych reaktorów mgłowych (LCMB, *low-cost mist bioreactor*), wykorzystywanych do prowadzenia kultur korzeni włośnikowatych (Wink i wsp., 2005; Sivakumar i wsp., 2010). Dzielą one szereg zalet bioreaktorów typu natryskowego opisanych powyżej, cechując się ponadto znacznym obniżeniem kosztów konstrukcji (duży udział tworzyw sztucznych, naczynie hodowlane w postaci worka). Do bioreaktorów typu LCMB należą m.in. systemy opracowane przez firmę ROOTec (Wink i wsp., 2005; Guillon i wsp., 2006).

Ze względu na indywidualną specyfikę rozwiązań technologicznych związanych z produkcją poszczególnych związków naturalnych w bioreaktorach, poniżej przedstawiono najciekawsze procesy w formie tabelarycznej (Tab. 5), koncentrując się na rodzaju syntezowanych związków, wyjściowym gatunku roślinnym, typie kultury (zawiesinowa, korzeniowa, pędowa, *etc.*) oraz jej produktywności, jak również na oryginalnych protokołach eksperymentalnych, warunkujących uzyskanie określonych celów badawczych (rodzaj bioreaktora, zastosowane zabiegi doświadczalne: elicytacja, dokarmianie, *etc.*). Ze względu na obszerność tematyki związanej z pozyskiwaniem metabolitów roślinnych metodami biotechnologicznymi, w zestawieniu nie uwzględniono prac poświęconych produkcji białek transgenicznych oraz polisacharydów z wykorzystaniem kultur roślinnych. Opracowanie obejmuje w związku z tym jedynie aktywne biologicznie substancje drobnocząsteczkowe ze szczególnym uwzględnieniem alkaloidów, saponin, połączeń o budowie terpenowej oraz szeroko rozumianej grupy fenoli roślinnych (flawonoidy, antocyjany, kwasy i glikozydy fenolowe, stilbenoidy, *etc.*).

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
alkaloidy	<i>Catharanthus roseus</i> ;	ZK	AL; CIB;	hodowle prowadzone w systemie okresowym, okresowo-dolewowym i ciągłym; kultury immobilizowane;	Panda i wsp. (1989);
indolowe	<i>C. triciphyllus</i>		ETMR; FBR; MB; RD; ST; TB	możliwość prowadzenia kultur zawieszonych o wysokiej gęstości; stosunkowo duża odporność komórek na stres mechaniczny; możliwość zwiększenia skali hodowli (bioreaktory 7, 15, 30, 100 i 5000 l); z reguły niższe stężenia alkaloidów indolowych osiągnięte w fermentorach w porównaniu z kulturami wytrząsanymi; brak alkaloidów dwuindolowych (winkrystyna, winblastyna) o działaniu przecinowotworowym w kulturach <i>in vitro</i> ; zawartość ajmalicyny, w zależności od strategii hodowlanej i linii komórkowej, do 0,3 g l ⁻¹ ; możliwość zastosowania elicytacji oraz dokarmiania w celu zwiększenia biosyntezy alkaloidów; dobrze poznane szlaki biosyntezy oraz technologia prowadzenia hodowli w bioreaktorach (mieszanie, reologia, wymiana gazowa); zbyt niska produktywność hodowli dla celów komercyjnych	Buitelaar i Tramper (1992); Verpoorte i wsp. (1994); DiCosmo i Misawa (1995); Giri i Narasu (2000); Van Gulik i wsp. (2001); Zhang (2001); Verpoorte i wsp. (2002); Yang i wsp. (2003); Chattopadhyay i wsp. (2004); Wink i wsp. (2005); Zhao i Verpoorte (2007)
alkaloidy tropanowe	<i>Atropa belladonna</i> ;	KW; KO	AL; BCB; BCB/NSB;	zróżnicowanie tkankowe niezbędne do biosyntezy alkaloidów; dobrze poznane procesy elicytacji i permeabilizacji biomas; kultury w skali wielolaboratoryjnej; korzenie włośnikowate <i>A. belladonna</i> : zawartość atropiny w korzeniach rosnących w 30 l bioreaktorze typu <i>stirred-tank</i> porównywalna z korzeniami rośliny gruntowej (> 5 mg/g DW); pozostałe pochodne tropanu produkowane w mniejszych ilościach; korzenie włośnikowate <i>D. stramonium</i> : hodowla w systemie ciągłym i okresowym z wykorzystaniem 14 l bioreaktora <i>stirred-tank</i> ; maksymalne stężenia hioscyjaminy na poziomie ok. 8 mg/g DW w przypadku kultur okresowych, ok. 10 mg/g DW dla hodowli ciągłych; liczne eksperymenty z użyciem reaktorów o niewielkich rozmiarach (kilkaset ml – kilkanaście l pojemności): korzeni odciętych <i>S. parviflora</i> (bubble column bioreactor) , korzeni włośnikowatych <i>H. muticus</i> (bioreaktory <i>bubble column</i> , <i>air-lift</i> , <i>convective-flow</i> , <i>trickle bed</i> , <i>radial-flow</i> , <i>trickle bed/rotary drum</i> , <i>wave</i>), korzeni włośnikowatych <i>A. belladonna</i> (packed bed recirculation reactor) ; korzeni włośnikowatych <i>Duboisia leichhardtii</i> (stirred-tank, air-lift) , korzeni transformowanych <i>D. metel</i> (stirred-tank) ; aplikacje przemysłowe (skala pilotażowa): korzenie transformowane <i>D. stramonium</i> kulturowane w 500 l bioreaktorze hybrydowym (I faza – bioreaktor BCB; II faza – bioreaktor natryskowy), korzenie odcięte <i>A. belladonna</i> kulturowane w 500 l (poj. robocza 300 l) bioreaktorze typu <i>bubble column</i>	Hilton i Rhodes (1990); Curtis (1993); Kawamura i wsp. (1996); Cusido i wsp. (1999); Lee i wsp. (1999); Giri i Narasu (2000); Kim i wsp. (2002b); Ramakrishnan i Curtis (2004); Min i wsp. (2007); Srivastava i Srivastava (2007); Eibl i Eibl (2008); Mishra i Ranjan (2008); Cardillo i wsp. (2010)
alkaloidy izochinolinowe	<i>Coptis japonica</i> ;	ZK	ST	zawiesina <i>Coptis japonica</i> : zawartość berberyny do ok. 3,5-7,0 g l ⁻¹ hodowli; kultury ciągłe i okresowe (<i>batch i fed-batch</i>) o wysokiej gęstości (do 75 g DW l ⁻¹), bioreaktory typu <i>stirred-tank</i> pojemności od 2,5 do 6000 l (skala przemysłowa); zawiesina <i>Thalictrum minus</i> : wydzielanie berberyny do pożywki, hodowla komórek w bioreaktorze okresowo-zalewowym ze złożem fluidalnym (komórki immobilizowane za pomocą alginiatu wapnia, zawartość berberyny do 0,875 g l ⁻¹ hodowli; zawiesina <i>B. wilsoniae</i> : hodowle w 30 l bioreaktorach typu <i>stirred-tank</i> , zawartość protoberberyny do 3,0 g l ⁻¹	Kobayashi i wsp. (1987, 1988); Matsubara i wsp. (1989); DiCosmo i Misawa (1995); Mühlbach (1998); Doran (2000, 2010); Chattopadhyay i wsp. (2004)

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
alkaloidy	<i>Taxus baccata</i> ;	ZK;	AL; BCB;	dobrze poznane szlaki biosyntezy taksanów; możliwość zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych na drodze modyfikacji składu podłoża, elicytacji (jasmonian metylu), immobylizacji i dokarmiania (fenyloalanina); hodowle	Son i wsp. (2000); Zhong (2001, 2002); Tabata i wsp. (2004); Bentebibel i wsp. (2005); Qian i wsp. (2005); Sykłowska-Baranek i Furmanowa (2005); Frense i wsp. (2007); Kim i wsp. (2009); Doran (2010); Malik i wsp. (2011)
diterpenowe (paklitaksel, bakatyna III, 10-deacetylo- bakatyna III, taksujunamina C)	<i>T. cuspidata</i> ; <i>T. × media</i> ; <i>T. wallichiana</i> ; <i>T. chinensis</i> ; <i>T. yunnanensis</i>	KW	BTBB; CIB; ST; WB	biomas w systemach 2-etapowych (etapy: przyrostu biomasy oraz produkcji taksanów) i 2-fazowych; zawartość taksanów w kulturach <i>in vitro</i> na poziomie od kilkudziesięciu do kilkuset mg l ⁻¹ (produktywność od 1 do kilkudziesięciu mg l ⁻¹ d ⁻¹ , zmienne proporcje taksanów magazynowanych komórkowo i wydzielanych do podłoża, opracowana technologia prowadzenia kultur w bioreaktorach (dobrze poznane zagadnienia reologii kultur, mieszania i napowietrzania); hodowle komercyjne biomas na skalę przemysłową (reaktory do 75000 l pojemności (kaskada reaktorów poj. 75-750-7500-15000-75000 l); zawiesina T. baccata : hodowle immobylizowanych (alginian wapnia) komórek w bioreaktorach typu „wave” (2 l), <i>air-lift</i> (4 l) i <i>stirred-tank</i> (5 l), zawartość taksolu > 40 mg l ⁻¹ ; zawiesina T. cuspidata : hodowla komórek w 20 l bioreaktorach typu <i>stirred-tank</i> , <i>bubble column</i> (różne warianty konstrukcyjne), oraz balonowych; najlepszy wzrost biomasy uzyskany przy użyciu bioreaktorów balonowych, zwiększenie skali produkcji z wykorzystaniem 100 l i 500 l reaktorów balonowych (zawartość taksanów > 70 mg l ⁻¹ , taksolu ok. 3 mg l ⁻¹); korzenie włosnikowate T. cuspidata : hodowla w 10 l bioreaktorach <i>air-lift</i> , zawartość paklitaksolu do ok. 50 mg l ⁻¹ ; kultury zawiesinowe T. × media : hodowle w skali laboratoryjnej (7 l bioreaktor <i>stirred-tank</i>), wysoka zawartość 10-deacetylobakatyny III (37,5 mg l ⁻¹) w wyniku dokarmiania kultur L-fenyloalaniną; hodowle na skalę techniczną w systemie 2-etapowym; elicytowane kultury wysokiej gęstości (zawartość taksolu od 140 do 295 mg l ⁻¹ , 200 l bioreaktor <i>stirred-tank</i>); kultury zawiesinowe T. chinensis : znaczna zawartość taksujunaminy C (ok. 740 mg l ⁻¹) w wyniku 2 kolejnych elicytacji za pomocą pochodnych kwasu jasmonowego (1 l bioreaktor <i>air-lift</i>)	
alkaloidy	<i>Ophiorrhiza pumila</i> ;	ZK;	AL; ST	kultury O. pumila : śladowe ilości alkaloidów w kulturach parenchymatycznych; zawartość kamptotecyny w korzeniach włosnikowatych na poziomie 0,1–0,3 % DW, mniejsze ilości biomasy (w porównaniu z kulturą wytrąsaną) uzyskane w 3 l bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, porównywalna zawartość kamptotecyny w obydwu rodzajach hodowli, częściowe wydzielanie alkaloidów do podłoża wzrostowego; kultury zawiesinowe C. acuminata : hodowla w 5 l bioreaktorze <i>air-lift</i> , zawartość izokamptotecyny A i B (alkaloidy nieobecne w roślinie macierzystej), na poziomie odpowiednio ok. 3,5 i 1,2 % DW, zbliżona do kultur wytrąsanych; kultury zawiesinowe P. somniferum : hodowla komórek w 6 l bioreaktorach <i>air-lift</i> z systemem immobylizacji powierzchniowej w postaci biofilmu, zawartość sangwinaryny po elicytacji na poziomie 80 mg l ⁻¹ (0,52 % DW), niższa produktywność systemu w porównaniu do kultur wytrąsanych	Archambault i wsp. (1996); Sudo i wsp. (2002); Wink i wsp. (2005); Yu i wsp. (2005b)
chinolinowe (kamptotecyna, izokamptotecyna A; izokamptotecyna B; sangwinaryna)	<i>Camptotheca acuminata</i> ; <i>Papaver somniferum</i>	KW			

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
naftochinony (szikonina, plumbagina)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> ; <i>Arnebia euchroma</i> ; <i>Plumbago indica</i>	ZK; KW	AL, BCB, DHFR; PB; PSAB, RD, ST	kultury zawieszonowe <i>L. erythrorhizon</i> : wewnątrzkomórkowe magazynowanie szikoniny; wyższa zawartość barwnika w kulturach <i>in vitro</i> w porównaniu z rośliną gruntową; kultury komórkowe o zawartości szikoniny do 15% DW (ok. 4 g l ⁻¹); hodowla biomas na skalę przemysłową; 2-etapowy system hodowli, bioreaktory <i>stirred-tank</i> poj. 250 l (faza wzrostu) i 750 l (faza produkcyjna), także 1000 l bioreaktory typu <i>rotary drum</i> (zachowanie wysokiej produktywności wraz ze zwiększeniem skali hodowli); liczne doświadczenia z wykorzystaniem fermentatorów małej pojemności (okresowo-zanurzeniowy bioreaktor <i>air-lift</i> , bioreaktor membranowy DHFR, bioreaktor ze złożem upakowanym), korzenie włośnikowate <i>L. erythrorhizon</i> : kultury w reaktorach <i>air-lift</i> i <i>bubble column</i> , korzystny wpływ immobilizacji na zawartość szikoniny; kultury komórkowe <i>A. euchroma</i> : hodowla komórek prowadzona w 2 l okresowo-zalewowym bioreaktorze <i>air-lift</i> ; zawartość szikoniny (4,6% DW) wyższa w porównaniu z kulturą zawieszoną tej samej rośliny; korzenie włośnikowate <i>P. indica</i> : kultury prowadzone w 3 l bioreaktorze <i>bubble-column</i> , maksymalna zawartość plumbaginy w korzeniach elicytowanych za pomocą chitosanu i jasmonianu metylu na poziomie ok. 28 mg/g DW, wydzielenie plumbaginy do podłoża wzrostowego na skutek elicytacji	Curtin (1983); Kim i Chang (1990); Shimomura i wsp. (1991); Buitelaar i Tramper (1992); Sim i Chang (1993); DiCosmo i Misawa (1995); Su (1995); Harada i wsp. (1997); Ge i wsp. (2006); Srivastava i Srivastava (2007); Gangopadhyay i wsp. (2011)
saponiny triterpenowe (ginsenozydy)	<i>Panax ginseng</i> ; <i>P. quinquefolius</i> ; <i>P. notoginseng</i>	ZK; KW	AL; BCB; BTBB; CIB; DTBB; NSB; ST; WB	wysoka zawartość (do kilku g l ⁻¹) ginsenozydów w kulturach <i>in vitro</i> ; dobrze poznany wpływ procesów hodowlanych (mieszanie, napowietrzanie, wymiana gazowa, kinetyka wzrostu, zużycie substancji odżywczych) na produkcji ginsenozydów; kultury zawieszonowe : bioreaktory mieszająco-napowietrzające pojemności 2000-25000-75000 l wykorzystywane do prowadzenia hodowli zawieszonych na skalę przemysłową; kultury typu <i>batch</i> , <i>fed-batch</i> oraz praca w systemach półciągłym i ciągłym, wykorzystanie szeregu/kaskady reaktorów <i>stirred-tank</i> o rosnącej pojemności (75-750-7500-15000-75000 l) do kultur przemysłowych; możliwość zastosowania 2-etapowego systemu hodowli: etapy wzrostu biomasy (I) i produkcji ginsenozydów (II); zawartość saponin w kulturach zawieszonych do 900 mg l ⁻¹ (produktywność na poziomie ok. 20-30 mg l ⁻¹ d ⁻¹); możliwość prowadzenia kultur zawieszonych wysokiej gęstości w bioreaktorach typu <i>air-lift</i> oraz CIB (poj. 3-30 l); kultury korzeni odciętych : bioreaktory balonowe pojemności od 5 do 20 l (skala laboratoryjna), 100-300-500 l (skala pilotażowa) do 10000 l (hodowle przemysłowe); zawartość ginsenozydów do ok. 40 mg/g DW (produktywność na poziomie mg l ⁻¹ d ⁻¹); korzystny wpływ mechanicznego rozdrabniania korzeni w trakcie pracy reaktora (wybrane dni) na przyrost biomasy; kultury korzeni transformowanych : zawartość saponin do ok. 80 mg/g DW; modyfikowane (systemy immobilizacji) bioreaktory kolumnowe i mieszająco-napowietrzające; szybki wzrost korzeni włośnikowatych w bioreaktorach typu <i>bubble column</i> pojemności 3-20 l (większa wydajność procesu w porównaniu do innych typów bioreaktorów); liczne prace przeprowadzone z użyciem bioreaktorów o niewielkich rozmiarach; dobre rezultaty (w zakresie przyrostu biomasy i produkcji ginsenozydów) uzyskane przy użyciu bioreaktorów natryskowych (3 l) i fałowych (2 l)	Wu i Zhong (1999); Zhong i wsp. (1999); Zhong (2001); Chattopadhyay i wsp. (2002a, 2004); Han i Zhong (2002); Jeong i wsp. (2002); Palazón i wsp. (2003); Zhang i Zhong (2004); Jeong i Park (2005); Choi i wsp. (2008); Eibl i Eibl (2008); Paek i wsp. (2009); Doran (2010); Sivakumar i wsp. (2011); Baque i wsp. (2012)

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura		
saponiny	<i>Astragalus</i>	KW;	AL; BTBB	kultury korzeni włośnikowatych: 10 l bioreaktor typu <i>air-lift</i> , ilość biomasy oraz zawartość astragalozylu IV (1,4 mg/g DW) zbliżona do kultur wytrząsanych; kultury korzeni odciętych: 5 l bioreaktor balonowy, zwiększony przyrost biomasy w porównaniu z kulturami wytrząsanymi, zawartość saponin (3,4 mg/g DW) zbliżona do korzeni roślin gruntowych	Du i wsp. (2003); Wu i wsp. (2011)		
triterpenowe (astragalozyl IV)	<i>membranaceus</i>	KO					
saponiny	<i>Trigonella</i>	KW	AL	kultury prowadzone w 10 l bioreaktorze typu <i>air-lift</i> , zawartość diosgeniny (0,24 mg/g DW) wyższa w porównaniu z korzeniami rośliny macierzystej, porównywalna z ilościami oznaczonymi w nastonach	Rodriguez-Mendiola i wsp. (1991)		
triterpenowe (diosgenina)	<i>foenum-graecum</i>						
saponiny	<i>Solanum</i>	ZK	AL	kultury zawieszinowe prowadzone w 10 l bioreaktorze <i>air-lift</i> , zawartość saponiny SC-1 do 23 mg l ⁻¹ (produktywność do 25 mg l ⁻¹ d ⁻¹), praca w systemie <i>batch</i> oraz <i>draw-fill</i> (odprowadzenie biomasy i uzupełnienie pożywki w czasie pracy bioreaktora – produktywność zwiększona do 40 mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Villarreal i wsp. (1997)		
spirostanowe (SC-1)	<i>chrysotrichum</i>						
naftodiantrony (hyperycyna);	<i>Hypericum</i>	KO;	BTBB;	kultury korzeni odciętych: zawartość hyperycyny w korzeniach odciętych rosnących w 3 l bioreaktorze balonowym (ok. 1,4 mg/g DW) zbliżona do zawartości w roślinach gruntowych; możliwość zwiększenia skali hodowli (100 i 500 l bioreaktory balonowe, 500 l bioreaktor bębnowy) przy zachowaniu poziomu biosyntezy hyperycyny; zwiększenie produkcji metabolitów wtórnych w wyniku elicytacji jasmonianem metylu; kultury florogłucyny (hyperforyna)	P	DTBB	Zobayed i wsp. (2003); Cui i wsp. (2011); Baque i wsp. (2012)
pochodne	<i>perforatum</i>						
florogłucyny (hyperforyna)							
antrachiny (dammakantal /Morinda sp./, rubiadyna, alizaryna, pupuryrna, kwas rubertrynowy /Rubia tinctorum/)	<i>Morinda</i> <i>citrifolia</i> ; <i>Morinda</i> <i>elliptica</i> ; <i>Rubia</i> <i>tinctorum</i>	ZK; KO; KW	AL; BCB; BTBB; ST	kultury zawieszinowe M. citrifolia: dobrze poznane mechanizmy elicytacji i dokarmiania, umożliwiające zwiększenie poziomu biosyntezy metabolitów wtórnych; wyższa zawartość antrachinonów w zawieszinie hodowanej w bioreaktorze typu <i>air-lift</i> w porównaniu z konstrukcją typu <i>stirred-tank</i> ; stosunkowo niska zawartość antrachinonów (do ok. 17-19 mg/g DW) w hodowli zawieszinowej prowadzonej w 3 i 5 l bioreaktorach balonowych; korzenie odcięte M. citrifolia: zawartość antrachinonów w elicytowanych (jasmonian metylu) korzeniach rosnących w 500 l bioreaktorze balonowym na poziomie ok. 150 mg/g DW (26-krotnie więcej w porównaniu z korzeniami roślin gruntowych); wysoka zawartość rubiadyny (ok. 0,6 % DW) w korzeniach hodowanych w bioreaktorze balonowym poj. 500 l; kultury zawieszinowe M. elliptica: hodowle w 2 l bioreaktorze <i>stirred-tank</i> , zawartość antrachinonów do ok. 10 mg/g DW; korzenie włośnikowate R. tinctorum: hodowla w 10 l bioreaktorze bubble column, zawartość alizaryny (0,74 mg/g DW) i pupuryryny (2,5 mg/g DW) zbliżona do kultur wytrząsanych; hodowle na skalę techniczną w reaktorach <i>bubble column</i> poj. 100 l (0,8 g pigmentu w ciągu 21 dni); kultury zawieszinowe R. tinctorum: hodowla w 1,5 l bioreaktorze typu <i>stirred-tank</i> , słabszy wzrost oraz zwiększona zawartość antrachinonów w komórkach i medium wzrostowym (odpowiednio ok. 2,5 μmol/g FW i 700 μmol l ⁻¹) w porównaniu z kulturami wytrząsanymi (ok. 1,0 μmol/g FW i 300 μmol l ⁻¹), hodowle na skalę techniczną w reaktorach <i>bubble column</i> poj. 100 l (1,5 g pigmentu w ciągu 21 dni)	Panda i wsp. (1989); Misawa (1994); Abdullah i wsp. (2000); Bányai i wsp. (2006); Ahmed i wsp. (2008); Busto i wsp. (2008); Baque i wsp. (2012)		

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
kumaryny (eskulina)	<i>Cichorium intybus</i>	KW	BCB; NMB; NSB	najlepszy wzrost oraz produkcja eskuliny (18,5 g l ⁻¹) uzyskana przy użyciu 0,3 l bioreaktora z ultradźwiękowym wytornikiem mgły (NMB); gorsza produktywność (13–15 g l ⁻¹) w przypadku 3 l bioreaktora typu <i>bubble column</i> i 1 l reaktora natryskowego (NSB)	Bais i wsp. (2002)
pochodne kwasu kawowego	<i>Echinacea purpurea</i> ; <i>E. angustifolia</i> ;	ZK; KO;	BCB; BTBB; IL/ABSR; ST	kultury <i>in vitro Echinacea</i> sp. : kultury korzeni odciętych prowadzone w reaktorach pojemności 5-1000 l; zawartość kwasu chlorogenowego, cyklotowego i katarowego (odpowiednio 5,0, 22,0 i 4,0 mg/g DW) w korzeniach rosnących w 1000 l bioreaktorze balonowym, wyższa w porównaniu z materiałem gruntowym; możliwość podwyższenia produkcji metabolitów wtórnych na drodze elicytacji (nitroprusydek sodu, jasmonian metylu) i modyfikacji warunków hodowlanych (temperatura, oświetlenie); cykl hodowlany realizowany w systemie 2-etapowym: kultura korzeni prowadzona w ciemności dla lepszego przyrostu biomasy (etap I), a następnie w warunkach fotoperiodu 3 h światła/21 h ciemności (etap II) w celu stymulowania produkcji pochodnych kwasu kawowego; zawiesina C. deserticola : kultury komórek w 2 l bioreaktorze <i>air-lift</i> z systemem immobilizacji komórek, korzystny wpływ immobilizacji na zawartość metabolitów wtórnych, zawartość glikozydów fenyloetanolowych (m.in. echinakozyd, akteozyd) na poziomie 0,85 g l ⁻¹ (ponad 100% więcej w porównaniu z 2 l bioreaktorem kolumnowym); zawiesina H. procumbens : wysoka zawartość akteozydu (ok. 450 mg l ⁻¹) i leukosceptozydu A (ok. 100 mg l ⁻¹) w kulturze prowadzonej w 3 l bioreaktorze typu <i>stirred-tank</i> ; kultury w 1 l bioreaktorze kolumnowym z napowietrzaniem pulsacyjnym (zawartość akteozydu do 500 mg l ⁻¹ , stężenie leukosceptozydu A < 100 mg l ⁻¹); korzenie włośnikowate H. procumbens : kultury prowadzone w 3 l bioreaktorze <i>stirred-tank</i> , zawartość akteozydu na poziomie ok. 1 mg/g DW, zbliżona do kultur wytrząsanych	Ouyang i wsp. (2005a); Jeong i wsp. (2009); Georgiev i wsp. (2011); Homova i wsp. (2010); Baque i wsp. (2012)
chlorogenowy i cykoriowy, cynaryna, echinakozyd, akteozyd, β-OH-akteozyd, leukosceptozyd A)	<i>Cistanche deserticola</i> ; <i>Harpagophytum procumbens</i>	KW			
kwas rozmarynowy	<i>Anchusa officinalis</i> ; <i>Coleus blumei</i> ; <i>Lavandula vera</i> ; <i>Salvia officinalis</i>	ZK; KW	FSTR; NSB; PB; ST	zawiesina A. officinalis : kultury o wysokiej gęstości prowadzone w 2,5 l reaktorach <i>stirred-tank</i> z filtracją <i>in situ</i> , umożliwiających wymianę pożywki w czasie trwania cyklu wzrostowego, zawartość kwasu rozmarynowego na poziomie 3,7 g l ⁻¹ (napowietrzanie tradycyjne) lub 1,3 g l ⁻¹ (napowietrzanie za pośrednictwem membrany); zawiesina C. blumei : kultury na skalę wielkolaboratoryjną w bioreaktorach poj. do 42 l (zawartość kwasu rozmarynowego do 5,5 g l ⁻¹), korzystny wpływ immobilizacji (komórki umieszczone w kolumnie laboratoryjnego reaktora PB wypełnionej materiałem <i>Luffa cylindrica</i>) na zawartość kwasu rozmarynowego; zawiesina L. vera : hodowla prowadzona w 3 l bioreaktorze <i>stirred-tank</i> , zawartość kwasu rozmarynowego na poziomie ok. 3,5 g l ⁻¹ ; korzenie włośnikowate S. officinalis : kultury prowadzone w 5 l bioreaktorze natryskowym (NSB), zawartość kwasu rozmarynowego (ok. 35 mg/g DW) nieznacznie niższa w porównaniu z kulturami wytrząsanymi (ok. 42 mg/g DW) i ok. 5-krotnie wyższa w porównaniu z korzeniami roślin gruntowych	Su i Humphrey (1991); Sasson (1992); Martinez i Park (1994); Pavlov i wsp. (2005) Su i wsp. (1995); Doran (2000, 2010); Park i wsp. (2008); Grzegorzczak i Wysokińska (2010)
sekoirydoidy (genejopikrozyd, swerozyd, swercjamaryna)	<i>Centaurium erythraea</i>	P	NSB	kultury prowadzone w 5 l bioreaktorze natryskowym; zawartość sekoirydoidów (300 mg l ⁻¹) 6-krotnie większa w porównaniu z kulturami wytrząsanymi	Piąteczak i wsp. (2005a)

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
lignany (podoofilotoksyna; 6-metoksy- podoofilotoksyna)	<i>Podophyllum hexandrum</i> ; <i>Linum album</i> ; <i>L. persicum</i>	ZK; KW	LCMB, ST	zawiesina P. hexandrum : kultury typu <i>batch</i> , <i>fed-batch</i> , oraz praca w systemie ciągłym; zwiększona produkcja podoofilotoksyny w warunkach całkowitej ciemności; zawartość podoofilotoksyny w 3 l bioreaktorze <i>stirred-tank</i> (ok. 48 mg l ⁻¹ , 0,8 mg l ⁻¹ d ⁻¹ , system ciągły) wyższa w porównaniu z hodowlami wytrąsanymi; zawiesina L. album : kultury w bioreaktorach pojemności 5-20 l; produkcja podoofilotoksyny na poziomie > 170 mg l ⁻¹ (5 l bioreaktor <i>stirred-tank</i>); korzenie włośnikowate L. persicum i L. album : kultury w bioreaktorze z fazą gazową (LCMB), zawartość 6-metoksy-podoofilotoksyny na poziomie 37-56 mg/g DW	Arroo i wsp. (2002); Chattopadhyay i wsp. (2002b, 2003, 2004); Farkya i wsp. (2004); Wink i wsp. (2005); Baldi i wsp. (2008)
laktony seskwiterpenowe (artemizynina)	<i>Artemisia annua</i>	KW; P	AL; BCB; LCMB; MPRFB; NMB	peły in vitro : kultury prowadzone w bioreaktorze <i>air-lift</i> , przepływowym bioreaktorze półkowym (MPRFB) i bioreaktorze z fazą gazową (NMB); najlepszy przyrost biomasy oraz produkcja artemizyniny (48 mg l ⁻¹) uzyskane w przypadku konstrukcji NMB; korzenie włośnikowate : zawartość metabolitów wtórnych niższa niż w kulturach pedowych, prawie 3-krotnie wyższa zawartość artemizyniny (0,03 mg l ⁻¹) w bioreaktorze NMB w porównaniu do konstrukcji <i>bubble-column</i> , lepszy wzrost korzeni (w porównaniu do konstrukcji podstawowej NMB) w reaktorze (poj. 2,3 l) z wewnętrzną rurą cyrkulacyjną (MINMB, <i>modified inner-loop nutrient mist bioreactor</i>); możliwe zwiększenie skali: hodowli przy użyciu ekonomicznych reaktorów typu LCMB (poj. do 20 l)	Liu i wsp. (1998, 1999, 2003); Kim i wsp. (2002a); Sivakumar i wsp. (2010)
diterpenoidy (feruginol, salwipizon, etiopinon, kwas karnozowy, karnozol, kwas skopadulkowy B)	<i>Salvia sclarea</i> ; <i>Salvia officianalis</i> ; <i>Scoparia dulcis</i>	ZK; KW; P	PB; NSB	korzenie włośnikowate S. sclarea : kultury prowadzone w 10 l bioreaktorze natryskowym, najwyższa zawartość diterpenoidów (59 mg/g DW, 330 mg l ⁻¹) w korzeniach elicytowanych za pomocą jasmonianu metylu; niższa zawartość diterpenoidów w elicytowanych kulturach wytrąsanych (29 mg/g DW); peły S. officianalis : kultury prowadzone w 5 l bioreaktorze natryskowym (NSB), zawartość kwasu karnozowego i karnozolu na poziomie odpowiednio 1,7 i 1,34 mg l ⁻¹ , ok. 2-krotnie mniejsza w porównaniu z kulturami stacjonarnymi; zawiesina S. dulcis : kultura prowadzona w 1 l bioreaktorze typu <i>packed-bed</i> , immobilizacja komórek przy użyciu gąbki roślinnej <i>Luffa cylindrica</i> , zawartość kwasu skopadulkowego B w biomacie rosnącej w bioreaktorze (ok. 350 mg/g DW) wyższa w porównaniu z immobilizowanymi hodowlami wytrąsanymi (ok. 50 mg/g DW)	Kuźma i wsp. (2009); Mathew i Jayachandran (2009); Grzegorzczak i Wysokińska (2010)
monoterpeny (linalol, octan linalylu, limonen, mentol, mentofuran, pulegon)	<i>Mentha citrata</i> ; <i>M. × piperita</i>	TP	NSB	kultury teratomów pedowych prowadzone w 14 l bioreaktorze natryskowym, zawartość monoterpenów (ok. 70 i 340 µg/g FW odpowiednio dla <i>M. citrata</i> i <i>M. × piperita</i>) niższa w porównaniu z kulturami wytrąsanymi	Hilton i wsp. (1995)
laktony (sotolon)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	KW	AL	kultury korzeni włośnikowatych prowadzone w 10 l bioreaktorze typu <i>air-lift</i> , zawartość oleju eterycznego 0,06 % (odpowiadająca 2 % DW oleozywicy)	Peraza-Luna i wsp. (2001)

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
glikozydy fenylopropanoidowe (eleuterozyd B /syringina;/ eleuterozyd E)	<i>Eleutherococcus koreanum</i> ; <i>Saussurea medusa</i>	ZK; KO	BCB; BTBB; IL/ABSĐT	korzenie odcięte <i>E. koreanum</i> : zawartość eleuterozydów B i E wynosząca odpowiednio do ok. 60 i 110 mg/g DW po 5 tygodniach prowadzenia kultury w 3 l bioreaktorze balonowym; zawiesina <i>S. medusa</i> : kultura prowadzona w zmodyfikowanym bioreaktorze <i>air-lift</i> (IL/ABSĐT), zawartość syringiny (ok. 186 mg l ⁻¹ , do 17 mg/g) zbliżona do kultur wytrząsanych, wyższa w porównaniu do bioreaktora kolumnowego (145 mg l ⁻¹), najwyższa produktywność w przypadku bioreaktora IL/ABSĐT (ok. 12 mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Xu i wsp. (2008); Lee i wsp. (2011)
stilbenoidy (resweratrol, resweratrolozyd, piceid, winiferyny)	<i>Vitis vinifera</i> ; <i>Arachis hypogaea</i>	ZK; KW	BTBB; LCMB; ST	zawiesina <i>V. vinifera</i> : kultury prowadzone w 1, 2 i 20 l bioreaktorach typu <i>stirred-tank</i> ; zwiększenie produkcji stilbenoidów na drodze elicytacji (jasmonian metylu, chitosan); zawartość stilbenoidów na poziomie 50-280 mg l ⁻¹ , wydzielenie metabolitów wtórnych do medium wzrostowego; korzenie włosnikowate <i>A. hypogaea</i> : hodowle w 5 l bioreaktorze BTBB oraz bioreaktorach z fazą gazową typu LCMB (1-20 l pojemności), zwiększona biosynteza stilbenoidów na skutek elicytacji (octan sodu), produkcja resweratrolu na poziomie 18-35 mg l ⁻¹	Decedit i wsp. (1996); Aumont i wsp. (2004); Medina-Bolivar i wsp. (2007); Donnez i wsp. (2011); Ferri i wsp. (2011); Sivakumar i wsp. (2010, 2011)
aminy	<i>Sizobolium hassjo</i>	ZK; KW	NMB; ST	zawiesina komórek : kultury prowadzone w 1, 5 i 7 l bioreaktorach typu <i>stirred-tank</i> , zawartość L-DOPY na poziomie ok. 4-11 % DW; możliwe prowadzenie hodowli w systemie 2-etapowym (odmienne medium wzrostowe i produkcyjne) w celu zwiększenia produktywności kultury; korzenie włosnikowate : kultura korzeni w 3 l bioreaktorze z fazą gazową, zawartość L-DOPY na poziomie ok. 5-8 % DW	Huang i Chen (1998); Chen i Huang (2000); Huang i wsp. (2002); Sung i Huang (2006)
poliacetyleny (lobetyolina, lobetyolimina)	<i>Lobelia inflata</i>	KW	BTBB	Kultury korzeniowe prowadzone w 10 l bioreaktorze balonowym, zawartość lobetyliny i lobetyoliminy na poziomie odpowiednio 3,6 i 1,6 % DW	Bálványos i wsp. (2004)
antocyjany, proantocyjanidyny	<i>Vitis vinifera</i> ; <i>Perilla frutescens</i> ; <i>Aralia cordata</i>	ZK	AF; RPB; ST	zawiesina <i>V. vinifera</i> : kultury prowadzone w 20 l bioreaktorze <i>stirred-tank</i> , wzrost biomasy oraz zawartość antocyjanów (1200 mg l ⁻¹) i proantocyjanidym (220 mg l ⁻¹) zbliżone do hodowli wytrząsanych; kultury o zwiększonej lepkości (dodatek karboksymetylocelulozy) prowadzone w 0,5 l bioreaktorze <i>air-lift</i> , zawartość antocyjanów na poziomie ok. 30 mg l ⁻¹ ; kultury prowadzone w eksperymentalnym, 17 l bioreaktorze, wyposażonym w system ruchomych, perforowanych płyt mieszających (RPB), parametry wzrostowe zawiesiny zbliżone do hodowli wytrząsanych; zawiesina <i>P. frutescens</i> : kultury w bioreaktorach <i>stirred-tank</i> pojemności 5 l (zawartość antocyjanów do ok. 120 mg/g DW), lub 2,6 l (stężenie antocyjanów do 1,65 g l ⁻¹), korzystny wpływ światła na zawartość antocyjanów; zawiesina <i>A. cordata</i> : kultury prowadzone w 10, 95 i 500 l bioreaktorach typu <i>stirred-tank</i> , zawartość antocyjanów do ok. 17 % DW, biosynteza antocyjanów bez dostępu światła	Kobayashi i wsp. (1993); Zhong i wsp. (1993, 1994); Decedit i wsp. (1996); Gagnon i wsp. (1999) Zhang i Furusaki (1999); Honda i wsp. (2002)
limonoidy (azadirachtyna)	<i>Azadirachta indica</i>	ZK	ST	kultury zawiesinowe prowadzone w 3 l bioreaktorze <i>stirred-tank</i> , elicytacja komórek zawiesiny za pomocą chitosanu oraz kwasu salicylowego i jasmonowego, zawartość azadirachtyny na poziomie ok 160 mg l ⁻¹	Prakash i Srivastava (2008)

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
poходne indolu (betalainy)	<i>Beta vulgaris</i>	ZK; KW	AL; BCB; CFBB; ETMR; FBR; NMB; ST; RITA® <i>temporari</i> <i>immersion</i> <i>system</i> (Cirad, Saint-Mathieu-de-Trévières, Francja)	zawiesina komórek: kultury prowadzone z użyciem różnych typów reaktorów, 5 i 50 l reaktory ze złożem fluidalnym (zawartość betalain od 12 do 25 mg/g DW, porównywalna z kulturami wytrąsanymi), 2 l bioreaktor typu <i>stirred-tank</i> (zawartość do 15 mg/g DW, niższa w porównaniu z kulturami wytrąsanymi), bioreaktor <i>air-lift</i> (zawartość ok. 9 mg/g DW); zastosowanie elektropemabilizacji w celu pobudzenia wydzielania betalain do podłoża wzrostowego (membranowy reaktor elektroforetyczny); korzenie włosnikowate : kultury z wykorzystaniem różnych typów reaktorów: <i>stirred-tank</i> (zawartość betalain do 10 mg/g DW), reaktory pneumatyczne (zawartość do 27 mg/g DW); kultury prowadzone w 3 l bioreaktorze cyrkulacyjnym CFBB, lepszy wzrost biomasy oraz produkcja betalain (125 mg l ⁻¹), w porównaniu z bioreaktorem kolumnowym; zwiększenie zawartości betalain do 280 mg l ⁻¹ w wyniku elicytacji pululianem (bioreaktor kolumnowy); wydzielanie betalain do podłoża wzrostowego pod wpływem permeabilizacji; możliwość odzyskiwania barwników z użyciem ekstrakcji <i>in situ</i> ; kultury w bioreaktorze typu <i>nutrient mist</i> (stężenie betalain porównywalne z hodowlami wytrąsanymi); kultury korzeniowe z wykorzystaniem systemu okresowego zalewowego RITA® (stężenie betalain do 19 mg/g DW)	Yang i wsp. (2003); Savitha i wsp. (2006); Pavlov i wsp. (2007); Georgiev i wsp. (2008); Moreno i wsp. (2008); Neelwarne i Thimmaraju (2009)
izoflawony (genisteina, genistyna, daidzeina, daidzyna, pueraryna)	<i>Glycine max</i> ; <i>Pueraria lobata</i> ; <i>P. tuberosa</i> ; <i>P. phaseoloides</i> ; <i>Genista tinctoria</i>	ZK; KW; P	AL; BCB; MFB; ST; WU; SB; "Growtek" (Tarsons, Kalkuta, Indie)	zawiesina Glycine max : różne typy bioreaktorów; 10 l reaktor typu <i>stirred-tank</i> , zawartość izoflawonów (suma pochodnych genisteiny i daidzeiny) na poziomie 880 mg l ⁻¹ (7% DW); 1,5 l bioreaktor magneto-fluidyacyjny (MFB), immobilizacja komórek wraz z cząstkami magnetytu za pomocą alginianu wapnia, przepływ zawiesiny kontrolowany za pomocą pola magnetycznego, produkcja izoflawonów w systemie ciągłym, przyrost biomasy oraz zawartości daidzeiny i genisteiny (0,01-0,2 mg/g DW), niższe w porównaniu do hodowli wytrąsanych; kultury w bioreaktorach typu „ <i>wave and undertow</i> ” (WU) poj. 10, 20, 30 i 100 l oraz „ <i>slug bubble</i> ” poj. 20 i 50 l, sumaryczna zawartość izoflawonów w 30 l bioreaktorze WU (120 mg/g DW) wyższa niż w przypadku kultur wytrąsanych (61 mg/g DW) oraz prowadzonych w 10 l reaktorze <i>stirred-tank</i> i 50 l reaktorze SB (zawartość odpowiednio 28 i 48 mg/g DW); zawiesina P. tuberosa : kultury prowadzone w 2 l bioreaktorze typu <i>stirred-tank</i> , sumaryczna zawartość izoflawonów (genisteina, genistyna, pueraryna, daidzyna) na poziomie ok. 76 mg l ⁻¹ (6,4 mg/g DW), porównywalna z kulturami wytrąsanymi; pędy P. tuberosa : kultura prowadzona w bioreaktorze „Growtek” (400 ml), zawartość pueraryny do 1,5 mg/g DW; zawiesina P. lobata : kultura prowadzona w 5 l bioreaktorze <i>stirred-tank</i> , sumaryczna zawartość izoflawonów na poziomie ok. 330 mg l ⁻¹ , stężenie pueraryny ok. 73 mg l ⁻¹ ; korzenie włosnikowate P. phaseoloides : kultura prowadzona w 2,5 l bioreaktorze <i>air-lift</i> , zawartość pueraryny na poziomie > 5 mg/g DW (200-krotnie więcej w porównaniu z hodowlą wytrąsaną); biomasy in vitro G. tinctoria : hodowla pędów i korzeni transformowanych w systemie kokultury przy użyciu 1,2 l bioreaktora balonowego, biotransformacja wytwarzanej w korzeniach izolikwirygeniny do pochodnych daidzeiny przez biomasę pędową, wysoka zawartość genistyny (ok. 7 % DW) oraz daidziny (> 1,5 % DW) w pędach rosnących w systemie kokultury	Ames i Worden (1997); Federici i wsp. (2003); Kintzios i wsp. (2004); Łuczkiwicz i Kokotkiewicz (2005a); Chen i Li (2007); Terrier i wsp. (2007); Sharma i wsp. (2009, 2011)

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – kontynuacja.

Produkowane związki	Gatunek	Rodzaj biomasy ^a	Użyte typy bioreaktorów ^b	Szczegóły doświadczeń/rezultaty	Literatura
flawony (baikalina, baikalina, wogonina)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	P	BTBB; LVF; STB; TIB; LifeReactor™ (Osrotek, Rechowot, Izrael)	najlepszy wzrost pedów w przypadku bioreaktorów balonowych i systemów okresowo-zależowych; najwyższa zawartość flawonoidów w pedach hodowanych w bioreaktorach typu LVF z zestalonym podłożem i atmosferą wzbogaconą CO ₂ (ok. 5,5 mg/g DW baikaliny, 1,75 mg/g DW baikaliny, 0,15 mg/g DW wogoniny) i systemach okresowo-zależowych (ok. 2,5 mg/g DW baikaliny, 2,0 mg/g DW baikaliny, 0,1 mg/g DW wogoniny); niższe stężenia odnotowane w przypadku bioreaktorów balonowych, bioreaktora z silikonową wężownicą napowietrzającą, oraz bioreaktora workowego LifeReactor™	Zobayed i wsp. (2004)
chalkony (izolikwirytygenina), <i>tinctoria</i> ; bichalkony (żółcień saflarowa, <i>tinctorius</i> kartamina)	<i>Genista tinctoria</i> ; <i>Carthamus tinctorius</i>	ZK; KW	BCB; BTBB	korzenie włośnikowate <i>G. tinctoria</i> : wzrost biomasy w 1 l bioreaktorze typu <i>bubble-column</i> , zawartość izolikwirytygeniny do 2,3 % DW; kultury zawieszinowe <i>C. tinctorius</i> : kultura prowadzona w systemie 2-etapowym, wzrost biomasy (etap I, 10 l bioreaktor balonowy) oraz faza produkcyjna (etap II, 5 l bioreaktor kolumnowy), zawartość barwnika żółtego (żółcień saflarowa) i czerwonego (kartamina) odpowiednio do ok. 9,0 i 0,5 mg/g FW	Gao i wsp. (2000); Łuczkiwicz i Kokotkiewicz (2005b)
tiofeny	<i>Tagetes patula</i>	KW	BCB; LILR; NMB; NSB; ST	najwyższa zawartość pochodnych tiofenu (2,0 mg l ⁻¹) odnotowana w przypadku korzeni włośnikowatych rosnących w 0,3 l bioreaktorze typu <i>nutrient mist</i> (stężenie porównywalne z kulturami wytrząsanymi, 1,4-krotnie większe w porównaniu do 3 l bioreaktora kolumnowego i 1 l reaktora natryskowego); zastosowanie konstrukcji z dwoma fazami ciekłymi, najwyższa zawartość pochodnych tiofenu (> 20 μmol/g DW) w przypadku konstrukcji <i>bubble-column</i> z użyciem heksadekanu jako fazy organicznej, pobudzenie produkcji i wydzielania tiofenów do podłoża w systemach 2-fazowych (woda/rozpuszczalnik organiczny)	Buitelaar i wsp. (1991); Suresh i wsp. (2005)
glikozydy kardenolidowe (digoksyna, deacetylolanatozyd C)	<i>Digitalis lanata</i>	ZK	AL, ST	bioreaktory <i>air-lift</i> pojemności 20 l: produkcja deacetylolanatozydu C na drodze biotransformacji digitoksyny (dokarmianie), systemy okresowe i półciągłe, 2-etapowe: I – wzrost biomasy, II – biotransformacja digitoksyny, zawartość deacetylolanatozydu C na poziomie 408–484 mg l ⁻¹ ; bioreaktory <i>air-lift</i> pojemności 20 i 300 l: produkcja digoksyny (biotransformacja digitoksyny) w systemie okresowym lub półciągłym, zawartość digoksyny na poziomie 408–484 mg l ⁻¹ ; bioreaktory <i>air-lift</i> i stirred tank pojemności 20–27 l: biokonwersja β-metyldigitoksyny do β-metyldigoksyny (zawartość po biotransformacji na poziomie 600–800 mg l ⁻¹), biokonwersja w reaktorach <i>air-lift</i> pojemności do 300 l (system półciągły, > 90 % wydajności); bioreaktory <i>stirred-tank</i> pojemności 40 l: produkcja deacetylolanatozydu C (biotransformacja digitoksyny) w systemie półciągłym, 1-etapowym (ok. 70 % wydajność)	Spieler i wsp. (1985); Panda i wsp. (1989); Reinhard i wsp. (1989); Kreis i Reinhard (1990, 1992); Fulzele i wsp. (1992); DiCosmo i Misawa (1995); Mühlbach (1998)
glikozydy fenolowe (arbutyna)	<i>Catharanthus roseus</i>	ZK	ST	hodowla prowadzona w 5 i 20 l bioreaktorach typu <i>stirred-tank</i> , glukozylacja egzogenego hydrochinonu (podaj ciągła), zawartość arbutyny do 45 % DW (odpowiadająca ok. 9,0 g l ⁻¹), wydajność glukozylacji 98 %	Inomata i wsp. (1991); Misawa (1994); Skrzypczak-Pietraszek i wsp. (2005)

Tab. 5. Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* prowadzonych w bioreaktorach – objaśnienia skrótów.

^a **KO**, korzenie odcięte; **KW**, korzenie włośnikowate; **P**, pędy; **TP**, teratomy pędowe; **ZK**, zawieszina komórek.

^b **AL**, bioreaktor *air-lift*; **BCB**, bioreaktor kolumnowy (*bubble column bioreactor*); **BCB/NSB**, bioreaktor hybrydowy typu *bubble column/nutrient sprinkle bioreactor*; **BTBB**, bioreaktor balonowy (*bubble type balloon bioreactor*); **CFB**, bioreaktor konwekcyjny (*convective flow bioreactor*); **CFBB**, bioreaktor cyrkulacyjny w systemie *fed-batch* (*circulation fed-batch bioreactor*); **CIB**, bioreaktor z wirnikiem odśrodkowym (*centrifugal impeller bioreactor*); **DHFR**, bioreaktor membranowy DHFR (*dual hollow fibre reactor*); **DTBB**, bioreaktor bębnowy (*drum type bubble bioreactor*); **ETMR**, membranowy bioreaktor elektroforetyczny (*electrophoretic tubular membrane reactor*); **FBR**, bioreaktor ze złożem fluidalnym (*fluidized-bed reactor*); **FSTR**, bioreaktor mieszająco-napowietrzający z filtracją *in situ*; **ILABSDT**, bioreaktor *air-lift* z perforowaną rurą cyrkulacyjną (*internal loop air-lift bioreactor with sifter draft tube*); **ILABSR**, bioreaktor *air-lift* z systemem immobilizacji komórek (*internal loop airlift bioreactor with sifter riser*); **LCMB**, ekonomiczny bioreaktor mgłowy (*low-cost mist bioreactor*); **LILR**, bioreaktor 2-fazowy z obiegiem pożywki wymuszonym poprzez strumień rozpuszczalnika organicznego (*liquid impelled loop reactor*); **LVF**, bioreaktor z zestalonym medium i wymuszoną wentylacją (*large vessel with gelled medium under forced ventilation*) **MB**, bioreaktor membranowy (*membrane bioreactor*); **MFB**, bioreaktor magnetofluidyzacyjny (*magnetofluidized bed bioreactor*); **MPRFB**, wielopółkowy bioreaktor przepływowy (*multi-plate radius-flow bioreactor*); **NMB**, bioreaktor mgłowy (*nutrient mist bioreactor*); **NSB**, bioreaktor natryskowy (*nutrient sprinkle bioreactor*); **PB**, bioreaktor ze złożem upakowanym (*packed-bed*); **PBRR**, bioreaktor z recyrkulacją pożywki i recyrkulacją pożywki (*packed-bed recirculation reactor*); **PSAB**, okresowo-zanurzeniowy bioreaktor *air-lift* (*periodically submerged air-lift bioreactor*); **RD**, bioreaktor z obrotowym bębniem (*rotary-drum*); **RPB**, bioreaktor z systemem perforowanych płyt mieszających (*reciprocating plate bioreactor*); **SB**, bioreaktor „*slug bubble*”; **ST**, bioreaktor mieszająco-napowietrzający (*stirred-tank*); **STB**, bioreaktor z wężownicą silikonową (*silicone tubing bioreactor*); **TIB**, bioreaktor okresowo-zalewowy (*temporary immersion bioreactor*); **WB**, bioreaktor falowy (*wave bioreactor*); **WU**, bioreaktor falowy typu „*wave and undertow*”.

Zebrane dane literaturowe wskazują na istniejące problemy badawcze, związane z otrzymywaniem związków naturalnych w oparciu o kultury *in vitro* roślin wyższych oraz na kierunki badań inżynierskich, które będą zmierzały w przyszłości przede wszystkim do dalszego obniżania kosztów produkcji wtórnych metabolitów w bioreaktorach oraz rozwiązania problemów związanych z zapewnieniem sterylności procesowej. Wydaje się jednocześnie, że komplikacje natury technicznej, związane z dostosowaniem biomas roślinnych do wzrostu w bioraktorach, nie są podstawowym czynnikiem ograniczającym rozwój opisywanej gałęzi biotechnologii. Świadczą o tym liczne aplikacje wspomnianych instalacji technicznych do prowadzenia kultur roślinnych, zarówno zawieszinowych jak i organowych, mogących znaleźć zastosowanie jako bogate źródło większości rodzajów metabolitów wtórnych. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że w szeregu przypadkach powiodła się również adaptacja biomas do kultur wielkoskalowych, wykorzystywanych w celach komercyjnych. Dowodzi to, że przy odpowiednim nakładzie środków, możliwe jest opracowanie systemów do przemysłowej produkcji wybranych połączeń naturalnych z użyciem komórek, bądź organów roślinnych. Z drugiej strony, istotne ograniczenie dla komercyjnego wykorzystania szeregu kultur stanowi brak, bądź stosunkowo niskie poziomy metabolitów wtórnych w biomasach *in vitro*, porównywalne z materiałem gruntowym. Z tego względu, tańszą alternatywę dla metod biotechnologicznej produkcji związków naturalnych o dużej wartości rynkowej, stanowi w wielu przypadkach ich izolacja z surowców gruntowych, z pominięciem stosunkowo nielicznych przykładów roślin zagrożonych, endemicznych, a także wolno rosnących. Dalszego rozwoju opisywanej technologii można wobec powyższego upatrywać w metodach inżynierii genetycznej, ukierunkowanych na podwyższenie poziomów akumulacji poszukiwanych połączeń w biomasach *in vitro*. Biorąc pod uwagę fakt, że dla kultur *in vitro* szeregu roślin wyższych, zdolnych do produkcji cennych metabolitów wtórnych, opracowano jak dotąd warunki do wzrostu w instalacjach technicznych, kluczowe jest osiągnięcie w powyższych hodowlach stężeń związków opłacalnych z komercyjnego punktu widzenia. Zdobyty zasób wiedzy, dotyczącej prowadzenia roślinnych kultur wielkoskalowych, będzie mógł być wówczas wykorzystany do opracowania systemów do biotechnologicznej produkcji połączeń o określonej bądź spodziewanej aktywności biologicznej.

Wykaz skrótów stosowanych w badaniach eksperymentalnych (rozdz. II i III)

ANOVA	analiza wariancji
BAP	6-benzyloaminopuryna, benzyloadenina
¹³C NMR	spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> ; spektroskopia korelacyjna
4-CPPU	<i>N</i> -(2-chloro-4-pirydylo)- <i>N'</i> -fenylomocznik, forchlorfenuron
1D NMR	jednowymiarowa spektroskopia NMR
2D NMR	dwuwymiarowa spektroskopia NMR
2,4-D	kwask 2,4-dichlorofenoksyoctowy
DAD	<i>diode array detector</i> ; detektor z matrycą diodową
DMRT	test porównań wielokrotnych Duncana; <i>Duncan's multiple range test</i>
DMSO-<i>d</i>₆	deuterowany dimetylosulfotlenek
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DQF	<i>double quantum filter</i> ; filtr przejść dwukwantowych
DW	sucha masa
ESI	<i>electrospray ionization</i> ; jonizacja przez elektrorozproszenie
FW	świeża masa
gCOSY	<i>gradient COSY</i> ; gradientowa spektroskopia korelacyjna
gHMBC	<i>gradient heteronuclear multiple bond coherence</i> ; heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu
gHSQC	<i>gradient heteronuclear single quantum coherence</i> ; heterojądrowa korelacja z detekcją przejść kwantowych
Gi	współczynnik przyrostu
¹H NMR	spektroskopia protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> ; wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSCCC	<i>high-speed countercurrent chromatography</i> , wysokosprawna chromatografia przeciuprądowa
IAA	kwask indolilo-3-octowy
IBA	kwask indolilo-3-masłowy
2iP	(6- γ,γ -dimetyloallilo)-aminopuryna, <i>N</i> ⁶ -(2-izopentenylo)-adenina
IPA	kwask indolilo-3-propionowy
ITS1, 2	<i>internal transcribed spacer 1, 2</i> ; wewnętrzne transkrybowane sekwencje rozdzielające 1 i 2
KN	kinetyna, <i>N</i> ⁶ -furfuryloadenina
LC	<i>liquid chromatography</i> ; chromatografia cieczowa
LOD	limit detekcji
LOQ	limit oznaczalności
MS	<i>mass spectrometry</i> ; spektrometria mas
NAA	kwask naftylo-1-octowy
NI	<i>negative ionization</i> ; jonizacja ujemna
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> ; spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
pożywka MS	pożywka Murashige'a-Skooga (Murashige i Skoog, 1962)

pożywka MS_{STD}	zmodyfikowana żywka MS suplementowana 20,19 μ M 4-PPU oraz 1,96 μ M 2,4,5-T
pożywka SH	żywka Schenka-Hildebrandta (Schenk i Hildebrandt, 1972)
PTFE	politetrafluoroetylen
PVP	poliwinylopirolidon
rDNA	rybosomalny DNA
ROESY	<i>rotation frame nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> ; spektroskopia NOE (<i>nuclear Overhauser effect</i> – jądrowy efekt Overhausera) w rotującym układzie współrzędnych
% RSD	względne odchylenie standardowe wyrażone w %
SD	odchylenie standardowe
2,4,5-T	kwask 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy
TDZ	tidiazuron, 1-fenyl-3-(1,2,3-tiodiazol-5-ylo)-mocznik
UV	promieniowanie ultrafioletowe
UVC	promieniowanie ultrafioletowe C
VIS	światło widzialne

II. Badania własne

Zgodnie z podstawowym celem pracy, przeprowadzone badania obejmowały opracowanie, metodami biotechnologicznymi, roślinnego systemu *in vitro* z przeznaczeniem do ciągłej i wydajnej produkcji wybranych związków polifenolowych o ustalonej lub spodziewanej aktywności biologicznej.

Szereg polifenoli pochodzenia roślinnego wywiera wyraźnie zaznaczone efekty prozdrowotne, spośród których wymienić należy działanie antyoksydacyjne, antymutagenne oraz fitoestrogenne, co z kolei wiąże się ze zmniejszeniem przez nie ryzyka zapadalności na schorzenia serca, układu krążenia, oraz nowotwory (Heinrich i Prieto, 2008; Quideau i wsp., 2011). Z uwagi na powyższe, oraz uwzględniając obiektywne trudności związane z syntezą chemiczną polifenoli (Oyama i wsp., 2011; Quideau i wsp., 2011), celowym było uzyskanie wydajnego źródła wybranych związków z tej klasy, stanowiącego alternatywę dla polifenolowych surowców roślinnych, pozyskiwanych ze stanu naturalnego.

Analiza danych literaturowych wskazała na południowoafrykańskie krzewy z rodzaju *Cyclopia*, charakteryzujące się obecnością bogatego i unikatowego zespołu związków polifenolowych, obejmującego m.in. ksantony, flawanony, flawony oraz izoflawony (Joubert i wsp., 2008a). Nowoczesne badania biomedyczne zarówno ekstraktów sporządzonych z ziela miodokrzewów, jak i pojedynczych związków wyizolowanych z rodzaju *Cyclopia*, wskazały na ich wybitnie prozdrowotny charakter, przyczyniając się do spopularyzowania naparów z honeybush nie tylko w Afryce Południowej, ale również na kontynentach europejskim oraz amerykańskim, czyniąc z omawianych gatunków ważny towar eksportowy RPA (Joubert i wsp., 2011).

Spośród występujących w rodzaju *Cyclopia* połączeń, na szczególną uwagę zasługuje należąca do grupy ksantonów mangiferyna, wykazująca wielokierunkową aktywność biologiczną, w tym działanie antyoksydacyjne, antymutagenne, przeciwzapalne oraz przeciwcukrzycowe (Masibo i He, 2008; Vyas i wsp., 2012), flawanon hesperydyna o działaniu antymutagennym, przeciwzapalnym i uszczelniającym naczynia kapilarne (Garg i wsp., 2001; Tripoli i wsp., 2007; Benavente-García i wsp., 2008), jak również izoflawony o znaczącym potencjale fitoestrogennym (Patisaul i Jefferson, 2010).

Do badań biotechnologicznych przeznaczono 3 gatunki miodokrzewów: *Cyclopia intermedia* E. Mey., *Cyclopia subternata* Vogel oraz *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. Wybór wspomnianych roślin podyktowany był opisanymi w literaturze, międzygatunkowymi różnicami w ich składzie chemicznym (Joubert i wsp., 2008a, c; De Beer i Joubert, 2010), co miało z kolei umożliwić uzyskanie biomas *in vitro* o bogatej i wybiórczej zawartości wybranych metabolitów wtórnych. W tym miejscu należy zaznaczyć, że wymienione gatunki należą do roślin o znaczeniu komercyjnym, i wykorzystywane są do produkcji herbaty ziołowej honeybush (Joubert i wsp., 2008a, 2011). *C. genistoides* ma najwyższą, spośród miodokrzewów, zawartość ksantonów (Joubert i wsp., 2003, 2008a, c), zaś *C. subternata* charakteryzuje się obecnością najbogatszego (pod względem ilości połączeń) zespołu związków polifenolowych (Joubert i wsp., 2008c; De Beer i Joubert, 2010). *C. intermedia*, stanowiąca jak dotąd

podstawowe źródło surowca do produkcji herbaty honeybush (Du Toit i wsp., 1998; Joubert i wsp., 2011), jest zarazem gatunkiem najlepiej przebadanym pod kątem składu chemicznego i aktywności biologicznej (McKay i Blumberg, 2007; Joubert i wsp., 2008a). Charakteryzuje się ponadto najwyższą, spośród miodokrzewów, zawartością hesperydyny (Joubert i wsp., 2003, 2008c).

Ze względu na ograniczony dostęp do omawianych surowców roślinnych (gatunki endemiczne) oraz stosunkowo powolny wzrost (Joubert i wsp., 2008a, 2011), opracowano w niniejszej pracy metodę biotechnologicznego pozyskiwania wybranych wtórnych metabolitów, występujących w miodokrzewach, w oparciu o kultury *in vitro* poszczególnych gatunków. Cel badawczy zrealizowano dwutorowo, w ramach doświadczeń ściśle biotechnologicznych oraz komplementarnych badań fitochemicznych.

II.1. Badania biotechnologiczne

Jak już wspomniano na wstępie, zasadnicza, biotechnologiczna część pracy doktorskiej obejmowała otrzymanie roślinnego systemu *in vitro*, zdolnego do ciągłej i niezależnej od środowiska akumulacji wybranych związków polifenolowych (m.in. ksantony i flawanony), zidentyfikowanych uprzednio w roślinach macierzystych. Spektrum związków biosyntezy w kulturach tkankowych rozszerzono następnie w wyniku badań fitochemicznych (rozdz. II.2.), na benzofenony i izoflawony wyizolowane i zidentyfikowane po raz pierwszy w badanych gatunkach przez autora niniejszej rozprawy doktorskiej. W tym miejscu należy zaznaczyć, że przeprowadzony cykl doświadczeń biotechnologicznych ma charakter całkowicie nowatorski, ze względu na brak danych literaturowych odnośnie wcześniejszego uzyskania hodowli *in vitro* z jakiegokolwiek gatunku miodokrzewu.

Pierwszy etap eksperymentów dotyczył wyprowadzenia, z badanych gatunków miodokrzewów, kultur *in vitro* różniących się stopniem cytodyferencjacji, a tym samym charakteryzujących się zmiennym potencjałem w zakresie biosyntezy wtórnych metabolitów (Yeoman i Yeoman, 1996; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002). W projekcie zamierzano uzyskać zarówno kultury organowe, jak i parenchymatyczne oraz opracować dla nich warunki do ciągłego wzrostu. Cel ten postanowiono osiągnąć metodą klasyczną, tj. na drodze modyfikacji składu podłoża doświadczalnego w zakresie podstawowych składników (węglowodany, witaminy, sole mineralne) oraz roślinnych regulatorów wzrostu (auksyny i cytokininy). Uzyskane biomasy oceniano pod względem parametrów wzrostowych (wartości świeżej i suchej masy oraz współczynniki przyrostu G_i), jak również z uwagi na zdolność do akumulacji wybranych związków polifenolowych. Na podstawie otrzymanych danych, wyselekcjonowano z nich tkanki charakteryzujące się najlepszym wzrostem i najwyższą zawartością wybranych związków, czyli tzw. „superproducentów”, z przeznaczeniem do dalszych eksperymentów biotechnologicznych.

Właściwy cel projektu, tj. uzyskanie wysokoprodukcyjnego systemu roślinnego do pozyskiwania związków polifenolowych, realizowano zarówno w oparciu o kultury

płynne jak i stacjonarne badanych gatunków, z zastosowaniem szeroko rozumianych strategii retrobiosyntetycznych (Yeoman i Yeoman, 1996; Łuczkiwicz, 2008; Matkowski, 2008; Smetanska, 2008), bazując na znajomości szlaków biosyntezy ksantonów oraz bioflawonoidów (Dixon i Steele, 1999; Ehling i wsp., 2006) i wykorzystując ich rolę w roślinie jako naturalnych fitolaleksyn oraz fitoantycypin (Dixon, 1999; Treutter, 2006). Poziomy biosyntezy wybranych wtórnych metabolitów postanowiono regulować poprzez modyfikację warunków fizycznych prowadzenia hodowli (oświetlenie, temperatura, aplikacja czynników stresowych), dokarmianie biomas prekursorami biosyntezy, elicytację oraz techniki immobilizacyjne. Wybór wymienionych schematów eksperymentalnych uzasadniony był ich skutecznością w zakresie stymulowania biosyntezy polifenoli, wykazaną wielokrotnie w toku prac nad kulturami *in vitro* roślin wyższych (Matkowski, 2008; Smetanska, 2008; Ekiert, 2009), w tym pokrewnych gatunków z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz, 2006, 2008; Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2012).

Otrzymane biomasy, zoptymalizowane w zakresie akumulacji izoflawonów, ksantonów oraz flawanonów, poddano następnie adaptacji do wzrostu w instalacjach o charakterze bioreaktorów. Zaplanowane prace obejmowały skonstruowanie urządzeń prototypowych, dedykowanych specjalnie do prowadzenia kultur zawieszinowych oraz pędowych. W niniejszym eksperymencie namnażano wysokoprodukcyjne biomasy stosując wymienione powyżej strategie hodowlane, celem podwyższenia produktywności systemów pod względem związków polifenolowych.

W rezultacie, zamierzano zaproponować nowatorską procedurę otrzymywania, w skali wielkolaboratoryjnej, wybranych ksantonów, benzofenonów, flawanonów oraz izoflawonów z kultur tkankowych miodokrzewów, stanowiącą kompletny etap *upstream* opracowanego procesu biotechnologicznego.

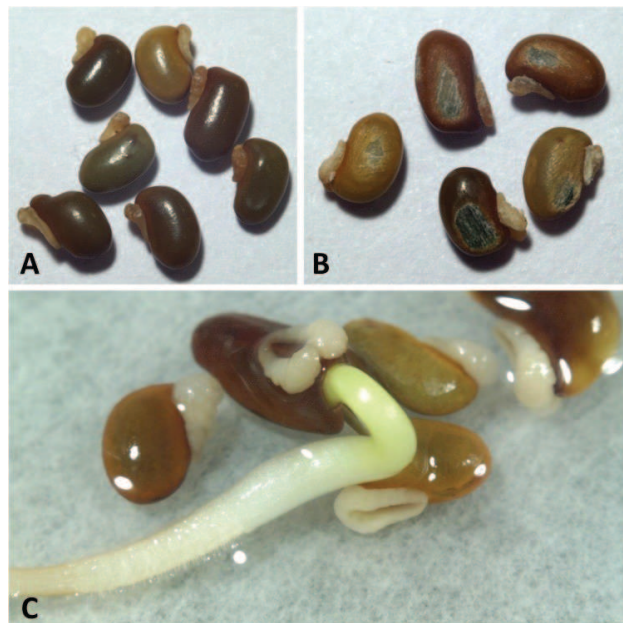
Niezwykle istotnym, obocznym celem zaplanowanych prac biotechnologicznych, było opracowanie metody mikrorozmnażania badanych roślin, mogącej znaleźć zastosowanie do rozmnażania wegetatywnego miodokrzewów w celach komercyjnych, jak również odbudowy naturalnych stanowisk gatunków zagrożonych wyginięciem (Schutte-Vlok, 1998; Joubert i wsp., 2011). Protokół mikrorozmnażania badanych roślin opracowano wykorzystując podłoża wzbogacone zmiennymi stężeniami auksyn, cytokinin, sacharozy oraz soli mineralnych. Powyższe doświadczenie pozwoliło ponadto na ocenę wpływu zróżnicowania tkankowego na poziomy akumulacji wybranych związków polifenolowych, w kulturach pędowych *Cyclopia* sp.

II.1.1. Wyprowadzenie kultur *in vitro* wybranych gatunków z rodzaju *Cyclopia*

II.1.1.1. Kielkowanie nasion i potwierdzenie tożsamości poszczególnych gatunków

Do wyprowadzenia kultur *in vitro* miodokrzewów posłużyły nasiona takich gatunków jak: *C. intermedia* E. Mey., *C. subternata* Vogel (Fot. 2A) i *C. genistoides* (L.) Vent. Wybór materiału inicjalnego podyktowany był brakiem dostępności części wegetatywnych roślin gruntowych poza obszarem Cape Floristic Region w RPA, a także możliwością przeprowadzenia, w przypadku nasion, efektywnej sterylizacji przy zastosowaniu prostych procedur wyjąłwiających (Zenkteler, 1984). Kierując się danymi literaturowymi dotyczącymi m.in. strategii przetrwania badanych gatunków (Sutcliffe i Whitehead, 1994; Joubert i wsp., 2011), nasiona miodokrzewów poddano skaryfikacji (Fot. 2B), w celu przerwania okresu spoczynku i zwiększenia siły kiełkowania.

Przeprowadzone wcześniej badania nad kulturami *in vitro* roślin z rodziny Fabaceae wykazały, że zastosowanie związków chloru (woda chlorowa lub roztwory podchlorynów) w stężeniu 1,75-25,0 %, przez 4-25 min., umożliwia skuteczną sterylizację nasion przy jednoczesnym zachowaniu ich żywotności. Wymienione czynniki wyjąłwiający okazały się skuteczne w przypadku nasion pokrewnego miodokrzewom czerwonokrzewu (*A. linearis*) (Le Roux i wsp., 1992), jak również szeregu innych gatunków bobowatych (Pniewski i wsp., 2002; Thiem, 2003; Mundhara i Rashid, 2006). Ze względu na powyższe, w niniejszej pracy zdecydowano się na 30 min. sterylizację nasion przy użyciu 10% roztworu podchlorynu sodu.



Fot. 2. Nasiona *Cyclopia subternata*: A – oddzielone mechanicznie od zanieczyszczeń, B – poddane skaryfikacji, C – w trakcie kiełkowania.

Aby uniknąć niezamierzonego wpływu egzogennych regulatorów wzrostu na rosnące siewki, nasiona kiełkowano przy użyciu wody redestylowanej bez dodatku stymulatorów kiełkowania, stosowanych często przy tego typu eksperymentach (Thiem, 2003; Buendia-Gonzales i wsp., 2007). Opisane procedury zapewniły 100% sterylność uzyskanych siewek. Siła kiełkowania, określona po 10 dniach eksperymentu, wyniosła 74 % dla *C. subternata* i *C. genistoides* oraz 95 % dla *C. intermedia*. Można tym samym uznać, że zastosowany system wyjaławiania i kiełkowania nasion jest optymalny dla opisywanych roślin. Uzyskane siewki (Fot. 2C) przeniesiono do fitotronu na okres 10 dni w celu wzmocnienia, a następnie podzielono na 2 grupy. Pierwszą część materiału roślinnego przeznaczono do badań genetycznych, mających na celu potwierdzenie tożsamości gatunków, pozostałe kiełki posłużyły natomiast do zainicjowania kultur *in vitro*.

Tożsamość badanych gatunków, ze względu na ich endemiczny charakter, potwierdzono w oparciu o analizę sekwencji ITS1 i ITS2 oraz ich porównanie z bazą GenBank. Badania molekularne przeprowadzono w ramach współpracy, w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Kokotkiewicz i wsp., 2012).

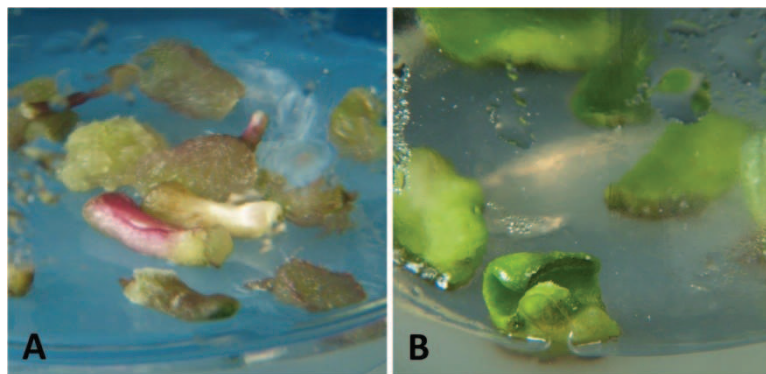
Dostępne dane literaturowe wskazują ogólnie na znaczący wpływ zróżnicowania tkankowego roślinnych biomas *in vitro* na ich profil metaboliczny (Yeoman i Yeoman, 1996; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002). Stwierdzono między innymi, że stopień cytodyferencjacji ma istotne znaczenie w biosyntezie ksantonów (Dias i wsp., 2000, 2001; Mulinacci i wsp., 2008) oraz związków o charakterze izoflawonoidowym (Łuczkiwicz i Głód, 2003, 2005). Z drugiej strony, zróżnicowanie tkankowe nie wydaje się być czynnikiem niezbędnym dla akumulacji połączeń fenolowych w roślinnych kulturach *in vitro* (Matkowski, 2008). Uwzględniając powyższe informacje oraz fakt obecności związków polifenolowych, jako podstawowej klasy metabolitów wtórnych w roślinach z rodzaju *Cyclopia*, w ramach opisywanego projektu postanowiono otrzymać zarówno biomasy parenchymatyczne, jak również kultury organowe miodokrzewów, a następnie określić ich zdolność do akumulacji wybranych związków naturalnych.

II.1.1.2. Wyprowadzenie kultur kalusowych

W celu wyprowadzenia kultur kalusowych *Cyclopia* sp., 10 dniowe siewki poszczególnych gatunków podzielono na część korzeniową, hypokotylową i pędową, które następnie wykładano na stacjonarne pożywki Murashige'a-Skooga (MS) (Murashige i Skoog, 1962) oraz Schenka-Hildebrandta (SH) (Schenk i Hildebrandt, 1972) (rozdz. III.1.3. – Tab. 18), suplementowane 2,32 μ M kinetyny (KN) oraz 22,72 μ M kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) (Fot. 3A, B; rozdz. III.1.5.2. – Tab. 19).

Wybór wspomnianych podłoży, jak również regulatorów wzrostu, uwarunkowany był rezultatami wcześniejszych badań nad kulturami *in vitro* roślin z rodziny Fabaceae (Pintos i wsp., 2002; Łuczkiwicz i Głód, 2003; Duque i wsp., 2006; Ganapathi i wsp., 2007; Łuczkiwicz, 2008). W cytowanych pracach wskazywano na

ogólnie dużą trudność w wyprowadzeniu hodowli *in vitro* bobowatych, w szczególności zaś gatunków o charakterze drzew oraz krzewów. Stwierdzono m.in. że proces kalusowania bądź organogenezy zachodzi skutecznie jedynie w obecności tzw. „pożywek bogatych”, tj. zawierających duże stężenia jonów NO_3^- , NH_4^+ , K^+ , jak również węglowodanów (odpowiednio 30,0 i 0,5 g l⁻¹ sacharozy oraz *myo*-inozytolu w przypadku podłoża SH – rozdz. III.1.3. – Tab. 18). Jako regulatory wzrostu wykorzystywano zwykle kompozycje auksyny z cytokinina, przy czym powyższe grupy fitohormonów reprezentowane były najczęściej odpowiednio przez 2,4-D i kinetynę. Wymienione związki warunkowały, w przypadku większości gatunków roślin strączkowych, powstawanie tkanki przyrannej. Ostateczny rezultat, w postaci uzyskania żywotnego kalusa, był jednak zawsze wypadkową rodzaju stosowanego podłoża, typu eksplantatu oraz indywidualnych cech badanego gatunku (Sagare i wsp., 1995; Bouque i wsp., 1998; Martín i wsp., 2000; Pintos i wsp., 2002; Sairam i wsp., 2003; Duque i wsp., 2006).



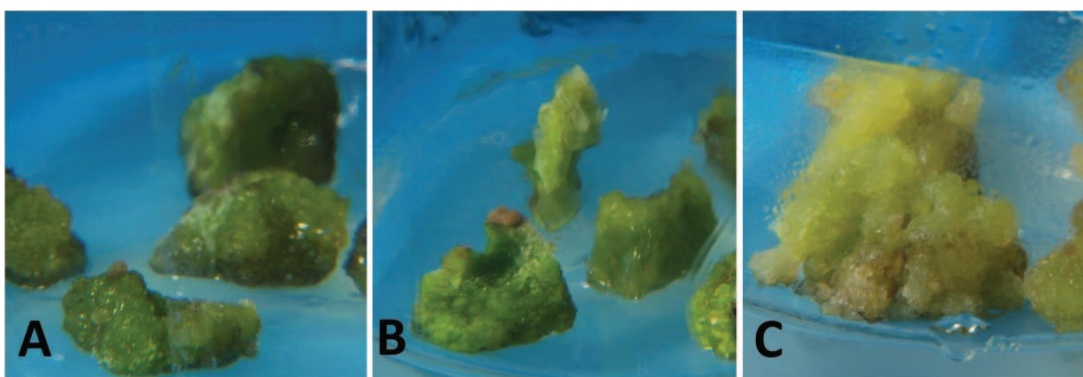
Fot. 3. Inicjacja kultur kalusowych *Cyclopia subternata*: A – hypokotylowe i B – liścieniowe fragmenty siewek umieszczone na stacjonarnej, zmodyfikowanej pożywce MS, suplementowanej 2,32 μM KN i 22,72 μM 2,4-D.

W toku doświadczeń zawartych w niniejszej pracy, wszystkie eksplantaty inicjalne (tj. fragmenty korzeniowe, hypokotylowe i liścieniowe siewek) poszczególnych gatunków miodokrzewów, wykazywały po wyłożeniu na opisane wyżej podłoża, natychmiastowe silne zmiany nekrotyczne. Manifestowały się one przede wszystkim zahamowaniem wzrostu, a także brązowieniem biomas oraz pożywki w najbliższym sąsiedztwie eksplantatu. Najprawdopodobniej zjawisko to spowodowane było reakcją obronną rośliny na warunki stresowe, wywołane uszkodzeniem tkanek (cięcie) i przejawiało się produkcją prostych związków fenolowych. Kierując się wskazaniami literaturowymi, w celu ograniczenia brązowienia biomas, zastosowano suplementację pożywek wzrostowych substancjami o działaniu antyutleniającym, tj. L-cysteiną (Panaia i wsp., 2000) i poliwinylpiperolidonem (PVP) (Prakash i wsp., 2006). Ponadto fragmenty tkanek objęte nekrozą były sukcesywnie eliminowane (mechaniczne oddzielanie), a oczyszczone w ten sposób eksplantaty przenoszono w 4-tygodniowych odstępach czasu na świeże podłoża o tym samym składzie. Dodatek antyutleniaczy okazał się nieskuteczny w przeciwdziałaniu zmianom nekrotycznym tkanek, zaś jedynym sposobem na ich ograniczenie było wspomniane powyżej wielokrotne pasażowanie biomas oczyszczonych od brunatniejących fragmentów. Nasilenie

zamierania tkanek było uzależnione przede wszystkim od rodzaju eksplantatu oraz zastosowanej pożywki (MS lub SH). Niezależnie od gatunku, najsilniejsze zmiany nekrotyczne obserwowano w przypadku eksplantatów liściennych i korzeniowych, które z tego względu, po kilku pasażach, musiały zostać wyłączone z dalszych eksperymentów. Znacznie lepszą żywotnością charakteryzowały się fragmenty hypokotylowe. Powstała z nich tkanka parenchymatyczna, po 4-6 miesiącach regularnego pasażowania, była praktycznie pozbawiona szybko zamierających fragmentów. Tym samym wykazano, że jedynie zastosowanie hypokotylowych wycinków siewek umożliwia wyprowadzenie stabilnych kultur kalusowych badanych roślin. Poszczególne gatunki miodokrzewów różniły się również preferencjami względem podstawowego składu podłoża wzrostowego. Na etapie inicjacji kultur kalusowych, lepszy wzrost biomas *C. intermedia* i *C. subternata* (rozumiany jako mniejsze nasilenie zmian nekrotycznych, skorelowane z tworzeniem tkanki przyrannej) odnotowano na pożywce MS, w przeciwieństwie do kalusa *C. genistoides*, który zdecydowanie szybciej powstawał na podłożu SH.

Uzyskane po 6 kolejnych pasażach, inicjalne kultury kalusowe (Fot. 4), przeznaczono do dalszych doświadczeń biotechnologicznych. Biomasa *C. subternata* (Fot. 4C) jako jedyna charakteryzowała się obecnością znacznej ilości fragmentów o luźnej, parenchymatycznej konsystencji, struktura inicjalnych kultur kalusowych *C. genistoides* (Fot. 4B) i *C. intermedia* (Fot. 4A) była zaś bardziej zwarta, określana często w literaturze jako „kalafiorowata”.

Inicjalne biomasy kalusowe wszystkich badanych gatunków wykazywały ponadto pewien stopień zróżnicowania morfologicznego, przejawiającego się obecnością fragmentów różniących się zabarwieniem, konsystencją, tempem wzrostu i stopniem nasilenia zmian nekrotycznych. Manifestująca się w ten sposób znaczna zmienność somaklonalna spowodowała, że w dalszej serii doświadczeń postanowiono, na drodze modyfikacji składu pożywek SH i MS w zakresie regulatorów wzrostu, uzyskać stabilne, parenchymatyczne biomasy miodokrzewów zdolne do ciągłego wzrostu i stanowiące pulę materiału roślinnego z przeznaczeniem do kolejnych eksperymentów biotechnologicznych.



Fot. 4. Inicjalne kultury kalusowe: A – *Cyclopia intermedia*, B – *Cyclopia genistoides* i C – *Cyclopia subternata*, uzyskane z fragmentów hypokotylowych siewek umieszczonych na zmodyfikowanych pożywkach MS (*C. intermedia* i *C. subternata*) oraz SH (*C. genistoides*), suplementowanych 2,32 μ M KN i 22,72 μ M 2,4-D.

W toku doświadczeń, oprócz 2,4-D oraz kinetyny, stosowanych na etapie inicjacji kultur *in vitro*, zdecydowano się na wykorzystanie 2,4,5-T (kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy, syntetyczna auksyna) oraz 4-PPU (*N*-(2-chloro-4-pirydylo)-*N'*-fenylomocznik, syntetyczna cytokinina). Wybór wymienionych regulatorów wzrostu uzasadniony był analizą danych literaturowych, wskazujących na skuteczne zastosowanie niniejszych substancji jako fitohormonów z wyboru, w przypadku kultur parenchymatycznych szeregu roślin z rodziny Fabaceae, jak również wynikami wcześniejszych badań nad kulturami kalusowymi janowców (*Genista* sp.), prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji GUMed. Rezultaty cytowanych w literaturze doświadczeń wykazały, że wzbogacenie pożywki wzrostowej o 2,4,5-T wywierało korzystny wpływ na wzrost nieuorganizowanych biomas parenchymatycznych takich gatunków jak *Genista tinctoria* (Łuczkiwicz, 2006) oraz *Pueraria tuberosa* (Goyal i Ramawat, 2008). Drugi z wymienionych związków, 4-PPU, znalazł zastosowanie przede wszystkim jako fitohormon stymulujący rozwój pędów (Mohamed i wsp., 1992), bądź somatyczną embriogenezę (Nagl i wsp., 1997) w kulturach *in vitro* roślin z rodzajów: *Phaseolus*, *Vicia* i *Vigna*. Wyniki eksperymentów wskazują jednak, że stężenie powyższego regulatora na poziomie $> 2,5 \mu\text{M}$ indukuje powstawanie nieuorganizowanej biomasy kalusowej. Powyższe zjawisko zaobserwowano w kulturach *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba* (Mohamed i wsp., 1992) oraz *Genista tinctoria*, w przypadku których dodatkowo uwidocznił się silny, stymulujący wpływ 4-PPU na przyrost biomasy (Łuczkiwicz, 2006).

Z uwagi na powyższe, postanowiono włączyć wymienione regulatory wzrostu (tj. 2,4,5-T oraz 4-PPU) do doświadczeń, mających na celu uzyskanie stabilnie rosnących kultur parenchymatycznych wybranych miodokrzewów. W tym celu, fragmenty inicjalnych biomas kalusowych umieszczano na podłożach SH lub MS, zawierających różne kompozycje fitohormonów złożone z auksyny i cytokininy (Tab. 6; rozdz. III.1.5.3. – Tab. 20). Kultury prowadzono następnie przez 6 kolejnych miesięcy (w pasażach 4-tygodniowych). Uzyskane po tym okresie biomasy oceniano pod względem przydatności do dalszych prac biotechnologicznych, określając ich morfologię (barwa, konsystencja, homogenność – rozdz. III.1.4.2.) oraz tempo wzrostu (wartości współczynnika przyrostu obliczone wg Swedlund i Locy (1993), patrz też rozdz. III.1.4.1.), będące miarą żywotności kultury (Tab. 6).

Przeprowadzony eksperyment wykazał, że podłoża SH i MS, suplementowane 2,4-D i KN, jakkolwiek właściwe do inicjacji kalusowania fragmentów siewek miodokrzewów, okazały się jednak nieodpowiednie do prowadzenia ciągłych hodowli biomas parenchymatycznych, ze względu na niskie wartości współczynników przyrostu rosnących tkanek (Tab. 6). Znacznie lepsze rezultaty uzyskano z wykorzystaniem podłoża wzbogaconych o $20,19 \mu\text{M}$ 4-PPU z dodatkiem $1,96 \mu\text{M}$ 2,4,5-T (lub, w przypadku *C. genistoides*, $2,27 \mu\text{M}$ 2,4-D) (Tab. 6). Pomimo ogólnie korzystnych wyników, odnotowanych po zastosowaniu powyższych regulatorów wzrostu, nie powiodła się próba opracowania składu pożywki wzrostowej odpowiedniej do prowadzenia kultur kalusowych wszystkich badanych gatunków miodokrzewów.

Tab. 6. Wpływ podstawowego składu pożywki oraz dodatku regulatorów wzrostu na morfologię i parametry wzrostowe biomas kalusowych *Cyclopiia* sp.*

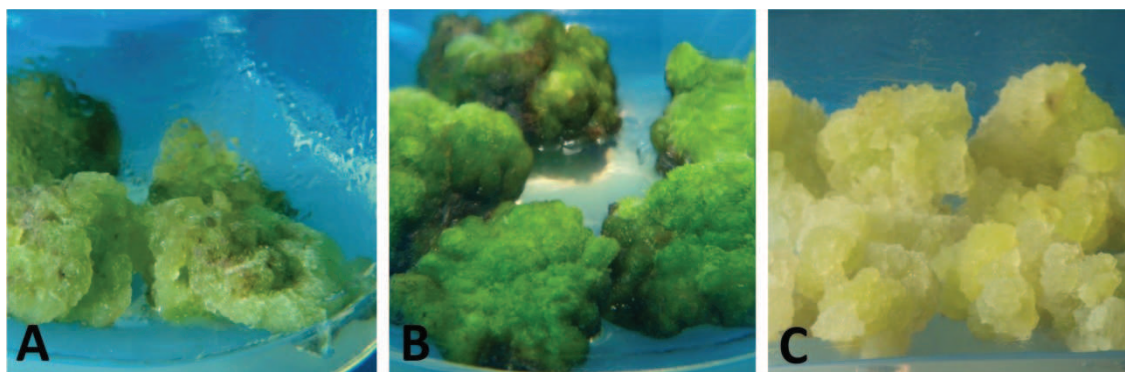
Rodzaj pożywki; regulatory wzrostu (μM) ^a	<i>C. intermedia</i>			<i>C. subternata</i>			<i>C. genistoides</i>		
	Kolor	Morfologia	Gi (%) ^b	Kolor	Morfologia	Gi (%) ^b	Kolor	Morfologia	Gi (%) ^b
SH; 2,4-D (22,72); KN (2,32)	zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	88,4 ± 27,0	zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	160,4 ± 34,6	żółto-zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	94,3 ± 25,0
SH; 2,4,5-T (19,57); KN (2,32)	żółto-zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	76,5 ± 17,9	żółto-zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	120,5 ± 21,6	zielony	kalus o śluzowatej konsystencji	170,2 ± 32,5
SH; 4-CPPU (20,19); 2,4-D (2,27)	żółto-zielony	kalus o śluzowatej konsystencji	98,6 ± 23,3	zielony	kalus o kalafiorowato-lepkiej konsystencji	100,6 ± 16,4	zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	252,0 ± 20,4
SH; 4-CPPU (20,19); 2,4,5-T (1,96)	zielony	kalus o śluzowatej konsystencji	56,3 ± 14,5	zielony	kalus o śluzowatej konsystencji	90,4 ± 30,4	jasno-zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	160 ± 25,6
MS; 2,4-D (22,72); KN (2,32)	zielony	kalus o kalafiorowato-lepkiej konsystencji	220,4 ± 12,3	jasno-zielony	kalus parenchymatyczny	120,6 ± 12,4	szaro-zielony	kalus o śluzowatej konsystencji	55,6 ± 12,6
MS; 2,4,5-T (19,57); KN (2,32)	jasno-zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	191,4 ± 21,6	zielony	kalus śluzowaty, parenchymatyczny	320,5 ± 45,0	zielony	kalus o śluzowatej konsystencji	67,8 ± 19,1
MS; 4-CPPU (20,19); 2,4-D (2,27)	zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	250,5 ± 43,8	żółto-zielony	kalus parenchymatyczny	360,1 ± 15,6	zielony	kalus o kalafiorowatej konsystencji	110,5 ± 31,5
MS; 4-CPPU (20,19); 2,4,5-T (1,96)	jasno-zielony	kalus parenchymatyczny	481,0 ± 31,7	jasno-żółty	kalus kruchy, parenchymatyczny	1269,9 ± 98,6	zielony	kalus z primordiami pędownymi	150,4 ± 42,1

* Pogrubionym tekstem zaznaczono modyfikacje podłoża wybrane do prowadzenia hodowli ciągłych poszczególnych biomas, przeznaczonych następnie do badań fitochemicznych.

^a Zastosowane skróty: **SH**, pożywka Schenka-Hildebrandia; **MS**, pożywka Murashige'a-Skoog'a; **2,4-D**, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; **KN**, kinetyna; **2,4,5-T**, kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy, **4-CPPU**, *N*-(2-chloro-4-pirydylo)-*N'*-fenylomocznik

^b Współczynnik przyrostu mierzony po 30 dniach hodowli. Poszczególne wartości stanowią średnie arytmetyczne z 10 prób ± SD.

Biomasy *C. intermedia* i *C. subternata* rosły wyraźnie lepiej na podłożu MS, *C. genistoides* natomiast tworzyła stabilny kalus tylko na pożywce SH. Ponadto, poszczególne biomasy różniły się preferencjami względem zastosowanych regulatorów wzrostu. Najlepszy wzrost kalusów *C. intermedia* i *C. subternata* odnotowano w obecności 2,4,5-T, w przeciwieństwie do biomasy *C. genistoides*, preferującej dodatek 2,4-D. Niezależnie od gatunku i rodzaju podłoża wzrostowego, kluczowa dla uzyskania stabilnych kultur kalusowych okazała się natomiast suplementacja medium 4-CPPU. Na pożywkach zawierających niniejszą cytokininę, wyprowadzone biomasy różniły się jednak w wyraźny sposób morfologią i tempem wzrostu, co znalazło odzwierciedlenie w oznaczonych wartościach Gi (Tab. 6). Najwyższym współczynnikiem przyrostu ($Gi > 1200 \%$) i kruchą konsystencją charakteryzował się kalus *C. subternata* (Tab. 6, Fot. 5C), najniższym zaś kalus *C. genistoides* ($Gi \approx 250 \%$) o kalafiorowatej konsystencji (Tab. 6, Fot. 5B). Kalus *C. intermedia* posiadał zwartą strukturę parenchymatyczną, cechowała go też słabsza dynamika wzrostu ($Gi < 500 \%$) w porównaniu z biomasą *C. subternata* (Tab. 6, Fot. 5A). Uzyskane wyniki wskazują na duże zróżnicowanie wymagań środowiskowych biomas *Cyclopia* sp., przejawiające się zarówno preferencjami wobec podstawowych składników podłoża (sole mineralne), jak również fitohormonów. Tym samym stoją one w sprzeczności z rezultatami wcześniejszych doświadczeń, wskazujących na możliwość zastosowania jednego rodzaju pożywki dla szeregu gatunków roślin strączkowych, w obrębie jednego rodzaju (Bouque i wsp., 1998; Łuczkiwicz i Głód, 2003). Jakkolwiek opisany fenomen jest trudny do wyjaśnienia, to może on być przynajmniej częściowo związany z odmienną charakterystyką botaniczną badanych gatunków. Wspomniane rośliny różnią się zasięgiem występowania, tempem wzrostu (*C. intermedia* należy do gatunków wolno rosnących, w przeciwieństwie do *C. genistoides* i *C. subternata*) oraz strategiami przetrwania (*C. intermedia* i *C. genistoides* należą do grupy tzw. „resprouters”, *C. subternata* zaś do „reseeders”) (Joubert i wsp., 2008a, 2011; rozdz. I.1.2.). Uwagę zwraca też fakt, że *C. genistoides*, będąca szybko rosnącym miodokrzewem (Joubert i wsp., 2008a, 2011), tworzyła kalus o najgorszych, spośród badanych gatunków, parametrach wzrostowych (niska wartość Gi i zwarta, kalafiorowata konsystencja).



Fot. 5. Stabilne kultury kalusowe: A – *Cyclopia intermedia*, B – *Cyclopia genistoides* oraz C – *Cyclopia subternata*, rosnące na zmodyfikowanych pożywkach MS, suplementowanych 20,19 μM 4-CPPU i 1,96 μM 2,4,5-T (*C. intermedia* i *C. subternata*) oraz na pożywce SH z dodatkiem 20,19 μM 4-CPPU i 2,27 μM 2,4-D (*C. genistoides*).

II.1.1.3. Wyprowadzenie kultur organowych

Oprócz otrzymania opisanych powyżej biomas parenchymatycznych, w niniejszej pracy podjęto próbę uzyskania kultur uorganizowanych (tj. korzeniowych oraz pędowych) poszczególnych gatunków miodokrzewów. Dostępne dane literaturowe wskazują, że zróżnicowanie morfogeniczne w znaczący sposób wpływa na biosyntezę szeregu metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* (Yeoman i Yeoman, 1996; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Verpoorte i wsp., 2002). Jakkolwiek obecność wyspecjalizowanych tkanek nie wydaje się być konieczna do biosyntezy ksantonów (Beerhues i Berger, 1994; Dias i wsp., 2000) i izoflawonów (Federici i wsp., 2003; Łuczkiwicz i Głód, 2003), stwierdzono wyraźne zależności pomiędzy stopniem zróżnicowania biomas a akumulacją powyższych połączeń (Łuczkiwicz i Głód, 2005; Mulinacci i wsp., 2008). Wobec powyższego, w badaniach biotechnologicznych, ukierunkowanych na otrzymanie wydajnych systemów *in vitro* do produkcji wybranych metabolitów wtórnych, wykorzystywane są często, oprócz biomas parenchymatycznych, także kultury korzeniowe oraz pędowe.

Zaletą korzeni odciętych, hodowanych w warunkach *in vitro*, jest z reguły szybki wzrost, dobra odporność na stres mechaniczny, wysoka zawartość metabolitów wtórnych oraz długoterminowa stabilność somaklonalna. Z uwagi na powyższe, kultury korzeniowe mogą stanowić dobrą alternatywę dla nieuorganizowanych biomas kalusowych (Murthy i wsp., 2008; Baque i wsp., 2012). Zachowują one szereg zalet charakterystycznych dla roślinnych kultur *in vitro*, w tym m.in. możliwość zwiększania produkcji wybranych metabolitów wtórnych na drodze elicytacji lub dokarmiania tkanek prekursorami biosyntezy (Łuczkiwicz, 2008; Murthy i wsp., 2008; Baque i wsp., 2012). W wybranych przypadkach zaobserwowano również akumulację związków niewystępujących w roślinie macierzystej. Jako przykład mogą tu posłużyć kultury korzeni odciętych *Genista tinctoria*, produkujące nieobecna w roślinie gruntowej izolikwirytygeninę, stanowiącą metabolit pośredni szlaku fenylopropanoidowego (Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2005b).

Podobnie jak korzenie odcięte, hodowle pędowe *in vitro* wykazują szereg zalet kultur uorganizowanych, w tym zdolność do biosyntezy metabolitów wtórnych produkowanych przez biomasę parenchymatyczną jedynie w niewielkich ilościach, takich jak olejki eteryczne (Hilton i wsp., 1995; Verpoorte i wsp., 2002) bądź artemizynina (Liu i wsp., 2006). Do ich zalet należy również duża odporność na stres mechaniczny (Verpoorte i wsp., 2002). Ze względu na wymienione powyżej cechy biomas uorganizowanych, podjęto próby wyprowadzenia zarówno kultur pędowych, jak i korzeniowych z wybranych gatunków rodzaju *Cyclopia*.

W przeciwieństwie do biomas kalusowych, uzyskanych z fragmentów hypokotylowych sterylnych siewek, jako materiał do wyprowadzenia kultur korzeni odciętych i pędów wykorzystano odpowiednio ok. 2 cm fragmenty korzonków oraz szczytowe części kielków, zawierające 1-2 węzły. Powyższe eksplantaty umieszczano na zestalonych podłożach SH i/lub MS, suplementowanych regulatorami wzrostu z grupy auksyn lub cytokinin (rozdz. III.1.5.2 – Tab. 19), w zakresach stężeń

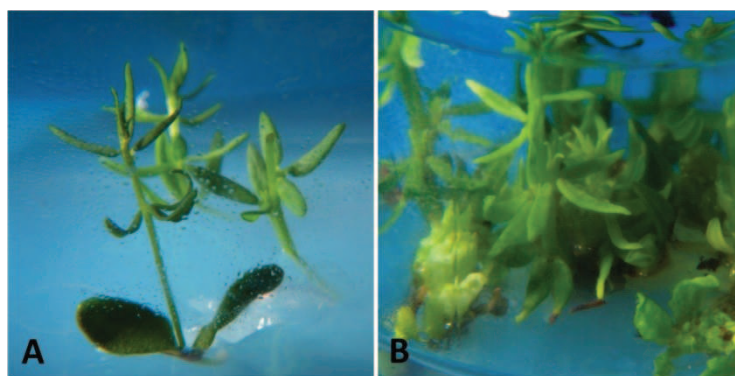
stosowanych najczęściej w czasie badań nad kulturami organowymi roślin z rodziny *Fabaceae* (Łuczkiwicz, 2006).

W przypadku fragmentów korzonków, jako podłoża wzrostowe posłużyły zestalone agarem pożywki SH i MS, wzbogacane auksynami (kwas indolilo-3-masłowy – IBA lub kwas naftylo-1-octowy – NAA), stosowanymi powszechnie zarówno jako środki indukujące ukorzenianie mikroroślinek (De Klerk i wsp., 1999), jak i składniki podłoży wzrostowych do prowadzenia kultur ciągłych korzeni odciętych (Murthy i wsp., 2008; Baque i wsp., 2012). Biomasy przenoszono na świeże podłoża wzrostowe w 4-tygodniowych odstępach czasu. Podobnie jak w przypadku eksplantatów wykorzystywanych do indukcji kultur kalusowych, fragmenty korzeni wykazywały silne zmiany nekrotyczne, manifestujące się brunatnieniem i sukcesywnym zamieraniem tkanek. W celu ograniczenia powyższego zjawiska zastosowano, analogicznie jak przy inicjacji kalusa, suplementację podłoży antyoksydantami (L-cysteina i PVP). Zabieg ten nie przyniósł jednak spodziewanych efektów, podobnie jak mechaniczne oddzielanie martwych fragmentów biomasy i przenoszenie eksplantatów na świeże podłoża. W efekcie, próby wyprowadzenia kultur korzeni odciętych miodokrzewów zakończyły się niepowodzeniem na skutek całkowitego zamarcia korzonków po 3-4 kolejnych pasażach, niezależnie od składu pożywki wzrostowej. Jakkolwiek trudno jest jednoznacznie określić przyczynę powyższego zjawiska, mogło być ono spowodowane brakiem, w warunkach kultur *in vitro*, symbiotycznych bakterii z rodzaju *Rhizobium*, których obecność jest często kluczowa dla prawidłowego rozwoju systemu korzeniowego roślin strączkowych, w tym krzewów z rodzaju *Cyclopia* (Spriggs i Dakora, 2007, 2009a, b; Mbangcolo, 2008).

W przeciwieństwie do eksplantatów korzeniowych, szczytowe części siewek, stanowiące materiał przeznaczony do wyprowadzenia kultur mikropędowych, umieszczano na pożywce SH (Fot. 6A), suplementowanej zestawem cytokinin, w skład którego wchodziła pochodna purynowa – 2iP ((6- γ,γ -dimetyloallilo)-aminopuryna), w ilości 9,84 μM oraz pochodna fenylocmocznika – TDZ (tidiazuron, 1-fenilo-3-(1,2,3-tiodiazol-5-ylo)-mocznik), w stężeniu 1,0 μM . Wybór powyższego podłoża uzasadniony był przede wszystkim jego przydatnością do prowadzenia kultur pędowych pokrewnych miodokrzewom gatunków z rodzaju *Genista*, w przypadku których warunkowało ono powstawanie znacznej ilości primordiów pędowych (Łuczkiwicz i Piotrowski, 2005; Łuczkiwicz, 2006). Na możliwość zastosowania 2iP (Maity i wsp., 2005; Faisal i wsp., 2006), tidiazuronu (Mohamed i wsp., 1992; Neves i wsp., 2001; Mundhara i Rashid, 2006; Husain i wsp., 2007; Sharma i wsp., 2011), bądź obydwu wymienionych regulatorów jednocześnie (Baskaran i Jayabalan, 2008), do prowadzenia kultur pędowych lub mikrorozmnażania roślin z rodziny *Fabaceae*, wskazywała ponadto kwerenda licznych danych literaturowych.

Analogicznie jak w przypadku inicjacji kultur kalusowych, szczytowe fragmenty kielków (liścienie i wczesnie wykształcony pierwszy okólek liści), umieszczone na wymienionym wyżej podłożu, wykazywały silne tendencje do nekrozy, manifestujące się brunatnieniem eksplantatów i otaczającej je pożywki. Wspomniane zjawisko, opisane uprzednio w pracach dotyczących mikrorozmnażania roślin strączkowych (Saafi i Borthakur, 2002; Prakash i wsp., 2006), obserwowano w inicjalnych kulturach

pędowych wszystkich badanych gatunków miodokrzewów. W celu ograniczenia niekorzystnych zmian, w znaczący sposób utrudniających uzyskanie stabilnych biomas *in vitro*, zastosowano suplementację pożywek substancjami o działaniu antyutleniającym, tj. L-cysteiną i PVP, stosowanymi również podczas wyprowadzania kultur kalusowych. Modyfikacje te okazały się nieskuteczne, a jedynym sposobem ograniczenia nekrozy biomas było sukcesywne przenoszenie eksplantatów na świeże podłoża, w 4-tygodniowych odstępach czasu, oraz mechaniczne usuwanie (odcinanie) brunatnych fragmentów pędów. Po okresie 6-miesiący (6 kolejnych pasaży) uzyskano inicjalne kultury mikropędowe *C. intermedia*, *C. genistoides* i *C. subternata*, pozbawione niemal całkowicie zmian nekrotycznych. Proces inicjacji kultur pędowych oraz kultury inicjalne pokazano na przykładzie *C. genistoides* na Fot. 6A i B.



Fot. 6. A – inicjacja kultur pędowych *Cyclopia genistoides* na zmodyfikowanej, stacjonarnej pożywce SH, suplementowanej 9,84 μM 2iP i 1,0 μM TDZ; B – inicjalne kultury pędowe tego samego gatunku.

Oprócz wyraźnie zaznaczonych zmian nekrotycznych, inicjalne kultury mikropędowe wszystkich badanych gatunków charakteryzowały się obecnością liści potwornych, nasiloną witrifikacją oraz powstawaniem kalusa u podstawy eksplantatów. Zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi, zjawisko to było najprawdopodobniej związane z obecnością tidiazuronu w pożywce wzrostowej, którego niekorzystny wpływ na morfologię pędów opisywano m.in. w czasie badań nad kulturami *in vitro* *Vigna radiata* (Mundhara i Rashid, 2006), *Pterocarpus marsupium* (Husain i wsp., 2007), *Vicia faba* oraz *Phaseolus vulgaris* (Mohamed i wsp., 1992). Dane eksperymentalne wskazują zarazem, że wymienione powyżej niekorzystne zmiany morfotyczne mogą być ograniczone poprzez stosowanie niskich (w zakresie 1,0-2,5 μM) stężeń tidiazuronu (Mohamed i wsp., 1992). Szereg doniesień wskazuje jednocześnie na synergistyczny efekt dwóch cytokinin w pożywce, stymulujący powstawanie primordiów pędowych w kulturach *in vitro* roślin strączkowych, w tym np. *Pterocarpus santalinus* (Prakash i wsp., 2006) oraz *Ceris yunnanensis* (Cheong i Pooler, 2003). Z uwagi na powyższe, zdecydowano się nie zmieniać składu podłoża wzrostowego, zawierającego 9,84 μM 2iP i 1,0 μM TDZ, na etapie wyprowadzania ciągłych kultur pędowych, a jedynie pasażować biomasy na świeże podłoża, w 4-tygodniowych odstępach czasu, ciągle oddzielając mechanicznie fragmenty o niekorzystnej morfologii (tj. kalus i liście potworne). Opisana strategia okazała się skuteczna i umożliwiła uzyskanie, po 6 kolejnych pasażach, stabilnych i homogennych

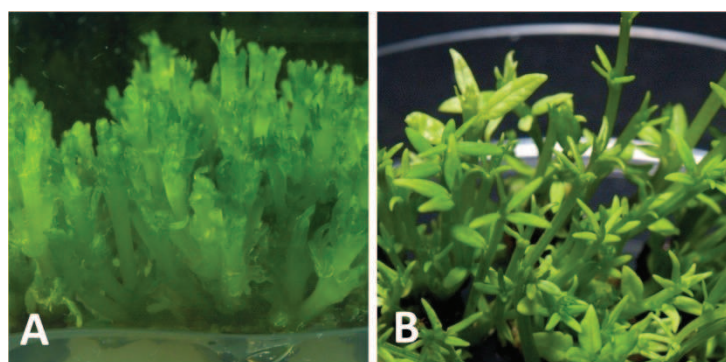
kultur mikropędowych. W przeciwieństwie do biomas parenchymatycznych *Cyclopia* sp., możliwe było w tym wypadku zastosowanie podłoża o tym samym składzie, w kultywacji mikroślinek wszystkich badanych miodokrzewów. Należy jednak zaznaczyć, że kultury mikropędowe poszczególnych gatunków wyraźnie różniły się pod względem morfologii oraz tempa wzrostu (wartość Gi – Tab. 7).

Tab. 7. Wartości współczynników przyrostu kultur pędowych *Cyclopia* sp., rosnących na pożywce Schenka-Hildebrandta (SH), suplementowanej 9,84 μM 2iP oraz 1,0 μM TDZ.

Gatunek	Gi (%) ^a
<i>C. intermedia</i>	450,6 \pm 35,7
<i>C. subternata</i>	520,4 \pm 43,7
<i>C. genistoides</i>	704,6 \pm 55,2

^a Współczynnik przyrostu mierzony po 30 dniach hodowli. Poszczególne wartości stanowią średnie arytmetyczne z 10 prób \pm SD.

Charakterystyka uzyskanych biomas była w dużym stopniu (większym niż w przypadku kultur kalusowych) odzwierciedleniem cech botanicznych roślin macierzystych. Najslabszym wzrostem (Gi \approx 450 %) charakteryzowały się kultury *C. intermedia*, gatunku wolno rosnącego również w warunkach naturalnych, najlepszym natomiast pędy *C. genistoides* (Gi \approx 700 %), należącej do szybko rosnących krzewów i wykorzystywanej obecnie do zakładania upraw komercyjnych (Joubert i wsp., 2008a, 2011). Wyprowadzone mikropędy *C. genistoides* cechowała obecność znacznej ilości zwitryfikowanych, drobnych liści oraz pewnej ilości kalusa, tworzącego się u podstawy eksplantatów (Fot. 7A). Pozbawione były one natomiast całkowicie liści potwornych, obecnych w kulturach inicjalnych. Kultury pędowe *C. subternata* posiadały morfologię zbliżoną do rośliny gruntowej (Fot. 7B), tzn. charakteryzowały się obecnością stosunkowo małej ilości primordiów pędowych a ich liście zachowały typowy dla gatunku lancetowaty kształt. Pędy i liście w kulturach *in vitro* opisywanego gatunku były również w mniejszym stopniu zwitryfikowane, niż opisane uprzednio mikropędy *C. genistoides*. Największą częstością występowania niekorzystnych zmian morfotycznych cechowały się kultury pędowe *C. intermedia*, wykazujące, pomimo sukcesywnego pasażowania, silne tendencje nekrotyczne i skłonność do tworzenia liści potwornych.



Fot. 7. Stabilne kultury mikropędowe: A – *Cyclopia genistoides* oraz B – *Cyclopia subternata*, prowadzone na zmodyfikowanej, stacjonarnej pożywce SH, suplementowanej 9,84 μM 2iP i 1,00 μM TDZ.

Podsumowując, w efekcie przeprowadzonych doświadczeń otrzymano po raz pierwszy kultury *in vitro* trzech gatunków z rodzaju *Cyclopia* (mikropędy oraz biomasy kalusowe), zdolne do ciągłego wzrostu w opracowanych warunkach. Zaproponowane procedury doświadczalne nie pozwoliły niestety na inicjację hodowli korzeni *de novo* badanych roślin. Uzyskane biomasy poszczególnych gatunków o najlepszych parametrach wzrostowych (Fot. 5 i 7; Tab. 6 i 7) przeznaczono następnie do analiz fitochemicznych.

II.1.1.4. Akumulacja związków polifenolowych w roślinach macierzystych oraz kulturach *in vitro* *Cyclopia* sp.

Materiał pozyskany z ciągłych, stacjonarnych kultur miodokrzewów, charakteryzujący się najlepszymi parametrami wzrostowymi (Tab. 6 i 7), poddano procedurom izolacyjnym oraz chromatograficznym (HPLC) analizom jakościowym i ilościowym, zgodnie z protokołem opisanym szczegółowo w rozdz. III.2.3., w celu określenia zdolności wspomnianych biomas do akumulacji związków polifenolowych. Przygotowane metanolowe wyciągi badano pod względem zawartości połączeń, których obecność stwierdzono wcześniej w materiale z roślin gruntowych (ksantony: mangiferyna i izomangiferyna oraz flawanony: hesperydyna, eriocytryna i narirutyna – Joubert i wsp., 2003, 2008a, c), jak również związków wyizolowanych i/lub zidentyfikowanych metodami spektroskopowymi (LC-ESI-MS, 1D i 2D NMR) w surowcach gruntowych (pochodne benzofenonu, dihydrochalkon, flawony, flawanony) i kulturach *in vitro* (izoflawony), w ramach prac fitochemicznych będących częścią niniejszego projektu (rozdz. II.2.3., II.2.4., III.2.4. oraz III.2.5.). Uzyskane wyniki porównywano następnie ze stężeniami polifenoli w niefermentowanym materiale roślinnym z upraw gruntowych. Przeprowadzone analizy pozwoliły na określenie zawartości poszczególnych związków w biomasach *in vitro*, a co za tym idzie, na ocenę przydatności wyprowadzonych kultur do prowadzenia dalszych doświadczeń biotechnologicznych, z zamiarem opracowania roślinnego systemu do ciągłej produkcji wybranych pochodnych fenylopropanu.

Chromatograficzne analizy jakościowe i ilościowe przygotowanych wyciągów wykazały wyraźne różnice w zawartości związków polifenolowych w poszczególnych matrycach roślinnych, w zależności od badanego gatunku i rodzaju kultury (Ryc. 2 i 3, Tab. 8).

Generalnie, zawartość metabolitów wtórnych z klasy ksantonów, charakterystycznych dla roślin gruntowych, była niższa w odpowiadających im kulturach *in vitro*, co może wskazywać w tym wypadku na słabszą aktywność enzymów szlaków fenylopropanoidowego i szikimowego. Wyjątek stanowiły pędy *in vitro* *C. subternata*, w których zawartość mangiferyny (**3**) i izomangiferyny (**4**) przekraczała ilości niniejszych związków oznaczone w niefermentowanym ziele rośliny gruntowej (Tab. 8).

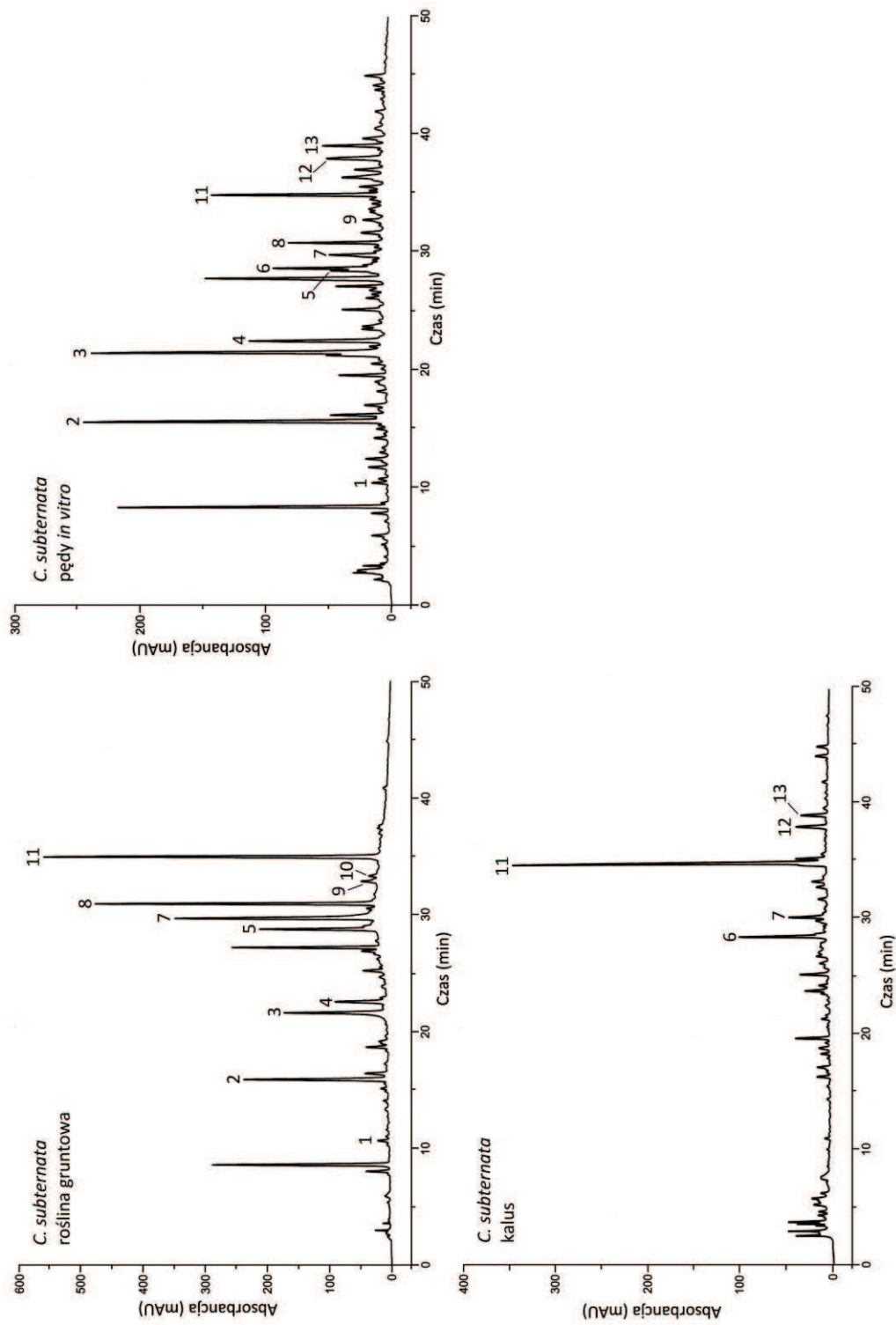
Tab. 8. Zawartość związków polifenolowych w stacjonarnych kulturach *in vitro* i roślinach gruntowych *Cyclopia* sp.*

Związek	<i>C. subternata</i>			<i>C. genistoides</i>			<i>C. intermedia</i>		
	Roślina gruntowa (surowiec niefermentowany)	Pędy <i>in vitro</i> (SH + 9,84 μM 2IP + 1,0 μM TDZ)	Kalus (MS + 20,19 μM 4-CPPU + 1,96 μM 2,4,5-T)	Roślina gruntowa (surowiec niefermentowany)	Pędy <i>in vitro</i> (SH + 9,84 μM 2IP + 1,0 μM TDZ)	Kalus (SH + 20,19 μM 4-CPPU + 2,27 μM 2,4-D)	Roślina gruntowa (surowiec niefermentowany)	Pędy <i>in vitro</i> (SH + 9,84 μM 2IP + 1,0 μM TDZ)	Kalus (MS + 20,19 μM 4-CPPU + 1,96 μM 2,4,5-T)
<i>Benzofenony</i>									
3-C-β-glukozyd makluryny (1)	32,0 ± 1,0	21,0 ± 4,0	nd	285,0 ± 11,0	15,0 ± 4,0	nd	30,0 ± 10,0	nd	nd
3-C-β-glukozyd irifloenonu (2)	448,0 ± 32,0	504,0 ± 40,0	nd	832,0 ± 5,0	854,0 ± 34,0	nd	272,0 ± 60,0	308,0 ± 40,0	nd
<i>Ksantony</i>									
Mangiferyna (3)	1312,0 ± 50,0	1547,0 ± 134,0	nd	5254,0 ± 140,0	968,0 ± 11,0	nd	2320,0 ± 19,0	1320,0 ± 10,0	nd
Izomangiferyna (4)	485,0 ± 3,0	562,0 ± 48,0	nd	1922,0 ± 59,0	225,0 ± 10,0	nd	857,0 ± 50,0	355,0 ± 50,0	nd
<i>Flawonony</i>									
Eriocytyna (5)	471,0 ± 30,0	222,0 ± 10,0	nd	nd	nd	nd	206,0 ± 20,0	nd	nd
Narirutyna (9)	12,0 ± 5,0	22,0 ± 9,0	nd	nd	nd	nd	78,0 ± 7,0	26,0 ± 5,0	nd
Hesperydyna (11)	1949,0 ± 18,0	873,0 ± 10,0	694,0 ± 40,0	659,0 ± 22,0	4,0 ± 0,0	33,0 ± 10,0	1638,0 ± 150,0	899,0 ± 80,0	12,0 ± 0,0
Didymina (14)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	801,0 ± 60,0	nd	nd
<i>Flawony</i>									
Skolimozyd (7)	516,0 ± 50,0	59,00 ± 10,0	19,0 ± 8,0	nd	nd	nd	18,0 ± 7,0	63,0 ± 10,0	nd
Izoroifolina (10)	19,0 ± 6,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Dihydrochalkony</i>									
3',5'-di-C-β-glukozyd floretyny (8)	510,0 ± 60,0	77,0 ± 20,0	nd	nd	nd	nd	83,0 ± 20,0	38,0 ± 5,0	nd
<i>Izoflawony</i>									
7-O-β-glukozyd kalikozyny (6)	nd	44,0 ± 5,0	44,0 ± 8,0	nd	25,0 ± 4,0	nd	nd	119,0 ± 10,0	nd
7-O-β-glukozyd pseudobaptygeniny (12)	nd	66,0 ± 10,0	18,0 ± 2,0	nd	70,0 ± 5,0	nd	nd	116,0 ± 11,0	nd
7-O-β-glukozyd formonetyny (13)	nd	53,0 ± 5,0	14,0 ± 2,0	nd	90,0 ± 5,0	nd	nd	64,0 ± 9,0	nd

* Zawartość związków wyrażona jako mg/100g suchej masy (DW).

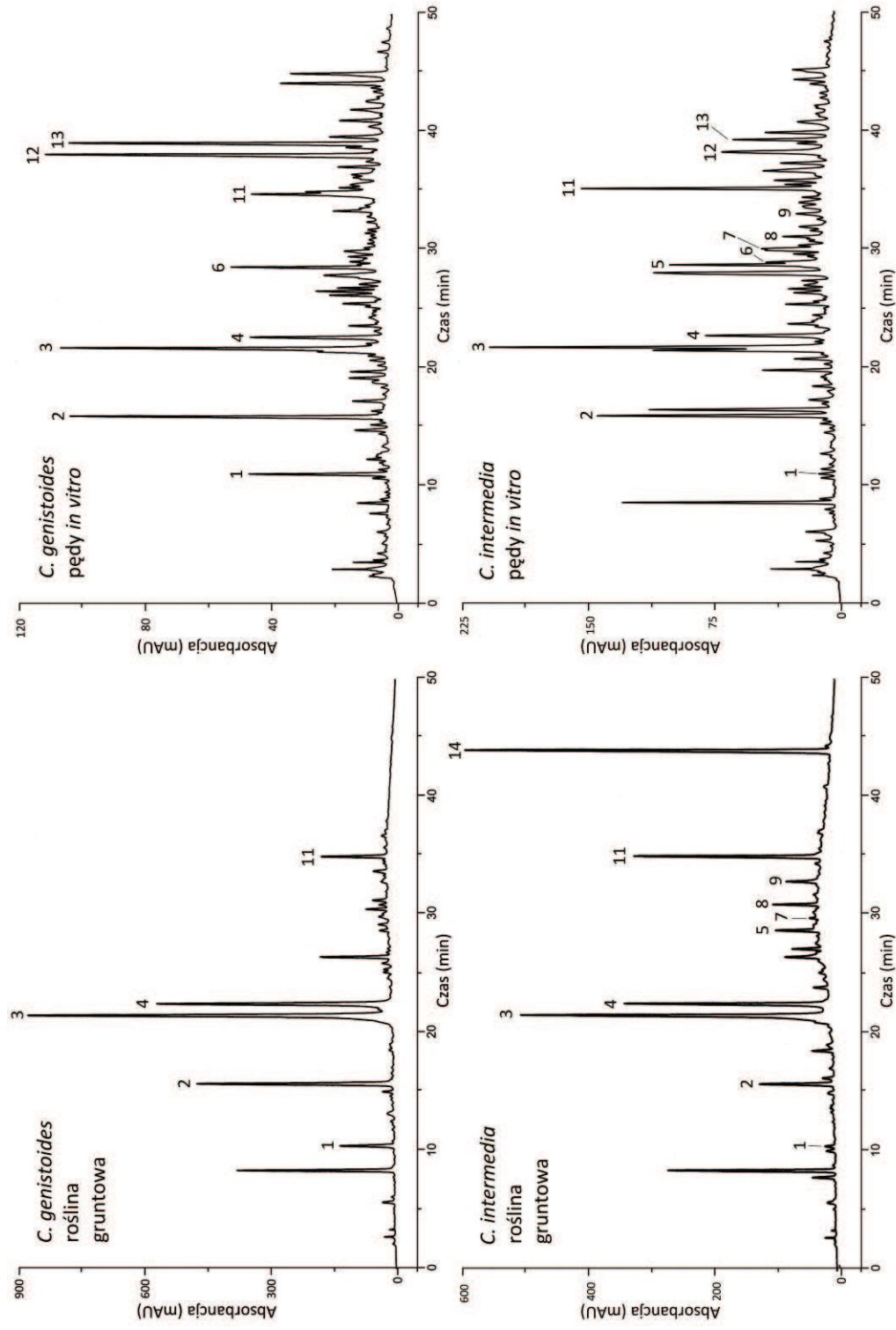
Wartości przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 5 prób ± SD.

Pogrubionym tekstem zaznaczono najwyższe stężenia poszczególnych metabolitów w roślinach gruntowych oraz biomasa *in vitro* *Cyclopia* sp.; **nd**, nie stwierdzono obecności związku.



Ryc. 2. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280$ nm) frakcji polifenolowych z niefermentowanego materiału rośliny gruntowej, pędów *in vitro* oraz kalusa *C. subternata*.

Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd makluryny; **2**, 3-C- β -glukozyd iriflenu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytryna; **6**, 7-O- β -glukozyd kalikozy; **7**, skoliozyd; **8**, 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny; **9**, narirutyna; **10**, izoroifolina; **11**, hesperodyna; **12**, 7-O- β -glukozyd pseudobaptygeniny; **13**, 7-O- β -glukozyd formononetyny.



Ryc. 3. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji polifenolowych z niefermentowanego materiału roślin gruntowych oraz pędów *in vitro* *C. intermedia* i *C. genistoides*. Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd makluryny; **2**, 3-C- β -glukozyd iriflenu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytryna; **6**, 7-O- β -glukozyd kalikozy; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-C- β -glukozyd fletyny; **9**, narirutyna; **10**, izoroifolina; **11**, hesperodyna; **12**, 7-O- β -glukozyd pseudobaptygeniny; **13**, 7-O- β -glukozyd formononetyny; **14**, didymina.

Wyniki oznaczeń ilościowych pokazują, że biosynteza ksantonów w kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Cyclopia*, jest w zasadniczym stopniu uzależniona od stopnia uorganizowania biomasy. Kalusy badanych gatunków nie zawierały mangiferyny i izomangiferyny (Ryc. 2 i 3), w przeciwieństwie do kultur pędowych, zdolnych do akumulacji wspomnianych połączeń (ok. 1000-1500 mg/100g DW, w zależności od gatunku – Ryc. 2 i 3; Tab. 8). O istotnym wpływie stopnia zróżnicowania tkankowego na zawartość ksantonów świadczy również fakt, że większe ilości omawianych związków stwierdzono w kulturach pędowych *C. subternata*, o morfologii zbliżonej do rośliny gruntowej, niższe natomiast w zwitryfikowanych mikropędach *C. genistoides* (Fot. 7, Tab. 8). Ponadto, opisywana zmienność wydaje się być spowodowana indywidualną charakterystyką gatunkową, jako że ziele rośliny gruntowej *C. genistoides* jest zdecydowanie bogatszym źródłem ksantonów w porównaniu do części nadziemnych *C. subternata*. Wskazują na to zarówno wyniki analiz wykonanych w ramach niniejszej pracy (Tab. 8), jak i dostępne dane literaturowe (Joubert i wsp., 2003, 2008c). W tym miejscu należy zaznaczyć, że przeprowadzone eksperymenty są pierwszymi z zakresu biosyntezy ksantonów w kulturach *in vitro* *Cyclopia* sp. Wcześniejsze badania nad akumulacją powyższej klasy związków, w warunkach hodowli komórkowych, prowadzone były z wykorzystaniem roślin z rodzajów *Centaurium* (Beerhues i Berger, 1994, 1995) oraz *Hypericum* (Dias i wsp., 2000, 2001; Pasqua i wsp., 2003; Mulinacci i wsp., 2008). Dowiodły one, że biomasy parenchymatyczne wymienionych roślin, odwrotnie niż kultury kalusowe *Cyclopia* sp., zachowują zdolność do produkcji ksantonów. W przypadku kultur komórkowych *Hypericum* sp., ksantony stanowiły główną grupę syntezowanych metabolitów wtórnych, podczas gdy hodowle pędowe, ukierunkowane na produkcję pochodnych hyperforiny, zawierały jedynie nieznaczne ilości wspomnianych połączeń (Pasqua i wsp., 2003; Mulinacci i wsp., 2008). Odmienne wyniki uzyskane w toku prac nad kulturami *in vitro* *Hypericum* sp. i *Cyclopia* sp. wskazują, że zależność pomiędzy stopniem cytodyferencjacji a zawartością ksantonów, może kształtować się inaczej w obrębie roślin należących do różnych rodzin. Wstępnie, może to wskazywać na odmienną organizację przestrzenną szlaku biosyntezy niniejszych związków a dokładne wyjaśnienie powyższego fenomenu wymaga dalszych, specjalistycznych badań.

Odwrotnie niż w przypadku ksantonów, nie zaobserwowano wyraźnej korelacji pomiędzy stopniem uorganizowania biomasy *in vitro* a zawartością flawanonów, których głównym przedstawicielem w roślinach z rodzaju *Cyclopia* jest hesperydyna (**11**) (Joubert i wsp., 2008a). Obecność wspomnianego związku stwierdzono zarówno w kalusie, jak i kulturach pędowych *C. subternata*. W gatunku *C. intermedia* był on obecny praktycznie tylko w mikropędach, zaś hodowle *in vitro* *C. genistoides* obydwu typów zawierały jedynie niewielkie ilości hesperydyny (Ryc. 2 i 3, Tab. 8). Stężenie oznaczonego metabolitu, w pędach *in vitro* *C. subternata*, było wyższe niż w kulturze kalusowej niniejszego gatunku, co może wskazywać na dodatnią korelację pomiędzy stopniem uorganizowania biomasy a akumulacją powyższego połączenia. W tym miejscu należy zaznaczyć, że hesperydyna jest jedynym flawanonem produkowanym w nieuorganizowanych kulturach *Cyclopia* sp. Pozostałe dwa związki z powyższej grupy, tj. eriocytryna (**5**) i narirutyna (**9**), obecne były jedynie w roślinach gruntowych i

kulturach mikropędowych *C. subternata* i *C. intermedia*. Najwyższą zawartością ericytryny charakteryzowały się przy tym mikropędy oraz rośliny gruntowe *C. subternata* (Tab. 8), co potwierdza wcześniejsze opracowania literaturowe dla poszczególnych gatunków miodokrzewów (Joubert i wsp., 2008c, 2010).

Niska zawartość hesperydyny w kulturach parenchymatycznych *C. intermedia* oraz kulturach pędowych i kalusowych *C. genistoides*, przy jednoczesnej obecności znacznych ilości powyższego połączenia w kalusie *C. subternata* (Tab. 8), jest trudna do wyjaśnienia z uwagi na fakt, że związek ten stanowi, obok mangiferyny i izomangiferyny, podstawowy metabolit wtórny występujący w częściach nadziemnych roślin z rodzaju *Cyclopia* (Joubert i wsp., 2008a, c; De Beer i Joubert, 2010). Można jedynie wskazać na istniejące w kulturach *in vitro* różnice pomiędzy poszczególnymi gatunkami miodokrzewów w zakresie zależności: zróżnicowanie tkankowe-biosynteza flawanonów. Warto dodać, że uzyskane wyniki są zbliżone do rezultatów wcześniejszych badań nad kulturami parenchymatycznymi roślin z rodzaju *Citrus*, produkujących w warunkach naturalnych szereg związków o charakterze rutynozydów, obecnych także w miodokrzewach, tj. hesperydynę, ericytrynę i narirutynę (Tripoli i wsp., 2007). W przeciwieństwie do gatunków macierzystych, kalusy roślin cytrusowych nie syntezowały wcale, bądź akumulowały jedynie nieznaczne ilości wymienionych wyżej związków (Barthe i wsp., 1987; Lewinsohn i wsp., 1989; Vandercook i Tisserat, 1989). Stwierdzono ponadto, że zawartość flawanonów w kulturach kalusowych *Citrus* sp. malała wraz z kolejnymi pasażami, zaś wykształcanie pędów, tak jak u części gatunków z rodzaju *Cyclopia*, wiązało się ze wzrostem zawartości wspomnianych połączeń (Barthe i wsp., 1987). Z drugiej strony, przeciwie do opisanych powyżej danych, nieuorganizowane biomasy parenchymatyczne wybranego gatunku, tj. *Citrus aurantium*, zachowały zdolność do biosyntezy znacznych ilości flawanonów (Del Río i wsp., 1992).

Podsumowując, wyniki analiz ilościowych otrzymanych biomas, w zakresie związków polifenolowych stanowiących podstawowe metabolity wtórne roślin macierzystych, tj. ksantonów i flawanonów, pokazują, że badane gatunki, w wyniku wprowadzenia do kultur *in vitro*, zachowały zdolność do produkcji charakterystycznych pochodnych fenylopropanu. Wykazano również, że akumulacja powyższych połączeń, w warunkach kultur tkankowych *Cyclopia* sp., jest wypadkową charakterystyki gatunkowej rośliny oraz, przede wszystkim, statusu morfologicznego uzyskanych biomas.

W toku prowadzonych badań fitochemicznych, opisanych szczegółowo w rozdz. II.2. i III.2., zarówno z roślin gruntowych, jak i otrzymanych po raz pierwszy kultur *in vitro* wyizolowano, a następnie określono strukturę połączeń polifenolowych dotychczas nie opisanych w badanych roślinach, bądź scharakteryzowanych w sposób niewystarczający (Joubert i wsp., 2008a, c; De Beer i Joubert, 2010). Na podstawie uzyskanych wyników oraz dzięki dostępności „nowych” substancji wzorcowych, pozyskanych w toku prac preparatywnych porównano, tak jak w przypadku ksantonów i flawanonów, otrzymane w warunkach *in vitro* biomasy oraz odpowiednie rośliny gruntowe.

W biomasach *in vitro* *C. subternata* (mikropędy i kalus) i *C. intermedia* (jedynie pędy *in vitro*) stwierdzono obecność skolimozydu (7-*O*-rutynozyd luteoliny) (**7**), stanowiącego flawonowy analog eriocytryny, przy czym zawartość wymienionego połączenia była największa w niefermentowanym materiale gruntowym pierwszego z wymienionych gatunków (ok. 500 mg/100g DW – Tab. 8). Podobnie jak w przypadku hesperydyny, wyższe stężenia skolimozydu odnotowano w mikropędach (ok. 60 mg/100 g DW) niż w nieuorganizowanej biomasie parenchymatycznej (ok. 20 mg/100 g DW) *C. subternata* (Tab. 8). Przeprowadzone analizy chromatograficzne HPLC są dla rodzaju *Cyclopia* pierwszymi, w których wykorzystano autentyczny, wewnętrzny wzorzec skolimozydu, pozyskany na drodze izolacji z materiału gruntowego *C. subternata* i zidentyfikowany przy użyciu technik NMR i LC-MS (rozdz. II.2. i III.2.). Jakkolwiek obecność powyższego połączenia w częściach nadziemnych *C. subternata* stwierdzono uprzednio w oparciu o wyniki analiz NMR (Kamara i wsp., 2004), niedostępność substancji referencyjnej uniemożliwiła 100 % potwierdzenie tożsamości skolimozydu w czasie późniejszych analiz chromatograficznych (masa cząsteczkowa identyczna z połączeniami izomerycznymi, np. neohesperydozydem luteoliny) (De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010). Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy pozwoliły tym samym ostatecznie potwierdzić obecność opisywanego związku w gatunku *C. subternata*, a także oznaczyć jego zawartość w poszczególnych biomasach.

Kolejnym flawonem wyizolowanym z miodokrzewów w toku prac preparatywnych była izoroifolina (7-*O*-rutynozyd apigeniny) (**10**) (Ryc. 2). Podobnie jak skolimozyd, powyższy związek pozyskany został z części nadziemnych *C. subternata*. Jakkolwiek izoroifolina nie została zidentyfikowana w częściach nadziemnych miodokrzewów w czasie wcześniejszych badań (Joubert i wsp., 2008a), jej obecność była do pewnego stopnia spodziewana. Doniesienia literaturowe wskazują bowiem na możliwość zwiększania stężenia skolimozydu w materiale z *C. subternata* w trakcie jego suszenia, jako skutek utleniania flawanonu eriocytryny (Joubert i wsp., 2010). Nie jest zatem wykluczone, że podobna zależność istnieje również pomiędzy izoroifoliną a jej flawanonowym odpowiednikiem – narirutyną, występującą w opisanym surowcu. Wspomniana korelacja może być jednak trudna do ustalenia ze względu na niewielkie stężenia obydwu pochodnych w materiale gruntowym (odpowiednio ok. 10 i 20 mg/100 g DW narirutyny i izoroifoliny – Tab. 8).

Oprócz wymienionych związków, w niefermentowanym ziele *C. intermedia* stwierdzono również po raz pierwszy, w oparciu o kochromatografię z autentycznym wzorcem oraz analizę widma LC-MS, obecność kolejnego flawanonu tj. didyminy (7-*O*-rutynozyd izosakuranetyny) (**14**) (Ryc. 3, Tab. 8; rozdz. II.2. i III.2.). Jakkolwiek dane literaturowe wskazywały na obecność glikozydu izosakuranetyny w liściach szeregu gatunków z rodzaju *Cyclopia*, nie przeprowadzono jednak pełnej analizy strukturalnej opisywanego związku (De Nysschen i wsp., 1996). Niezidentyfikowane połączenie o charakterze flawanonu i widmie masowym odpowiadającym didyminie obecne było również w ekstraktach z materiału gruntowego *C. intermedia* (De Beer i Joubert, 2010). Wyniki opisanych w literaturze analiz, jak również badania przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że 7-*O*-rutynozyd izosakuranetyny jest połączeniem charakterystycznym dla *C. intermedia*, obecnym w niefermentowanym

surowcu gruntowym w ilości ok. 800 mg/100 g DW). Obecności wymienionego związku, w przeciwieństwie do hesperydyny, nie stwierdzono jednak w kulturach *in vitro* powyższego gatunku (Ryc. 3, Tab. 8).

Związkami zidentyfikowanymi po raz pierwszy w roślinach z rodzaju *Cyclopia* jako całkiem nowa klasa metabolitów wtórnych, były pochodne benzofenonu – 3-*C*- β -glukozydy makluryny (**1**) i iriflofenonu (**2**) oraz dihydrochalkon – 3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny (**8**). Pierwsze dwa z wymienionych połączeń obecne były w niefermentowanych surowcach gruntowych *C. subternata*, *C. genistoides* i *C. intermedia*, jak również w kulturach pędowych powyższych gatunków (Ryc. 2 i 3, Tab. 8). Największe stężenie 3-*C*- β -glukozydu makluryny (ok. 290 mg/100 g DW) odnotowano w surowcu gruntowym *C. genistoides*, stanowiącym jednocześnie najbogatsze źródło ksantonów. Części nadziemne oraz mikropędy powyższego gatunku charakteryzowały się ponadto najwyższą zawartością 3-*C*- β -glukozydu iriflofenonu (odpowiednio ok. 830 i 850 mg/100 g DW). Podobnie jak w przypadku mangiferyny i izomangiferyny, akumulacja benzofenonów w kulturach *in vitro* *Cyclopia* sp. wydaje się być związana ze stopniem uorganizowania biomasy. Mikropędy wszystkich gatunków zawierały znaczne ilości 3-*C*- β -glukozydu iriflofenonu, a także niewielkie ilości 3-*C*- β -glukozydu makluryny (do ok. 20 mg/100 g DW). W przeciwieństwie do kultur pędowych, kalusy badanych roślin były całkowicie pozbawione opisywanych połączeń (Tab. 8). W tym miejscu należy zaznaczyć, że zidentyfikowane pochodne benzofenonu są kluczowymi metabolitami pośrednimi w szlaku biosyntezy ksantonów (Ehlting i wsp., 2006; El-Seedi i wsp., 2010) występującymi, obok mangiferyny i izomangiferyny, w takich roślinach jak *Mangifera indica* i *Anemarrhena asphodeloides* (Fujita i Inoue, 1980a, b, 1981; Tanaka *et al.*, 1984; Barreto i wsp., 2008). Brak powyższych związków, a także ksantonów, w biomasach parenchymatycznych *Cyclopia* sp. może zatem świadczyć o wystąpieniu blokady metabolicznej na wczesnym etapie biosyntezy omawianych połączeń (hipotetyczny brak aktywności syntazy benzofenonowej) (Ehlting i wsp., 2006).

Wykrycie pochodnych benzofenonu w roślinach z rodzaju *Cyclopia*, jakkolwiek do pewnego stopnia spodziewane, może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów wybranych działań biologicznych, stwierdzonych uprzednio dla wyciągów z miodokrzewów. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że ekstrakty z *C. intermedia* charakteryzuje silnie zaznaczone działanie fotoprotekcyjne w warunkach *in vivo*, mogące wynikać m.in. z pochłaniania promieniowania ultrafioletowego przez badane wyciągi (Petrova i wsp., 2011). Z uwagi na fakt, że pochodne benzofenonu są powszechnie stosowane jako składniki czynne kremów chroniących przed promieniowaniem UV (Suzuki i wsp., 2005), obecność 3-*C*- β -glukozydów iriflofenonu i makluryny może przynajmniej częściowo tłumaczyć własności fotoprotekcyjne ekstraktów z miodokrzewów. Nie bez znaczenia jest również fakt, że szereg benzofenonów, w tym iriflofenon, wykazuje wyraźnie zaznaczone działanie estrogenne w stosunku do linii komórkowej raka piersi MCF-7 (Monthakantirat i wsp., 2005; Suzuki i wsp., 2005). Podobną aktywność wobec powyższej linii stwierdzono uprzednio dla ekstraktów z miodokrzewów (Mfenyana i wsp., 2008), co może wskazywać na udział opisywanych pochodnych benzofenonu w zaistnieniu obserwowanego efektu.

Wykryty w ziele roślin gruntowych, a także w kulturach *in vitro* *C. subternata* i *C. intermedia* 3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny (**8**), jest pierwszą pochodną dihydrochalkonu stwierdzoną w biomasach *Cyclopia* sp. Związek ten wyizolowano z materiału gruntowego *C. subternata*, a następnie zidentyfikowano w ramach eksperymentów przedstawionych w rozdz. II.2. i III.2. Największe stężenie 3',5'-di-*C*- β -glukozydu floretyny oznaczono w niefermentowanym ziele rośliny gruntowej *C. subternata* (510,0 mg/100 g DW), zdecydowanie niższe natomiast w kulturach pędowych wspomnianego gatunku (77,0 mg % DW), jak również w materiale gruntowym (83,0 mg/100 g DW) i pędach *in vitro* *C. intermedia* (38,0 mg/100 g DW) (Tab. 8). Powyższego związku nie wykryto natomiast w materiale gruntowym i pędach *C. genistoides*, jak również w biomasach parenchymatycznych żadnego spośród badanych gatunków miodokrzewów (Ryc. 2 i 3, Tab. 8).

Podobnie jak w przypadku pochodnych benzofenonu, obecność 3',5'-di-*C*- β -glukozydu floretyny w ekstraktach z *Cyclopia* sp. może w istotnym stopniu przyczyniać się do wywieranego przez nie efektu fitoestrogennego. Aktywność tego typu stwierdzono uprzednio dla szeregu dihydrochalkonów, w tym notofaginy i aspalatyny, stanowiących główne składniki czerwonoekrzewu (*Aspalathus linearis*), wykorzystywanego do produkcji herbaty rooibos (Shimamura i wsp., 2006), jak również dla florydzyiny, występującej m.in. w jabłkach (Wang i wsp., 2010). Badania nad aktywnością estrogeną wyciągów z miodokrzewów wykazały jednocześnie, że najsilniejszy efekt wywierany był przez frakcję *C. subternata* o wysokim stężeniu niezidentyfikowanego polifenolu o masie cząsteczkowej odpowiadającej właśnie 3',5'-di-*C*- β -glukozydowi floretyny (Mfenyana i wsp., 2008). Przytoczone dane, wraz z wynikami doświadczeń wykonanych w ramach niniejszego projektu, wskazują tym samym na możliwy udział powyższego dihydrochalkonu w generowaniu efektu estrogennego, wymaga to jednak przeprowadzenia dalszych badań „biologicznych” z użyciem ekstraktów z *Cyclopia* sp.

W wyniku wprowadzenia miodokrzewów do kultur *in vitro*, w otrzymanych biomasach, a w szczególności w kalusach poszczególnych gatunków, stwierdzono obecność trzech nowych połączeń, nie występujących w roślinach macierzystych. Tożsamość powyższych związków określono metodami NMR i LC-MS, po uprzednim wyizolowaniu ich z biomasy kalusowej *C. subternata* (rozdz. II.2. i III.2.). Wszystkie one, tj. 7-*O*- β -glukozydy kalikozyny (**6**), pseudobaptygeniny (rotindyna) (**12**) i formononetyny (ononina) (**13**), należą do klasy izoflawonów i obecne były w kulturach pędowych wszystkich badanych gatunków oraz w kalusie parenchymatycznym *C. subternata*. Biomasy kalusowe *C. intermedia* i *C. genistoides* nie zawierały natomiast niniejszych połączeń (Ryc. 2 i 3, Tab. 8). Wzajemny stosunek ilościowy poszczególnych związków w matrycach roślinnych różnił się w zależności od badanego gatunku i rodzaju biomasy, jednak w każdym przypadku stężenia izoflawonów były stosunkowo niskie (ok. 50-100 mg/100 g DW). Jakkolwiek opisywanych w kulturach *in vitro* glukozydów nie wykryto dotychczas w roślinach gruntowych, to odpowiadające im aglikony (kalikozyna, pseudobaptygenina i formononetyna) wraz z innymi izoflawonami (fudżikinetyna i afromozyna), zidentyfikowano uprzednio w ziele *C. intermedia* (Ferreira i wsp., 1998). Co istotne, obecności wolnych izoflawonów w

materiale gruntowym nie potwierdziły żadne późniejsze analizy chromatograficzne (Joubert i wsp., 2008a, c; De Beer i Joubert, 2010), włączając badania prezentowane w niniejszej pracy (Tab. 8). Jest to najprawdopodobniej spowodowane niską zawartością wymienionych związków w matrycach roślinnych, znajdującą się poniżej limitu detekcji stosowanych technik instrumentalnych.

Zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi, biosynteza połączeń izoflawonoidowych w kulturach *in vitro* roślin strączkowych nie wymaga zróżnicowania tkankowego. W przypadku szeregu gatunków (m.in. *Glycine max*, *Cicer arietinum*, *Maackia amurensis* oraz *Genista* sp.) stwierdzono nawet, że większą, w stosunku do roślin macierzystych, zawartością powyższych związków, charakteryzowały się nieorganizowane biomasy parenchymatyczne (Łuczkiwicz, 2008). Indukcję wybiórczej biosyntezy izoflawonoidów w kulturach *in vitro* *Cyclopia* sp. można tłumaczyć ogólnie zmianą warunków środowiskowych, a co za tym idzie, dostępności substancji odżywczych, ciśnienia osmotycznego, reżimu oświetleniowego i temperatury. Szereg izoflawonów należy ponadto do fitoaleksyn, czyli związków syntezowanych przez rośliny pod wpływem czynników stresogennych, takich jak atak patogenów, nagła zmiana temperatury oraz promieniowanie ultrafioletowe (Dixon, 1999; Łuczkiwicz, 2008). Zwiększenie akumulacji powyższych połączeń można w związku z tym tłumaczyć ogólnie rozumianą reakcją obronną organizmu roślinnego, spowodowaną stresem związanym z przeniesieniem danego gatunku do kultur *in vitro* (mechaniczne uszkodzanie tkanek, stres osmotyczny).

Podobnie jak w przypadku flawanonów, stężenie izoflawonów w kulturach *Cyclopia* sp. wydaje się zależeć zarówno od rodzaju biomasy, jak i od badanego gatunku miodokrzewu. I tak, wyższą zawartością powyższych połączeń charakteryzowały się mikropędy wszystkich badanych roślin (ilości poszczególnych izoflawonów na poziomie od ok. 30 do 110 mg/100 g DW), mniejszą natomiast parenchymatyczny kalus *C. subternata* (stężenia od ok. 10 do 50 mg/100 g DW – Tab. 8).

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na wyprowadzenie, po raz pierwszy, kultur kalusowych i mikropędowych trzech gatunków endemicznych, południowoafrykańskich krzewów: *Cyclopia intermedia*, *Cyclopia subternata* i *Cyclopia genistoides*. Stwierdzono, że indukcja kultur *in vitro* wyżej wymienionych roślin jest wyjątkowo trudna, co wiąże się z dużą tendencją tkanek do produkcji prostych fenoli oraz bardzo zindywidualizowanymi wymaganiami co do podstawowego składu pożywek oraz zawartości poszczególnych regulatorów wzrostu. W rezultacie, nie udało się zoptymalizować warunków kultury miodokrzewów, tak by możliwe było zastosowanie tylko jednego medium wzrostowego dla wszystkich badanych gatunków. Wyniki doświadczeń wskazują więc na dużą heterogenność rodzaju *Cyclopia*, w zakresie wymagań odnośnie warunków wzrostowych. Między innymi może to wynikać z endemicznego charakteru badanych roślin.

Uzyskane biomasy oceniono pod względem morfologii, parametrów wzrostowych i zawartości wybranych związków polifenolowych. Spośród kultur parenchymatycznych, najlepszym wzrostem charakteryzował się kalus *C. subternata*

(współczynnik $G_i \approx 1200\%$), w przypadku kultur organowych zaś najszybciej rosnącą biomasą były mikropędy *C. genistoides* ($G_i \approx 700\%$). Przeprowadzone analizy fitochemiczne wykazały, że wszystkie badane gatunki, w warunkach kultur *in vitro*, zachowują zdolność do biosyntezy podstawowych metabolitów szlaku fenylopropanoidowego, charakterystycznych dla roślin gruntowych. Akumulacja poszczególnych połączeń polifenolowych w hodowlach tkankowych jest uwarunkowana gatunkowo, a ponadto zależy w zasadniczym stopniu od stopnia zróżnicowania morfologicznego badanej kultury. Uogólniając, ksantony niezależnie od badanej rośliny, syntezowane były wybiórczo jedynie w mikropędach miodokrzewów, co wskazuje na konieczność zaistnienia cytodyferencjacji biomas celem uzyskania akumulacji niniejszych połączeń. W przypadku flawanonów zjawisko to było o wiele bardziej złożone. Obecność omawianych związków odnotowano zarówno w kulturach pędowych jak i kalusowych, z tym, że w tych ostatnich stężenia badanych połączeń były znacznie zredukowane. Dowodzi to, że w przypadku flawanonów wysoki stopień zróżnicowania morfologicznego nie jest niezbędny do zapoczątkowania biosyntezy tych flawonoidów, ale wyraźnie je stymuluje. Samo wprowadzenie miodokrzewów do kultur *in vitro* miało zasadniczy wpływ na zmiany w zakresie wtórnego metabolizmu w badanych roślinach. Stwierdzono, niezależnie od typu biomas, zahamowanie biosyntezy benzofenonów, flawonów oraz dihydrochalkonów, które w materiale roślinnym z kultur tkankowych występują w znacznie niższych stężeniach. Jednocześnie otrzymane tkanki charakteryzowało pojawienie się nowej klasy związków nieobecnych w roślinach macierzystych, tj. izoflawonoidów. Z uwagi na jednoznaczne zahamowanie biosyntezy pozostałych badanych polifenoli (ksantony, dihydrochalkony), szczególnie kultury kalusowe można rozważyć jako wybiórcze źródło tych połączeń.

Porównując profile produkcyjne oraz wzrostowe otrzymanych tkanek, ze względu na podstawowy cel projektu badawczego, do dalszych doświadczeń biotechnologicznych wybrano kultury pędowe *C. genistoides* oraz biomas kalusowe *C. subternata*.

Kalus *C. subternata*, poza szybkim wzrostem ($G_i \approx 1200\%$), charakteryzował się wysoką homogennością oraz luźną, parenchymatyczną konsystencją, czyniącą z niego dobry materiał do inicjacji kultur zawieszinowych, stanowiących następny etap prowadzenia eksperymentów biotechnologicznych ukierunkowanych na wybiórczą produkcję określonych metabolitów wtórnych. Ponadto wykazywał on, jako jedyny spośród uzyskanych biomas nieuorganizowanych, zdolność do wybiórczej akumulacji izoflawonów. Pozostałe z uzyskanych kultur kalusowych okazały się całkowicie nieprzydatne do dalszych badań ze względu na praktycznie całkowity brak połączeń polifenolowych oraz heterogenność materiału tkankowego.

Druga z wyselekcjonowanych kultur, tj. mikropędy *C. genistoides*, cechowała się stabilnym (brak liści potwornych i zmian nekrotycznych) i stosunkowo szybkim wzrostem ($G_i \approx 700\%$), a także zdolnością do tworzenia dużej ilości primordiów pędowych. Dodatkowo, kultury pędowe *C. genistoides* zachowały zdolność do biosyntezy ksantonów i flawanonów, charakterystycznych dla roślin gruntowych, jak również wspomnianych wyżej izoflawonoidów, stanowiąc matrycę roślinną o dużym stopniu zróżnicowania metabolicznego. Z uwagi na znacznie wolniejsze przyrosty

biomas i/lub występowanie niekorzystnych zmian morfologicznych (powstawanie kalusa i liści potwornych), w dalszych pracach eksperymentalnych nie wykorzystano, pomimo wyższej inicjalnej zawartości związków polifenolowych, kultur pędowych *C. intermedia* i *C. subternata*.

II.1.2. Kultury parenchymatyczne *Cyclopia subternata*

II.1.2.1. Wpływ czynników fizycznych na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych *Cyclopia subternata*

Prowadzone od szeregu lat badania wykazały, że zarówno wzrost biomasy, jak i biosynteza połączeń naturalnych w roślinnych kulturach *in vitro*, są wyraźnie uzależnione od wpływu czynników fizycznych, związanych z warunkami prowadzonego eksperymentu. Pośród nich wymienić należy przede wszystkim oświetlenie, temperaturę, jak również szeroko rozumiane czynniki stresowe. Podobnie jak w przypadku roślin gruntowych, warunki w eksperymentach biotechnologicznych muszą być dostosowane do konkretnego gatunku oraz jego specyficznych wymagań. Przykładowo, w celu zapewnienia optymalnego wzrostu kultur *in vitro* gatunków tropikalnych, konieczne jest często prowadzenie doświadczeń w podwyższonej temperaturze (Shekhawat i wsp., 1993; Thanonkeo i Panichajakul, 2006), zaś w przypadku roślin z rodzaju *Vaccinium* niezbędne jest zastosowanie oświetlenia o niskim natężeniu (Reed i Abdelnour-Esquivel, 1991). Czynniki fizyczne, w tkankach roślinnych, wywierają bezpośredni bądź pośredni wpływ zarówno na metabolizm pierwotny, jak i akumulację szeregu metabolitów wtórnych. Stwierdzono m.in., że obecność światła jest w wielu przypadkach niezbędna do biosyntezy związków antocyjanowych, inicjując kaskadę reakcji prowadzących do powstania wspomnianych połączeń (Łuczkiwicz i Cisowski, 2001). Obecność lub brak oświetlenia wpływa ponadto, w sposób jakościowy jak i ilościowy, na akumulację innych połączeń bioflawonoidowych, na przykład izoflawonów w kulturach *in vitro* *Glycine max* i *Genista* sp. (Łuczkiwicz, 2008). Wykazano również istotną rolę długości fali promieniowania w procesie wzrostu biomasy i akumulacji szeregu metabolitów szlaku fenylopropanoidowego, w tym flawonoidów w kulturach kalusowych *Saussurea medusa* (Guo i wsp., 2007), glikozydów fenolowych w kalusie *Cistanche deserticola* (Ouyang i wsp., 2003) oraz kwasów fenolowych w pędach *Ruta graveolens* (Szopa i wsp., 2012). Poza oświetleniem, istotnym czynnikiem warunkującym tempo przyrostu biomasy i biosyntezę metabolitów wtórnych jest temperatura. Stwierdzono m.in., że wpływa ona w istotny sposób na parametry wzrostowe i akumulację alkaloidów tropanowych w kulturach korzeniowych *Datura stramonium* (Hilton i Rhodes, 1994), jak również na biosyntezę izoflawonów w kalusie *Pueraria candollei* (Thanonkeo i Panichajakul, 2006).

Oprócz bezpośredniego wpływu na pierwotny i wtórny metabolizm, czynniki fizyczne mogą indukować produkcję metabolitów wtórnych poprzez wywołanie odpowiedzi obronnej w badanej roślinie (Ramakrishna i Ravishankar, 2011). Zjawisko

to dotyczy szeregu związków o budowie flawonoidowej (Treutter, 2006), w szczególności zaś izoflawonów, ze względu na ich przynależność do grupy fitoaleksyn, tj. metabolitów produkowanych przez rośliny w odpowiedzi na czynniki stresowe (Dixon, 1999; Łuczkiwicz, 2008). Z uwagi na powyższe, biosynteza wspomnianych połączeń może być indukowana na drodze stresu temperaturowego, co zaobserwowano m.in. w przypadku takich gatunków jak *Glycine max* (Łuczkiwicz, 2008) i *Astragalus membranaceus* (Pan i wsp., 2007), bądź poddania biomas działaniu promieniowania ultrafioletowego, jak w wypadku *Phaseolus vulgaris* (Łuczkiwicz, 2008) i *Genista tinctoria* (Tůmová i Tůma, 2011). Możliwość pełnej kontroli warunków fizycznych podczas prowadzenia eksperymentu sprawia, że roślinne kultury *in vitro* stanowią odpowiedni model do badań nad wpływem oświetlenia i temperatury na wzrost biomas oraz produkcję związków izoflawonoidowych. Wspomniane doświadczenia, prowadzone najczęściej z wykorzystaniem kultur tkankowych wybranych gatunków z rodziny *Fabaceae*, ukierunkowane są na poznanie fizjologicznych mechanizmów biosyntezy fitoaleksyn, bądź uzyskanie wysokoproduktywnych biomas, wykorzystywanych jako źródło związków o określonej aktywności biologicznej (Łuczkiwicz, 2008).

Kierując się podstawowym celem pracy, jakim było uzyskanie bogatego źródła związków polifenolowych w oparciu o biomasę *in vitro* *Cyclopia* sp., zamierzano sprawdzić, czy modyfikacja warunków fizycznych, podczas prowadzenia powyższych kultur, może spowodować podwyższenie zawartości wybranych metabolitów wtórnych. Do doświadczeń wybrano uzyskany uprzednio kalus *C. subternata*, charakteryzujący się obecnością trzech unikatowych połączeń izoflawonoidowych, a także flawanonu hesperydyny (rozd. II.1.1.4. – Ryc. 2, Tab. 8). Poza składem chemicznym, wybór powyższej biomas uzasadniony był jej dużą homogennością (brak różnicowania morfologicznego), luźną konsystencją oraz szybkim wzrostem (współczynnik $G_i > 1200\%$) (rozd. II.1.1.2. – Tab. 6). Z uwagi na powyższe cechy, kalus *C. subternata* uznano za odpowiedni do prowadzenia badań z zakresu wpływu czynników fizycznych na akumulację związków polifenolowych. Parenchymatyczna konsystencja oraz krótki okres podwojenia biomas sprawiają z kolei, że opisywana kultura jest właściwa do prowadzenia dalszych prac biotechnologicznych, obejmujących wprowadzenie hodowli zawieszinowych oraz zwiększenie skali eksperymentu.

W ramach przeprowadzonych badań, postanowiono wykorzystać opisane w literaturze strategie eksperymentalne, obejmujące prowadzenie kultur kalusowych w warunkach całkowitej ciemności lub przy dostępie światła dziennego, a także modyfikacje oświetlenia przy użyciu filtrów barwnych o zdefiniowanej charakterystyce (rozd. III.1.6.1. – Tab. 21). Biorąc pod uwagę izoflawonową budowę związków obecnych w kalusie *C. subternata* (7-O- β -glukozydy kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny) (rozd. II.1.1.4.), uzasadnione wydawało się ponadto zastosowanie czynników stresowych mogących indukować biosyntezę połączeń o charakterze fitoaleksyn. Spośród szeregu strategii, zdecydowano się na wykorzystanie opisanego wcześniej w literaturze stresu temperaturowego oraz naświetlanie kalusa promieniowaniem ultrafioletowym (Łuczkiwicz, 2008). Skuteczność stosowanych procedur określano badając ich wpływ na przyrost biomas (wyrażony jako

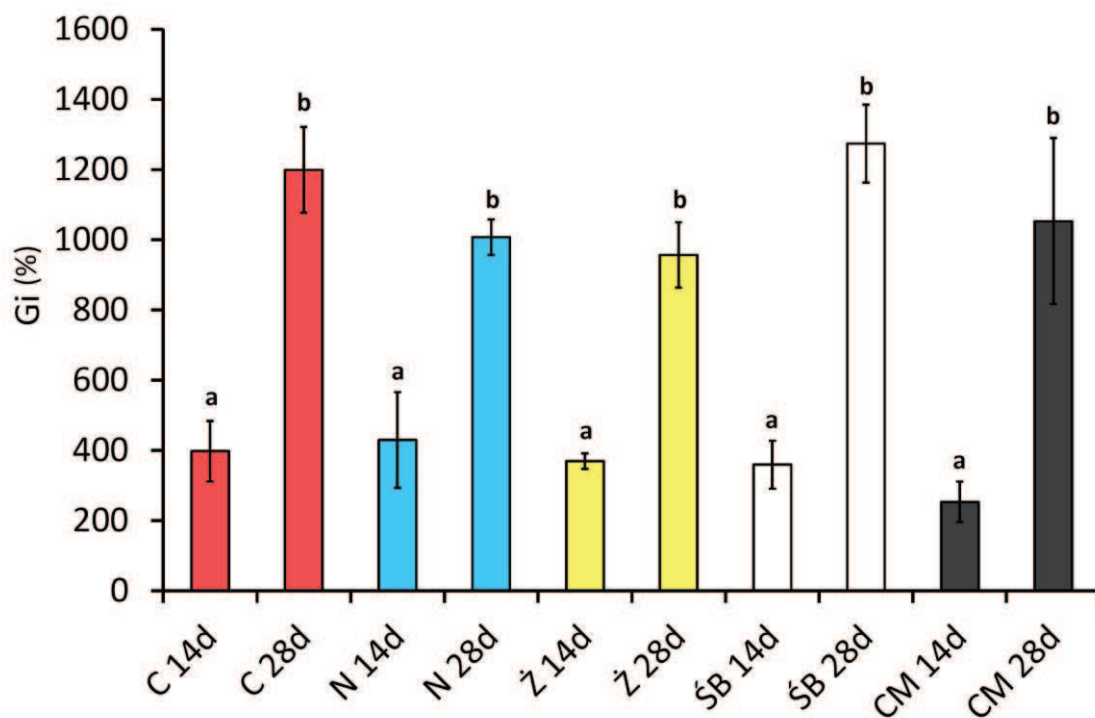
współczynnik przyrostu G_i) oraz ich wtórny metabolizm, tj. akumulację wybranych związków polifenolowych z grupy flawanonów i izoflawonów.

II.1.2.1.1. Wpływ warunków oświetleniowych na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych *Cyclopia subternata*

W celu określenia wpływu oświetlenia na parametry wzrostowe i produkcję związków polifenolowych w kalusie *C. subternata*, badaną biomasę kultywowano przy ciągłym dostępie światła dziennego (rozumianego jako standardowe oświetlenie jarzeniowe stosowane w doświadczeniach biotechnologicznych – rozdz. III.1.2.) lub modyfikowanego za pomocą filtrów barwnych o zdefiniowanej charakterystyce (czerwony, niebieski i żółty – rozdz. III.1.6.1., Tab. 21). Ponadto, biomasy hodowano również w warunkach całkowitej ciemności. Kalusy zbierano w 14 i 28 dniu eksperymentu, wyznaczając następnie odpowiadające im wartości współczynników przyrostu. Uzyskane matryce roślinne opisywano pod względem cech morfologicznych (barwa, konsystencja, obecność fragmentów objętych nekrozą itp.), a następnie liofilizowano i poddawano analizie fitochemicznej.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że uzyskana kultura parenchymatyczna charakteryzuje się stosunkowo dobrym wzrostem (Łuczkiwicz i Głód, 2003; Łuczkiwicz, 2006), o czym świadczą wartości współczynnika przyrostu G_i , wynoszące w dniu 28 ok. 1000-1200 %, w zależności od zastosowanej modyfikacji oświetlenia (Ryc. 4). Wartości G_i na poziomie ok. 300-400 %, wyznaczone dla biomas 14-dniowych, wskazują jednocześnie, że badany kalus nie należy do bardzo szybko rosnących i w dniu 14 znajduje się cały czas w fazie intensywnego wzrostu. Pomimo pewnych różnic między wybranymi schematami doświadczalnymi, szeroko rozumiane warunki oświetleniowe nie wywierały istotnego statystycznie wpływu na wzrost kalusów *C. subternata* (Ryc. 4). Najwyższe wartości G_i uzyskano w przypadku kultur rosnących w świetle dziennym (1273,75 %) oraz modyfikowanym za pomocą filtra czerwonego (1198,88 %) (Ryc. 4). Ponadto otrzymane biomasy nie różniły się zasadniczo pod względem morfologii, zachowując jasnożółtą barwę i luźną konsystencję (Fot. 8) przez cały cykl hodowlany (28 dni).

Przeprowadzone dotąd nieliczne eksperymenty *in vitro*, dotyczące modyfikacji oświetlenia filtrami barwnymi, nie wykazały jednoznacznej zależności między zakresem użytego promieniowania a tempem przyrostu biomas parenchymatycznych. Korzystny wpływ światła czerwonego na ilość uzyskanej tkanki odnotowano np. w kulturach kalusowych *Saussurea medusa* (Guo i wsp., 2007), natomiast światło niebieskie stymulowało wzrost biomasy *Cistanche deserticola* (Ouyang i wsp., 2003). Uzyskane efekty, w postaci zwiększonych przyrostów kalusa, tłumaczono m.in. aktywacją fitochromu. Oprócz powyższych obserwacji, objaśniono wyczerpująco rolę światła na poszczególnych stadiach organogenezy (kiełkowanie nasion, tworzenie pędów oraz ryzogeneza), co ma istotne znaczenie w opracowaniu procedur związanych z nowatorskimi protokołami mikrorozmnażania (Rout i wsp., 2000).



Ryc. 4. Wpływ warunków oświetleniowych na wzrost kalusa *Cyclopia subternata*, wyrażony jako wartość współczynnika przyrostu biomasy (Gi).

Kultury prowadzono w warunkach ciągłego oświetlenia bądź całkowitej ciemności przez cały cykl hodowlany.

Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Zastosowane skróty: C, filtr czerwony; N, filtr niebieski; Ż, filtr żółty; ŚB, światło białe (dienne); CM, ciemność; 14d, biomasa zebrana w dniu 14; 28d, biomasa zebrana w dniu 28.

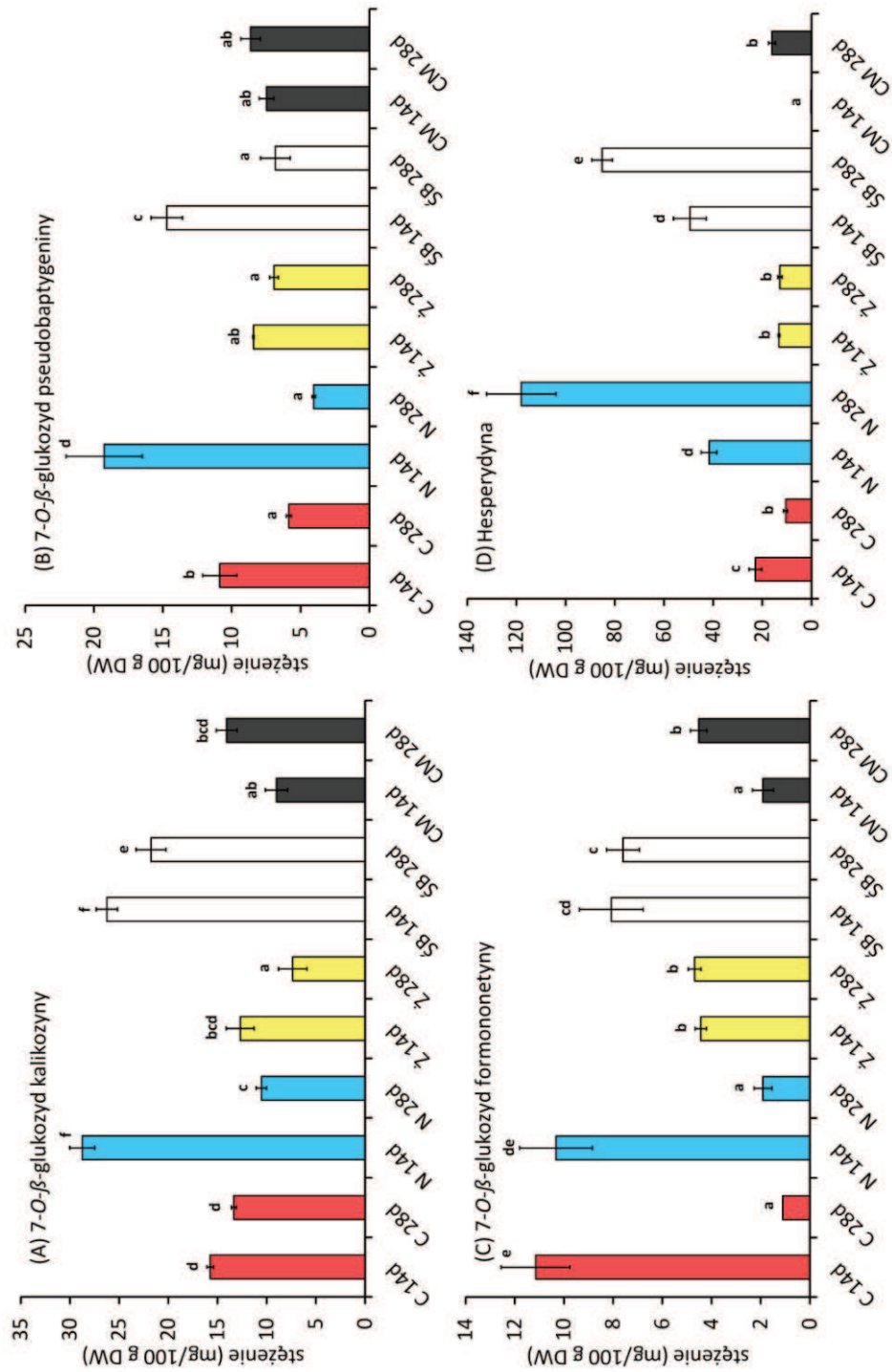


Fot. 8. Kalus *Cyclopia subternata* rosnący w warunkach całkowitego zaciemnienia na zmodyfikowanej pożywce Murashige'a-Skooga (MS), suplementowanej 20,19 μ M 4-PPU i 1,96 μ M 2,4,5-T, przez 28 dni.

W opisywanym projekcie, ze względu na nadrzędny cel pracy, koncentrowano się raczej na wykorzystaniu zmiennych warunków oświetleniowych w modelowaniu pierwotnego oraz wtórnego metabolizmu kalusów *C. subternata*, niż na wyjaśnianiu obserwowanych zjawisk na poziomie molekularnym. W tym miejscu należy zaznaczyć, że kalus *C. subternata* rosnący w warunkach całkowitej ciemności (Fot. 8), charakteryzował się nieznacznie słabszym wzrostem w porównaniu do hodowli naświetlanych, co stanowi potwierdzenie obserwacji poczynionych w trakcie prac nad kulturami *in vitro* roślin z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz i Głód, 2003).

Analiza fitochemiczna uzyskanych biomas *C. subternata*, pod względem zawartości związków polifenolowych wykazała, że zachowują one, podobnie jak kalus rosnący w warunkach standardowych (rozdz. II.1.1.4.), zdolność do akumulacji izoflawonów oraz flawanonów, niezależnie od spektrum padającego światła. Biomasy kultywowane w warunkach poszczególnych reżimów oświetleniowych nie różniły się jakościowo pod względem zawartości polifenoli, charakteryzując się całkowitym brakiem obecności ksantonów i benzofenonów, właściwych dla roślin macierzystych (rozdz. II.1.1.4.). Dodatkowo, kalusy *C. subternata* cechowała obecność trzech glukozydów izoflawonowych (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nieobecnych w materiale gruntowym. Dominującym składnikiem badanego zespołu była, w biomacie referencyjnej (kultura kalusowa rosnąca przy dostępie światła dziennego), hesperydyna, występująca w ilości ok. 50 i 80 mg/100 g DW (odpowiednio w 14 i 28 dniu cyklu) (Ryc. 5D). Spośród połączeń izoflawonowych, największą zawartość, sięgającą ok. 25 i 30 mg/100 g DW (14 i 28 dzień cyklu), odnotowano w przypadku 7-*O*- β -glukozydu kalikozyny, najmniejszą zaś (ok. 7,5 i 8,0 mg/100 g DW w 14 i 28 dniu) w przypadku 7-*O*- β -glukozydu formononetyny (Ryc. 5A, C).

Stwierdzono wyraźną zależność pomiędzy czasem trwania eksperymentu, przekładającym się na odpowiednią fazę w cyklu wzrostowym kalusa, a zawartością metabolitów wtórnych w badanych biomasach. Wspomniane prawidłowości obserwowano niezależnie od warunków oświetleniowych, związane były one natomiast z budową chemiczną analizowanych połączeń. W przypadku hesperydyny, wyższe stężenia metabolitu odnotowano w kulturach prowadzonych przez 28 dni, a dla izoflawonów – w kalusie 14-dniowym (Ryc. 5). Wskazuje to jednoznacznie, że akumulacja związków izoflawonoidowych w kulturach parenchymatycznych *C. subternata* przypada na fazę intensywnego wzrostu biomasy, spada natomiast po osiągnięciu przez nią fazy stacjonarnej. Wyjątek stanowił kalus rosnący bez dostępu światła, w którym zawartość izoflawonów była wyższa po 28 dniach doświadczenia (Ryc. 5). Mogłoby to sugerować, że światło ogólnie stymuluje biosyntezę niniejszych związków, przyspieszając osiągnięcie ich maksymalnego stężenia, co jest interesujące ze względu na aspekt ekonomiczny.



Ryc. 5. Wpływ warunków oświetleniowych na zawartość 7-O-β-glukozylu kalikozylny (A), 7-O-β-glukozylu pseudobaptigeniny (B), 7-O-β-glukozylu formononetyny (C) oraz hesperydyny (D), w kalusie *Cyclopia subternata* (mg/100 g DW).

Kultury prowadzono w warunkach ciągłego oświetlenia bądź całkowitej ciemności przez cały cykl hodowli.

Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Zastosowane skróty: C, filtr czerwony; N, filtr niebieski; Z, filtr żółty; SB, światło białe (dziennie); CM, ciemność; 14d, biomasa zebrana w dniu 14; 28d, biomasa zebrana w dniu 28.

Poza opisanymi powyżej zależnościami stwierdzono, że rodzaj oświetlenia wpływa w istotny sposób na stężenia poszczególnych metabolitów. Najwyższą zawartością hesperydyny (118,0 mg/100 g DW, dzień 28) i izoflawonów (28,74, 19,26 i 10,32 mg/100 g DW odpowiednio dla 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, dzień 14) charakteryzowały się kultury prowadzone przy dostępie światła niebieskiego, a także kalus rosnący w warunkach światła dziennego (85,13 mg/100 g DW hesperydyny w dniu 28; odpowiednio 26,25, 14,71 i 8,07 mg/100g DW 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny w dniu 14, Ryc. 5). Filtry czerwony i żółty, jak również brak światła, wpływały ogólnie negatywnie na akumulację związków polifenolowych. Wyjątkiem jest 7-*O*- β -glukozyd formononetyny, którego maksymalne stężenie (11,15 mg/100g DW w dniu 14) odnotowano właśnie przy użyciu filtra czerwonego (Ryc. 5C).

Opisane eksperymenty wskazują na ogólnie korzystny wpływ obecności światła na akumulację bioflawonoidów w kulturach kalusowych *C. subternata*. Potwierdza to wyniki wcześniejszych doświadczeń, przeprowadzonych m.in. z wykorzystaniem kultur parenchymatycznych *Perilla frutescens*, produkujących antocyjany (Zhong i wsp., 1994) oraz kalusów *Genista tinctoria*, wykazujących zdolność do akumulacji izoflawonów (Łuczkiwicz i Głód, 2003). Także rezultaty eksperymentów z użyciem filtrów barwnych są w dużym stopniu zgodne z wynikami badań opisanych w literaturze. Korzystny wpływ światła niebieskiego na akumulację flawonoidów, przy jednocześnie hamującym wpływie światła czerwonego, stwierdzono m.in. w przypadku kultur kalusowych *Saussurea medusa* (Zhao i wsp., 2001; Guo i wsp., 2007). Podobną zależność zaobserwowano w czasie badań nad kulturami *Cistanche deserticola*, produkującymi glikozydy fenolowe (Ouyang i wsp., 2003) oraz pędami *in vitro* *Ruta graveolens*, wykazującymi zdolność do akumulacji zespołu kwasów fenolowych, w tym kwasu protokatechowego, syringowego i wanilinowego (Szopa i wsp., 2012).

Podsumowując, opisane w niniejszej pracy eksperymenty wskazały na możliwość modyfikowania akumulacji bioflawonoidów w kalusach *C. subternata* poprzez zastosowanie zmiennych warunków oświetleniowych. Wykazano, że obecność światła ogólnie stymuluje powstawanie wspomnianych połączeń, nie jest jednak konieczna do zainicjowania ich biosyntezy. Interesująca okazała się również rola filtrów barwnych w produkcji omawianych związków. Wysoką zawartość bioflawonoidów (odpowiednio 118,00, 28,74, 19,26 i 10,32 mg/100 g DW dla hesperydyny oraz 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny) stwierdzono zwłaszcza w kalusie rosnącym przy dostępie światła niebieskiego. W porównaniu z biomasa referencyjną (światło dzienne), stężenia produkowanych związków wzrosły odpowiednio o 38,6 % (hesperydyna, dzień 28), 9,5 % (7-*O*- β -glukozyd kalikozyny), 30,8 % (7-*O*- β -glukozyd pseudobaptygeniny) i 27,9 % (7-*O*- β -glukozyd formononetyny). Niestety, jak już wspomniano, większe ilości izoflawonów akumulowane były, niezależnie od badanego związku, w 14 dniu eksperymentu, podczas gdy w przypadku hesperydyny był to dzień 28. W efekcie, w testowanych warunkach, nie można było otrzymać biomasy akumulującej izoflawony i flawanony (tj. hesperydynę) w maksymalnym stężeniu, w tym samym czasie, co wiąże się z poważnymi problemami technologicznymi w trakcie ewentualnego otrzymania

niniejszych metabolitów na skalę wielkolaboratoryjną lub przemysłową. W tym miejscu należy również zaznaczyć, że kalus kultywowany przy dostępie światła niebieskiego charakteryzował się gorszym przyrostem niż tkanka referencyjna, co przekładało się *de facto* na jego gorszą produktywność.

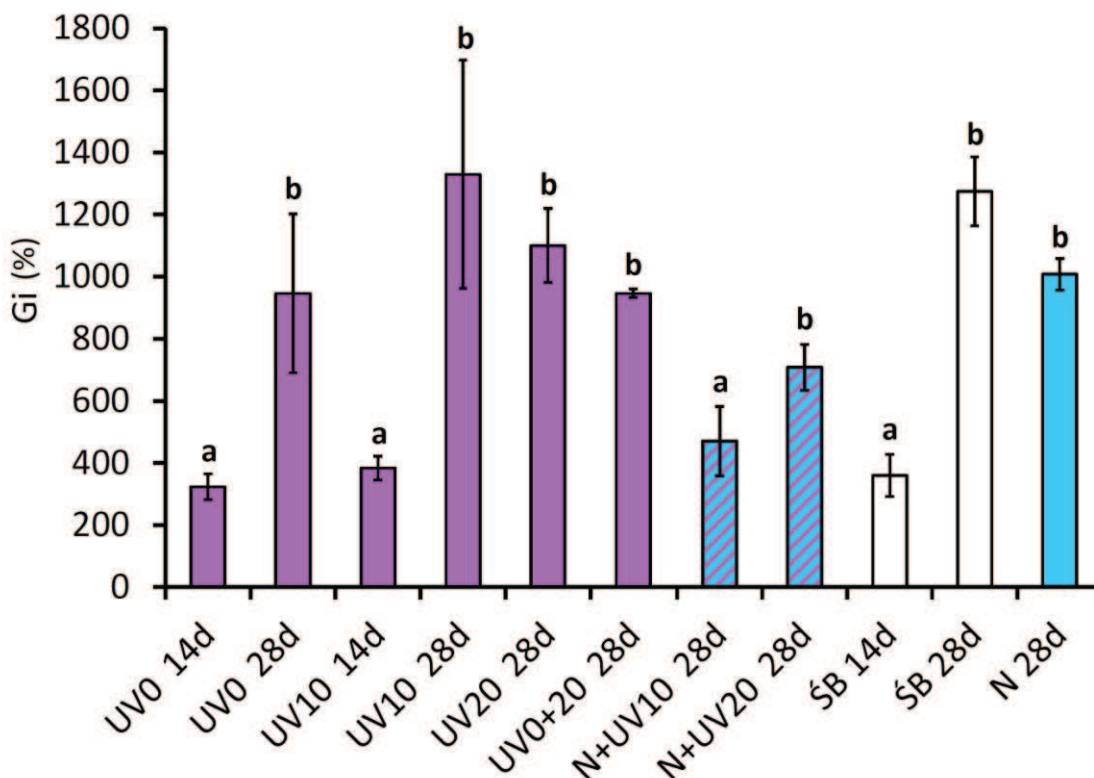
W efekcie, pomimo interesujących wyników, na obecnym etapie badań nie można było zaproponować modelu doświadczalnego o znaczeniu praktycznym. Uzyskane wyniki mają zaś jedynie znaczenie poznawcze, z możliwością wykorzystania w badaniach podstawowych dotyczących fizjologii roślin.

II.1.2.1.2. Wpływ promieniowania ultrafioletowego na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych *Cyclopia subternata*

W celu określenia wpływu promieniowania ultrafioletowego na parametry wzrostowe badanych biomas oraz produkcję związków polifenolowych, kalus *C. subternata*, rosnący przy dostępie światła dziennego (tkanka referencyjna), poddawano okresowemu działaniu promieni UVC, w wybranych dniach eksperymentu, usuwając uprzednio polipropylenowe pokrywki naczyń hodowlanych (szczegółowy opis przeprowadzenia eksperymentu – rozdz. III.1.6.1.). Podobnie jak w przypadku doświadczenia z użyciem filtrów barwnych (rozdz. II.1.2.1.1.), biomasy zbierano w 14 i 28 dniu eksperymentu, wyznaczano wartości współczynnika przyrostu G_i , liofilizowano, a następnie poddawano analizie fitochemicznej pod względem zawartości polifenoli. Z uwagi na zamiar precyzyjnego określenia wpływu promieniowania UVC na pierwotny oraz wtórny metabolizm tkankowy, procedury eksperymentalne obejmowały naświetlanie kalusów w różnych fazach wzrostu (pojedyncze naświetlania w dniu 0, 10 lub 20 oraz podwójne naświetlanie – w dniach 0 i 20). Kierując się danymi literaturowymi (Liu i wsp., 2010; Almagro i wsp., 2011), jak również dużą wrażliwością badanych biomas na czynniki stresowe, zaobserwowaną na etapie inicjacji kultur *in vitro*, czas jednorazowej aplikacji promieniowania ultrafioletowego wyznaczono na 5 minut. Ze względu na stwierdzony wcześniej, korzystny wpływ światła niebieskiego na zawartość hesperydyny pod koniec cyklu wzrostowego opisanych biomas (rozdz. II.1.2.1.1. – Ryc. 5D), w doświadczeniu postanowiono uwzględnić również modyfikację oświetlenia za pomocą filtra niebieskiego, połączoną z okresowym naświetlaniem kalusów promieniami UVC. Zestawienie zastosowanych schematów eksperymentalnych zawarto w rozdz. III.1.6.1. (Tab. 21), jak również na Ryc. 6 i 7.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pokazują, że promieniowanie UVC wywiera ogólnie niekorzystny wpływ na wzrost analizowanych biomas, o czym świadczą obniżone, w stosunku do kultury referencyjnej (światło białe bez naświetlania UV), wartości współczynników przyrostu G_i niniejszych tkanek (Ryc. 6). Potwierdza to rezultaty eksperymentów opisanych w literaturze dla kultur parenchymatycznych, w których wykazano m.in. negatywną rolę promieniowania ultrafioletowego w procesie

wzrostu kalusów *Camellia sinensis* (Zagoskina i wsp., 2003) oraz *Ginkgo biloba* (Hao i wsp., 2009).



Ryc. 6. Wpływ promieniowania UVC na wzrost kalusa *Cyclopia subternata*, wyrażony jako wartość współczynnika przyrostu biomasy (Gi).

Kultury prowadzono w warunkach ciągłego oświetlenia światłem białym lub modyfikowanym przy użyciu filtra niebieskiego; czas jednorazowego naświetlania promieniami ultrafioletowymi wynosił 5 minut.

Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Zastosowane skróty: **UV0**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniu 0; **UV10**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniu 10; **UV20**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniu 20; **UV0+20**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniach 0 i 20; **N**, filtr niebieski; **ŚB**, światło białe (dzienne); **14d**, biomasa zebrana w dniu 14; **28d**, biomasa zebrana w dniu 28.

W prezentowanym eksperymencie, hamowanie wzrostu tkanek było wyraźnie zależne od dnia, w którym naświetlano biomasy (odpowiednia faza wzrostowa kalusów) (Ryc. 6), i tak, najbardziej niekorzystny wpływ promieniowania UVC odnotowano w przypadku irradacji biomas w dniu inokulacji ($Gi \approx 950\%$; dzień 28). Zjawisko to jest najprawdopodobniej związane ze zwiększoną wrażliwością kalusów *C. subternata* znajdujących się, bezpośrednio po naświetleniu, w fazie adaptacyjnej. Należy jednak zaznaczyć, że efekt słabszego przyrostu uwidaczniał się dopiero w późniejszym okresie eksperymentu, o czym świadczy wartość Gi kalusów w dniu 14 ($Gi \approx 320\%$), zbliżona do kultury referencyjnej ($Gi \approx 360\%$ – Ryc. 6). Negatywne efekty wywołane promieniowaniem UVC były zdecydowanie słabsze w kulturach poddanych jego działaniu w późniejszych dniach cyklu wzrostowego, przy czym mniej istotną rolę odgrywał wówczas dzień naświetlania (wartości Gi kalusów dla irradacji w dniu 10 i 20 wynosiły odpowiednio ok. 1300 i 1100%; dzień 28 – Ryc. 6). Także powtórne naświetlanie biomasy w dniu 20 nie spowodowało znaczącego statystycznie osłabienia

jej przyrostu, w porównaniu z kulturą poddaną działaniu promieniowania UVC jedynie w dniu inokulacji (wartości G_i wynosiły, w dniu 28, ok. 950 i 1050 % odpowiednio dla tkanek naświetlanych tylko w dniu 0, i irradycji podwójnej, w dniach 0 i 20 – Ryc. 6).

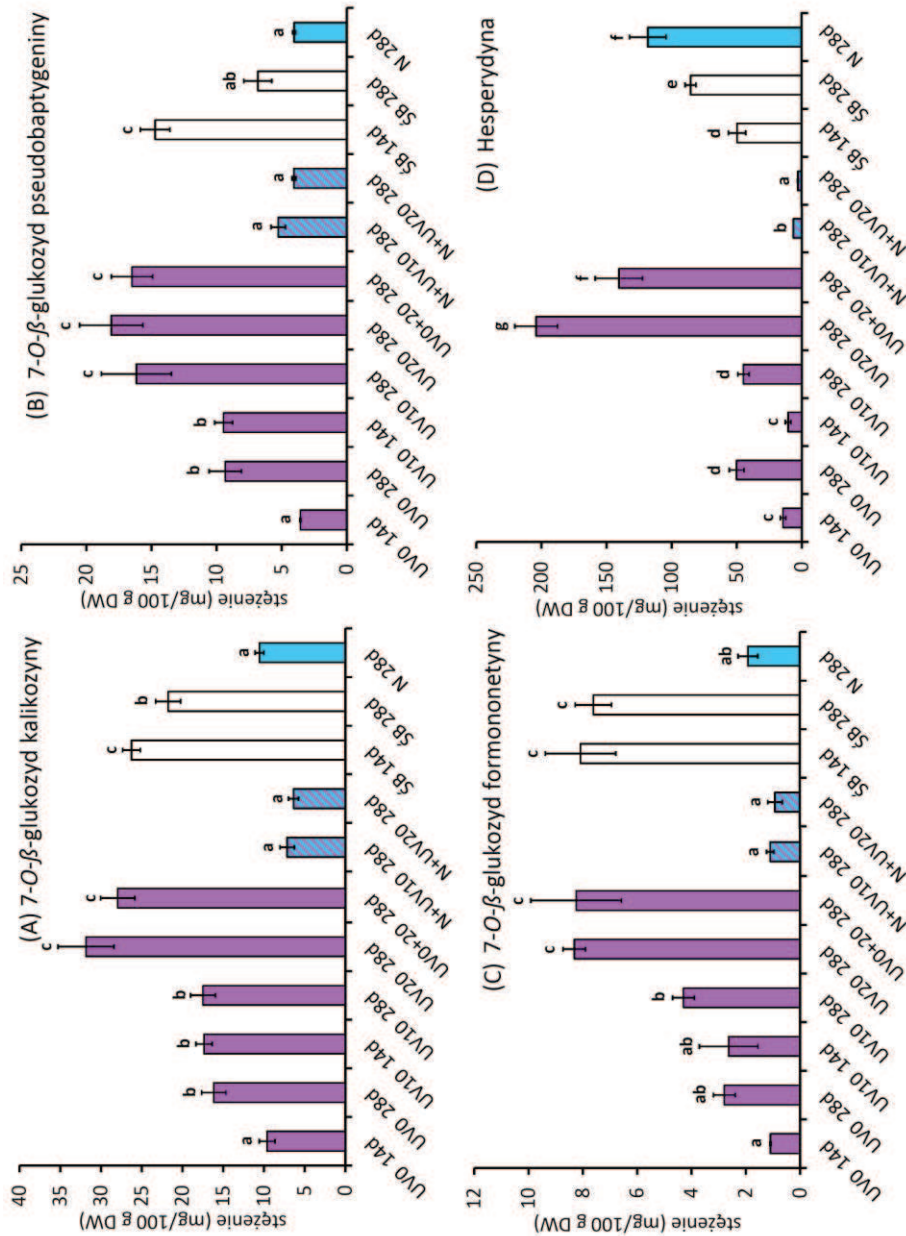
Prowadzenie kultury z zastosowaniem filtra niebieskiego, przy jednoczesnym naświetlaniu kalusów promieniowaniem UVC, wywarło zdecydowanie najbardziej niekorzystny wpływ na przyrost biomasy *C. subternata*. Wartość współczynnika przyrostu, uzyskana dla tkanki przyrannej naświetlanej w dniu 10 i rosnącej przez 28 dni ($G_i \approx 710$ %), była wyraźnie niższa w porównaniu z biomasą poddaną irradycji UVC dnia 10-tego, w warunkach światła dziennego (Ryc. 6). Uzyskane rezultaty wydają się więc wskazywać na synergistyczny, niekorzystny wpływ wymienionych powyżej czynników środowiskowych, na wzrost badanej biomasy.

Niezależnie od stosowanej modyfikacji oświetlenia oraz reżimu naświetlania tkanek promieniami UVC, nie stwierdzono wyraźnych różnic morfologicznych między kalusami uzyskanymi w danej serii doświadczeń, a biomasą referencyjną, opisaną uprzednio w rozdz. II.1.1. Pomimo istotnego, hamującego wpływu promieniowania ultrafioletowego na wzrost kultur, nie indukowało ono wyraźnych zmian nekrotycznych w badanej tkance przyrannej (brązowienie, szklenie, wysychanie). Wszystkie spośród uzyskanych kalusów miały charakter luźnych, parenchymatycznych biomas, nie wykazujących tendencji do organogenezy.

Najlepszy efekt, z uwagi na przyrost kultury, uzyskano w przypadku kalusa *C. subternata* rosnącego w warunkach ciągłego oświetlenia dziennego i naświetlanego promieniowaniem UVC w dniu 10, przez 5 minut. Opisywana biomasa charakteryzowała się wysoką wartością współczynnika przyrostu ($G_i = 1329,18$ %; dzień 28), zbliżoną do kultury referencyjnej ($G_i = 1273,75$ %; dzień 28). Cechowała ją jednakże mniejsza stabilność pod względem dynamiki wzrostu (większa wartość odchylenia standardowego od średniej – Ryc. 6).

Wyniki analiz fitochemicznych wykazały, że naświetlanie kalusów *C. subternata* promieniowaniem ultrafioletowym stymuluje bądź hamuje biosyntezę wszystkich analizowanych związków polifenolowych, niezależnie od ich budowy chemicznej (jednakowo dla izoflawonów oraz flawanonu – hesperydyny). Uzyskane efekty, w zakresie produkcji poszczególnych polifenoli, były natomiast w znacznej mierze uzależnione od fazy wzrostu biomasy poddanej irradycji oraz od modelu naświetlań (irradycja tylko w 0, 10 lub 20 dniu eksperymentu bądź dwukrotne, 5 min. naświetlanie w dniach 0 i 20).

Stwierdzono, że w stosunku do kultury referencyjnej, irradycja kalusów w dniu inokulacji powoduje obniżenie zawartości hesperydyny, a także izoflawonów w kulturach prowadzonych zarówno przez 14, jak i 28 dni. Wyjątek stanowi 7-O- β -glukozyd pseudobaptygeniny, którego stężenie, w porównaniu z próbą kontrolną w 28 dniu eksperymentu, nieznacznie wzrosło (ok. 36 % – Ryc. 7B). W opisywanym modelu doświadczalnym na uwagę zasługuje ponadto fakt, że zawartość poszczególnych związków w biomasach rosnących przez 28 dni była wyższa w stosunku do kalusów 14-dniowych. Dowodzi to pośrednio, że zahamowanie biosyntezy związków polifenolowych w kulturach *in vitro* miodokrzewów, pod wpływem promieni UVC, jest odwracalne i słabnie wraz z upływem czasu.



Ryc. 7. Wpływ promieniowania UVC na zawartość 7-O-β-glukozylu kalikozyny (A), 7-O-β-glukozylu pseudobaptageniny (B), 7-O-β-glukozylu formononetyny (C) oraz hesperydyny (D) w kalusie *Cyclopia subternata* (mg/100 g DW).

Kultury prowadzono w warunkach ciągłego oświetlenia światłem białym lub modyfikowanym przy użyciu filtra niebieskiego; czas jednorazowego naświetlania promieniami ultrafioletowymi wynosił 5 minut.

Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Zastosowane skróty: **UV0**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniu 0; **UV10**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniu 10; **UV20**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniu 20; **UV0+20**, biomasa naświetlana promieniami UVC w dniach 0 i 20; **N**, filtr niebieski; **SB**, światło białe (dziennie); **14d**, biomasa zebrana w dniu 14; **28d**, biomasa zebrana w dniu 28.

Uzyskane efekty, w postaci określonej zawartości poszczególnych izoflawonów, są odmienne od rezultatów doświadczeń obejmujących prowadzenie kultur w warunkach ciągłego oświetlenia (światło dzienne lub modyfikowane za pomocą filtrów barwnych), w przypadku których wyższe stężenia wspomnianych połączeń odnotowano w dniu 14 eksperymentu (Ryc. 5 i 7). Biorąc pod uwagę powyższe dane, a także wyniki pomiarów przyrostu kalusa (Ryc. 6), można przypuszczać, że niekorzystny wpływ promieniowania UVC, aplikowanego w dniu 0, na metabolizm pierwotny (obniżona, w stosunku do kultury referencyjnej, wartość G_i w dniu 28), przekłada się na spadek produkcji metabolitów wtórnych w kalusie *C. subternata*. Należy jednak zaznaczyć, że o ile osłabienie przyrostu biomasy zauważalne było dopiero w dniu 28, to obniżenie zawartości polifenoli odnotowano już 14 dnia eksperymentu (Ryc. 6 i 7). Ostatecznie, poziomy akumulacji analizowanych połączeń w kalusie naświetlanym promieniami UVC w 0 dniu, nie przewyższyły ani nawet nie osiągnęły stężeń metabolitów odnotowanych w przypadku kultury odniesienia. Z tego względu można wnioskować, że stosowany model naświetlania, mieszczący się w kategorii elicytacji, nie może być stosowany w procedurach biotechnologicznego pozyskiwania bioflawonoidów z kalusów *C. subternata*.

Znacznie lepsze efekty, w zakresie akumulacji związków polifenolowych, uzyskano w wyniku aplikacji promieniowania ultrafioletowego w 10 lub 20 dniu eksperymentu. W przypadku kultur poddanych irradacji w dniu 10 eksperymentu i prowadzonych przez 14 lub 28 dni, obserwowano w dalszym ciągu niekorzystny wpływ promieni UVC na wtórny metabolizm, był on jednak słabiej zaznaczony niż w biomasach naświetlanych na początku cyklu wzrostowego. Wyjątkiem od opisanej wyżej prawidłowości, podobnie jak w przypadku naświetleń tkanki w dniu inokulacji, była biosynteza 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptygeniny, którego zawartość w dniu 28 wzrosła ponad 2-krotnie w porównaniu z kulturą odniesienia (Ryc. 7B).

W przeciwieństwie do rezultatów opisanych wyżej eksperymentów, obejmujących naświetlanie biomas w 0 lub 10 dniu, irradycja kalusa promieniami UVC w dniu 20 wyraźnie stymulowała akumulację wszystkich analizowanych połączeń polifenolowych, pod koniec cyklu wzrostowego. Stopień nasilenia powyższego zjawiska był różny dla poszczególnych metabolitów, nie zależał jednakże od typu połączenia (izoflawon lub flawanon). Największy wzrost zawartości związku polifenolowego (w stosunku do kultury referencyjnej) odnotowano w przypadku 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptygeniny (165 % wzrost, 18,09 mg/100 g DW – Ryc. 7B) oraz hesperydyny (140 % wzrost, 204,14 mg/100 g DW – Ryc. 7D). Słabsze wyniki uzyskano natomiast dla pozostałych dwóch pochodnych izoflawonoidowych: 7-*O*- β -glukozydu kalikozyiny (46% wzrost, 31,84 mg/100 g DW – Ryc. 7A) oraz 7-*O*- β -glukozydu formononetyny (9,5% wzrost, 8,32 mg/100 g DW – Ryc. 7C). W tym miejscu należy zaznaczyć, że otrzymana w opisywanym przypadku zawartość hesperydyny, stanowi jednocześnie najwyższe stężenie wtórnego metabolitu uzyskane w kalusach *C. subternata*, w prezentowanej serii eksperymentów, obejmujących modyfikacje warunków oświetleniowych. Jak już wspomniano, w przeciwieństwie do naświetlania kalusa w dniu 0, irradycja tkanki przyrannej w dniu 20 hamowała wzrost biomasy jedynie w umiarkowanym stopniu. Wiąże się to prawdopodobnie z uniknięciem negatywnego wpływu promieniowania

ultrafioletowego na pierwotny metabolizm tkankowy (przyrost), którego intensywny przebieg ma miejsce właśnie w trzech pierwszych tygodniach eksperymentu. Tym samym, poddając kalusy *C. subternata* irradacji promieniami UVC w 20 dniu hodowli, możliwe było osiągnięcie wybiórczego i korzystnego wpływu naświetlania na wtórny metabolizm badanych biomas. Wyniki powyższych doświadczeń potwierdza dodatkowy eksperyment, obejmujący podwójne naświetlanie kalusa w dniach 0 oraz 20. W niniejszym przypadku, irradycja biomasy na początku doświadczenia spowodowała pewne obniżenie zawartości analizowanych połączeń (w stosunku do kultury naświetlanej jedynie w dniu 20), najprawdopodobniej na skutek pierwotnego zahamowania wzrostu kalusa (Ryc. 6 i 7). W dalszym ciągu możliwe było jednak podwyższenie poziomu akumulacji związków flawonoidowych na drodze powtórnego naświetlania hodowli w dniu 20.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że stymulacja produkcji związków polifenolowych w kalusach *C. subternata*, poprzez irradycję w 20 dniu eksperymentu, miała miejsce jedynie w przypadku biomasy rosnącej w warunkach oświetlenia dziennego. Naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym (zarówno w dniu 10 jak i 20) kultur prowadzonych przy świetle niebieskim wpłynęło negatywnie na poziom akumulacji wspomnianych metabolitów. Zaskakujące jest zwłaszcza znaczne obniżenie zawartości hesperydyny w warunkach prowadzenia kultury przy dostępie światła niebieskiego, dodatkowo naświetlanej promieniami ultrafioletowymi w dniu 20. Analogiczny eksperyment, przeprowadzony bez irradycji, skutkowało bowiem znacznym podwyższeniem stężenia powyższego metabolitu (Ryc. 7). Wyjaśnienie mechanizmu niniejszego zjawiska wymagałoby przeprowadzenia dalszych badań, obejmujących m.in. określenie aktywności enzymów szlaku fenylopropanoidowego w opisywanych warunkach. Doświadczeń tego typu nie przewidziano jednak w danym projekcie.

Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że promieniowanie ultrafioletowe wywiera negatywny wpływ na metabolizm pierwotny kalusów *C. subternata*, przy czym irradycja UVC hamuje raczej przyrost tkanek parenchymatycznych, nie powodując ich bezpośredniego zamierania. W przypadku wtórnego metabolizmu, zastosowane warunki stymulowały bądź hamowały biosyntezę wszystkich badanych połączeń polifenolowych, w zależności od schematu irradycji. Za niniejszym zjawiskiem może kryć się skomplikowany mechanizm odpowiedzi obronnej, w której warunki stresowe, reprezentowane przez promieniowanie UV, powodują biosyntezę fitoaleksyn, do których zaliczamy przede wszystkim polifenole z grupy izoflawonów, jedynie w ściśle określonym reżimie czasowym, wyznaczonym przez fazy wzrostu biomas (Dixon, 1999; Łuczkiwicz, 2008).

Uzyskane wyniki sugerują, że możliwe jest praktyczne zastosowanie promieniowania UVC do zwiększenia poziomu akumulacji polifenoli w kalusach *C. subternata*. Naświetlanie tkanek dopiero po ukończeniu ich intensywnego wzrostu umożliwia osiągnięcie zamierzonego kompromisu, skutkującego wzrostem zawartości wszystkich analizowanych połączeń, przy jednoczesnym uzyskaniu znacznej ilości biomasy parenchymatycznej.

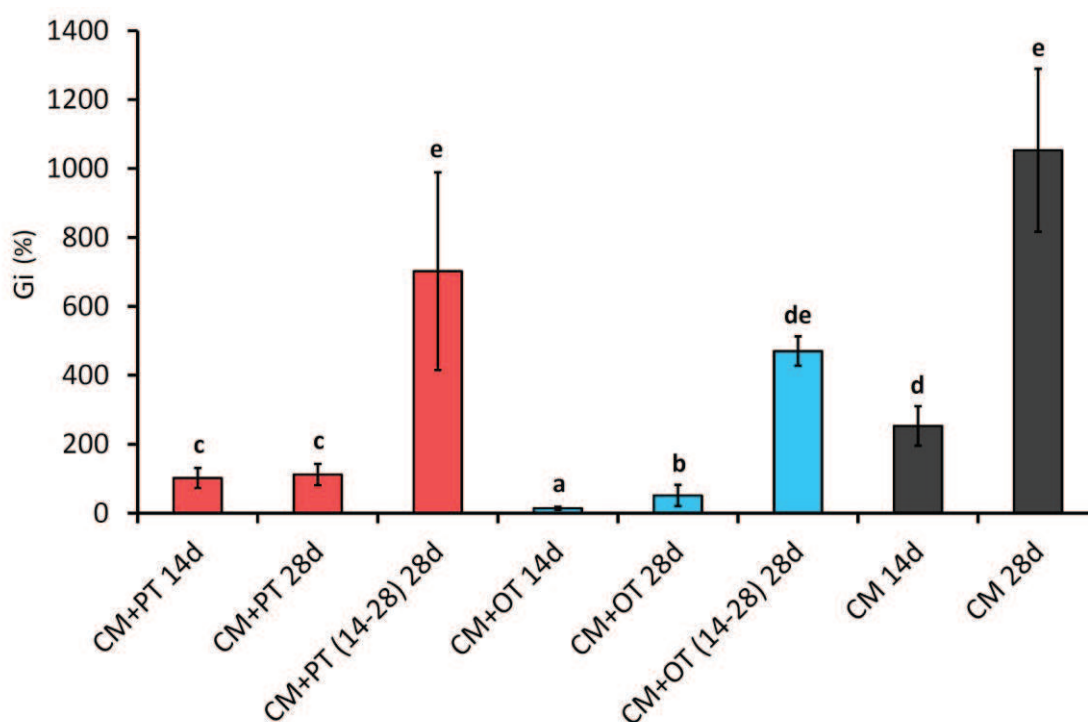
Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają rezultaty wcześniejszych doświadczeń, wskazujących na możliwość zwiększenia zawartości związków polifenolowych na drodze naświetlania tkanek promieniowaniem ultrafioletowym (Łuczkiwicz, 2008; Ramakrishna i Ravishankar, 2011). Powyższe zjawisko, jak już wspomniano, związane jest najczęściej z udziałem związków o budowie flawonoidowej (Treutter, 2006), w tym przede wszystkim izoflawonów (Dixon, 1999), w reakcjach obronnych roślin na czynniki stresowe. Stymulujący efekt promieni UVB na akumulację izoflawonów stwierdzono między innymi w przypadku takich gatunków jak: *Astragalus membranaceus* (kalikozyna i jej 7-O- β -glukozyd) (Xu i wsp., 2011) i *Phaseolus vulgaris* (związki izoflawonoidowe o wysokim stopniu uhydroksylowania) (Łuczkiwicz, 2008). Zwiększenie zawartości metabolitów pod wpływem promieniowania UVB obserwowano również w przypadku bioflawonoidów innych niż izoflawony. Wykazano, że wspomniany czynnik stresowy stymuluje biosyntezę flawonoli w kulturach kalusowych *Ginkgo biloba* (Hao i wsp., 2009) oraz C-glukozydowanych flawonów (orientyna, izoorientyna, witeksyna, izowiteksyna) w kalusie *Passiflora quadrangularis* (Antognoni i wsp., 2007). Podwyższenie akumulacji metabolitów wtórnych w wyniku aplikacji promieniowania UVC odnotowano natomiast w kulturach *in vitro* *Arachis hypogaea* oraz *Vitis* sp. produkujących stilbenoidy, w tym resweratrol (Fritzemeier i wsp., 1983; Liu i wsp., 2010; Almagro i wsp., 2011). W tym miejscu należy zaznaczyć, że w przypadku badań wpływu światła i promieniowania ultrafioletowego na biosyntezę metabolitów wtórnych trudno jest porównać wyniki poszczególnych eksperymentatorów. Spowodowane jest to dużą ilością zmiennych, wpływających na akumulację poszczególnych metabolitów. Spośród nich wymienić należy m.in. rodzaj kultury, reżim oświetleniowy (fotoperiod), czas i okres irradacji oraz spektrum stosowanego promieniowania. Istotne są ponadto cechy fizjologiczne badanego gatunku roślinnego oraz rodzaj produkowanych związków (Hollósy, 2002). Wartościowych informacji mogą dostarczyć w tym przypadku badania aktywności odpowiednich enzymów, pozwalające na wyjaśnienie mechanizmów obserwowanych zjawisk.

II.1.2.1.3. Wpływ temperatury na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach kalusowych *Cyclopia subternata*

Oprócz określenia wpływu promieniowania w zakresie UV-VIS na wzrost biomas i zawartość bioflawonoidów w kalusie *C. subternata*, zaplanowano również przetestować w tym względzie rolę stresu temperaturowego, jako uznanego czynnika środowiskowego indukującego biosyntezę i akumulację szeregu wtórnych metabolitów w kulturach *in vitro* (Łuczkiwicz, 2008; Ramakrishna i Ravishankar, 2011). Przeprowadzone doświadczenia obejmowały namnażanie biomas w podwyższonej (29 °C) bądź obniżonej (13 °C) temperaturze. Kulturę odniesienia stanowił w tym wypadku kalus omawianego gatunku rosnący w temp. 24°C (standardowa temp. dla wszystkich eksperymentów *in vitro* opisywanych w niniejszej pracy – rozdz. III.1.2.), w warunkach całkowitej ciemności. Zrezygnowanie z biomasy kultywowanej jako tkankę

referencyjną przy świetle dziennym związane było z ograniczonymi możliwościami sprzętu laboratoryjnego, którym dysponuje Katedra i Zakład Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Inkubator zapewniający regulację temperatury w przedziale od 3 do 40 °C posiadał jedynie opcję hodowli tkanek w warunkach całkowitej ciemności. Aby ocenić precyzyjnie wpływ reżimu temperaturowego na pierwotny oraz wtórny metabolizm tkankowy, kalusy *C. subternata* poddawano szokowi termicznemu w całym cyklu wzrostowym lub jedynie w drugiej fazie eksperymentu (dni: 14 do 28). Podobnie jak w przypadku pozostałych doświadczeń związanych ze zmianą warunków hodowlanych, badane biomasy zbierano po 14 lub 28 dniach kultury.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że zarówno obniżenie jak i podwyższenie temperatury w środowisku hodowlanym, wywiera jednoznacznie niekorzystny wpływ na wzrost analizowanych biomas. Silne zahamowanie przyrostu zaobserwowano już na początku cyklu wzrostowego kalusów, o czym świadczą niskie wartości Gi biomas, wyznaczone w 14 dniu eksperymentu (14,08 i 101,89 % odpowiednio dla kalusa rosnącego w obniżonej i podwyższonej temp. – Ryc. 8). W przypadku kultur prowadzonych przez okres 28 dni, wartości współczynnika przyrostu nie uległy zmianie (podwyższona temp.), bądź tylko nieznacznie wzrosły (obniżona temp.) w stosunku do kalusa 14-dniowego. Świadczy to o wyraźnej inhibicji wzrostu tkanki przyrannej na skutek zaistniałego ciągłego szoku temperaturowego (Ryc. 8).



Ryc. 8. Wpływ temperatury na wzrost kalusa *Cyclopia subternata*, wyrażony jako wartość współczynnika przyrostu (Gi).

Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

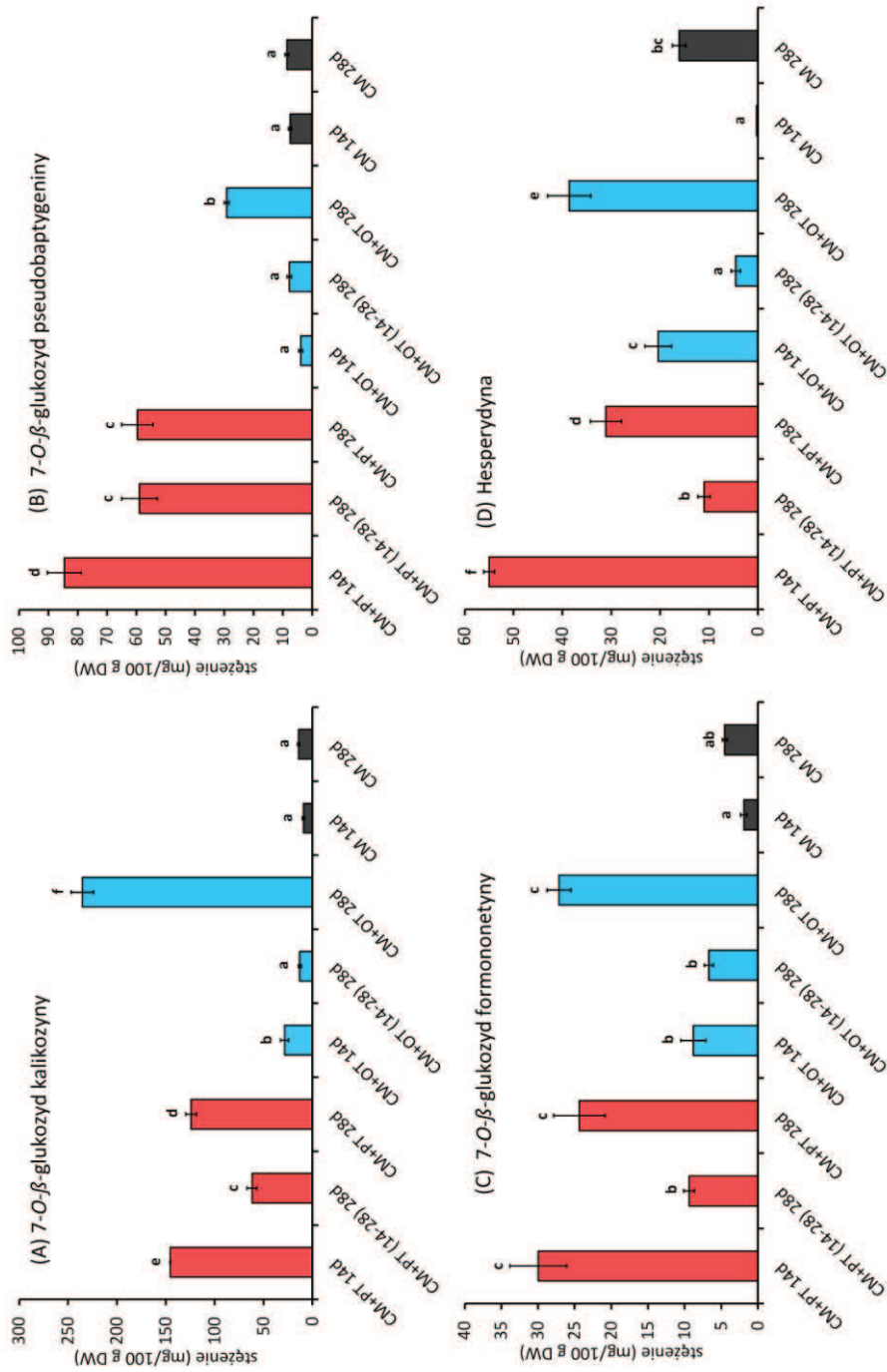
Zastosowane skróty: **CM**, kultura prowadzona w całkowitej ciemności; **PT**, kultura prowadzona w podwyższonej temp. (29 °C); **OT**, kultura prowadzona w obniżonej temp. (13 °C); **14-28**, kultura prowadzona w podwyższonej/obniżonej temp. tylko w okresie od 14 do 28 dnia doświadczenia; **14d**, biomasa zebrana w dniu 14; **28d**, biomasa zebrana w dniu 28.

Znacznie lepsze rezultaty, pod względem przyrostu biomas, udało się uzyskać dla kultur prowadzonych w warunkach temperaturowych zmodyfikowanych jedynie w drugiej fazie eksperymentu, tj. od 14 do 28 dnia cyklu wzrostowego. Obliczone dla kalusów wartości G_i były w omawianym przypadku wyższe od kultur rosnących w obniżonej lub podwyższonej temperaturze w całym cyklu wzrostowym. Ciągłe jednak obserwowano słabsze przyrosty biomas w porównaniu z kulturami referencyjnymi (Ryc. 8). Pomimo zbliżonych, niskich wartości parametru G_i ($\leq 100\%$), kalusy *C. subternata* rosnące w warunkach obniżonej bądź podwyższonej temperatury wykazywały wyraźne różnice w morfologii. Wygląd kultur prowadzonych w temp. 13 °C (wszystkie warianty eksperymentalne – Ryc. 8) był identyczny (jasnożółta barwa i puszysta konsystencja) z kalusem referencyjnym, bez widocznych zmian nekrotycznych, co wskazuje na inhibicję wzrostu spowodowaną jedynie poprzez spowolnienie metabolizmu. Biomasa rosnąca w temp. 29 °C wykazywała z kolei wyraźnie zaznaczone objawy nekrozy (brunatnienie) w przypadku wszystkich wersji doświadczalnych, co może świadczyć o zahamowaniu przyrostu kalusów na skutek biosyntezy prostych, toksycznych związków fenolowych oraz produktów ich utlenienia. Podobne zjawisko, manifestujące się zamieraniem eksplantatów, opisywano także podczas inicjacji kultur *in vitro* *Cyclopia* sp. (rozdz. II.1.1.).

Analizy fitochemiczne uzyskanych biomas wykazały, że poddanie kalusa *C. subternata* szokowi termicznemu powoduje wyraźne zmiany w obrębie biosyntezywanego zespołu związków polifenolowych. Obserwowane różnice miały przy tym charakter wyłącznie ilościowy, nie stwierdzono bowiem obecności w danej kulturze połączeń nowych, nie zidentyfikowanych w tkankach miodokrzewu w czasie wcześniejszych badań biotechnologicznych (rozdz. II.1.1.4., II.1.2.1.1. oraz 1.2.1.2.).

Wykazano, że podwyższenie temperatury hodowli do 29 °C, począwszy od dnia inokulacji, stymuluje istotnie produkcję wszystkich obecnych w kalusach połączeń polifenolowych. Najwyższe stężenia hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny, wynoszące odpowiednio 236-, 16-, 11- i 15-razy więcej poszczególnych związków, w stosunku do kultury referencyjnej, odnotowano w przypadku biomas 14-dniowych (Ryc. 9A-D). Niższą zawartością badanych metabolitów wtórnych (jakkolwiek w dalszym ciągu przewyższającą ilości połączeń oznaczonych w próbie odniesienia), charakteryzowały się natomiast kalusy rosnące w temp. 29 °C przez 28 dni. W tym miejscu należy zaznaczyć, że spadek stężeń oznaczanych związków, w 28 dniu eksperymentu (w porównaniu do dnia 14), może być związany z ogólną nekrozą tkanek w przedłużającym się cyklu wzrostowym.

Biomasy 28-dniowe, poddane działaniu podwyższonej temperatury, jedynie w okresie od 14 do 28 dnia eksperymentu, akumulowały izoflawony w większych stężeniach niż w kalusie referencyjnym. Odnotowany wzrost ich zawartości był jednak mniej wyraźny w porównaniu z opisanymi wcześniej schematami doświadczalnymi. Wyjątek stanowił, w tym przypadku, 7-O- β -glukozyd pseudobaptygeniny, produkowany w ilości 7-krotnie wyższej niż w kulturze odniesienia (Ryc. 9B).



Ryc. 9. Wpływ temperatury na zawartość 7-O-β-glukozydu kalikozyzny (A), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (B), 7-O-β-glukozydu formononetyny (C) oraz hesperydyny (D) w kalusie *Cyclopia subternata* (mg/100g DW).

Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Zastosowane skróty: **CM**, kultura prowadzona w całkowitej ciemności; **PT**, kultura prowadzona w podwyższonej temp. (29 °C); **OT**, kultura prowadzona w obniżonej temp. (13 °C); **14-28**, kultura prowadzona w podwyższonej/obniżonej temp. tylko w okresie od 14 do 28 dnia doświadczenia; **14d**, biomasa zebrana w dniu 14; **28d**, biomasa zebrana w dniu 28.

W przeciwieństwie do izoflawonów, zawartość hesperydyny w kalusie poddanym działaniu podwyższonej temperatury od 14 do 28 dnia doświadczenia, była niższa w porównaniu z biomasą kontrolną (Ryc. 9D).

Pomimo stymulowania akumulacji bioflawonoidów w hodowlach *in vitro* badanego miodokrzewu (Ryc. 9), zabieg podwyższenia temperatury wydaje się mieć w opisywanym przypadku małą wartość praktyczną, z uwagi na jednoczesne silne hamowanie przyrostu badanych kalusów (Ryc. 8). Duża wrażliwość analizowanych biomas na stres temperaturowy jest najprawdopodobniej specyficzną cechą kalusa *C. subternata*. Dane literaturowe wskazują bowiem na korzystny wpływ podwyższonej temperatury na wzrost biomasy oraz zawartość połączeń izoflawonoidowych w kulturach parenchymatycznych innego gatunku z rodziny Fabaceae, tj. *Pueraria candollei* (Thanonkeo i Panichajakul, 2006).

Ze względu na nieco słabszą inhibicję wzrostu, bardziej korzystne wydaje się prowadzenie kultur kalusowych *C. subternata* w podwyższonej temperaturze jedynie w okresie od 14 do 28 dnia doświadczenia. Jak już wcześniej wspomniano, powyższy schemat eksperymentalny może być jednak opłacalny tylko z uwagi na pozyskiwanie 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptygeniny.

Podobnie jak w przypadku podwyższenia temperatury, jej obniżenie do 13 °C, w dniu inokulacji, wywierało zdecydowanie korzystny wpływ na zawartość wszystkich oznaczanych w kalusie *C. subternata* bioflawonoidów. Wzrost poziomów akumulacji badanych połączeń odnotowano jednak tylko w przypadku biomas rosnących, w niskiej temperaturze, przez cały cykl wzrostowy (tj. 28 dni), co stanowiło istotną różnicę w porównaniu z opisanymi powyżej eksperymentami prowadzonymi w 29 °C (Ryc. 9A-D). W niniejszym przypadku największy, 16-krotny wzrost zawartości, w porównaniu z próbą kontrolną, odnotowano dla 7-*O*- β -glukozydu kalikozyny, stężenia hesperydyny oraz 7-*O*- β -glukozydów pseudobaptygeniny i formononetyny wzrosły zaś odpowiednio 2-, 3- i 6-krotnie.

Krótsza hodowla tkanki przyrannej w obniżonej temperaturze wiązała się z osiągnięciem bardzo niejednoznacznych rezultatów. W stosunku do kultury referencyjnej, kalus rosnący w 13 °C, przez okres 14 dni, charakteryzował się 88-krotnie wyższym (w dalszym ciągu jednak niższym w porównaniu z kulturą 28-dniową) stężeniem hesperydyny. Ponadto odnotowano w opisywanym doświadczeniu stosunkowo niewielki (2 do 4-krotny) wzrost zawartości 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny i formononetyny oraz spadek akumulacji 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptygeniny. Jeszcze mniej korzystne rezultaty stwierdzono w przypadku biomasy poddanej działaniu niskiej temperatury w okresie od 14 do 28 dnia doświadczenia, produkującej w nieznacznie podwyższonej ilości jedynie 7-*O*- β -glukozyd formononetyny (Ryc. 9).

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń dowodzą, że podwyższenie lub obniżenie temperatury eksperymentu, w stosunku do standardowych 24 °C, skutkuje wzrostem poziomów akumulacji polifenoli w kalusie *C. subternata*. Dla stymulacji biosyntezy wspomnianych połączeń kluczowe wydaje się ponadto poddanie szokowi termicznemu biomasy znajdującej się w fazie adaptacyjnej. Może to świadczyć o stosunkowo wolnym tempie odpowiedzi obronnej rośliny na czynnik stresogenny, pod postacią wysokiej bądź niskiej temperatury. Wykazano jednocześnie, że obniżenie

temperatury wyraźniej stymuluje akumulację połączeń izoflawonoidowych, przede wszystkim zaś 7-O- β -glukozydu kalikozyny (Ryc. 9A). Uzyskane rezultaty są w tym względzie zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi na wzrost biosyntezy wymienionego związku, oraz odpowiadającego mu aglikonu (tj. kalikozyny) w kiełkach *Astragalus membranaceus* (Pan i wsp., 2007), właśnie pod wpływem niskiej temperatury.

Silne zahamowanie wzrostu biomas *C. subternata*, poddanych działaniu stresu temperaturowego, skutkuje drastycznym obniżeniem produktywności badanych kultur pod względem połączeń polifenolowych. Z uwagi na powyższe, bardziej korzystna z technologicznego punktu widzenia jest zmiana temperatury dopiero w 14 dniu doświadczenia, a następnie kontynuacja eksperymentu do dnia 28. W porównaniu do zastosowania szoku termicznego w dniu inokulacji, powyższy schemat doświadczalny umożliwia uzyskanie większych ilości biomasy, wykorzystywanej następnie do izolacji poszczególnych składników zespołu polifenolowego (Ryc. 8 i 9). Niestety, opisane postępowanie może być opłacalne tylko do pozyskiwania 7-O- β -glukozydu pseudobaptygeniny z kalusa *C. subternata* poddanego działaniu podwyższonej temperatury (Ryc. 9B). Ogólnie rzecz ujmując, rezultaty prezentowanych doświadczeń, jakkolwiek interesujące z punktu widzenia fizjologii roślin, wydają się mieć małe znaczenie praktyczne dla komercyjnego pozyskiwania bioflawonoidów.

Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach doświadczeń z zakresu wpływu czynników fizycznych na metabolizm kultur kalusowych *C. subternata*, wykazały istotny wpływ oświetlenia, promieni ultrafioletowych oraz temperatury na wzrost badanych biomas oraz akumulację związków polifenolowych.

Stwierdzono m.in., że rodzaj oświetlenia nie wywiera wyraźnego wpływu na wzrost kalusów miodokrzewu, które charakteryzowały się w każdym przypadku stosunkowo wysokimi wartościami współczynnika przyrostu ($G_i \approx 1000-1300$, Ryc. 4). Jednocześnie udowodniono, że obecność światła dziennego stymuluje, lecz nie jest niezbędnym czynnikiem warunkującym biosyntezę związków polifenolowych w testowanych biomasach. Najlepszy rezultat, pod względem zawartości bioflawonoidów w tkance przyrannej, uzyskano w przypadku zastosowania światła niebieskiego, w którego obecności maksymalne stężenia hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny wyniosły odpowiednio 118,00, 28,74, 19,26 i 10,32 mg/100 g DW, co stanowi 39, 10, 30 i 28 % wzrost zawartości badanych połączeń w stosunku do kultury odniesienia (kalus rosnący przy świetle białym). Niestety, maksima produkcji polifenoli z poszczególnych grup chemicznych odpowiadały różnym fazom cyklu wzrostowego kultury – największą zawartość izoflawonów odnotowano dnia 14, hesperydyny zaś w dniu 28 (Ryc. 5).

Naświetlanie kalusa promieniami UVC wywierało wyraźnie zaznaczony wpływ na metabolizm pierwotny badanej biomasy. Stwierdzono w szczególności, że irradycja tkanki przyrannej w fazie adaptacyjnej (tj. w dniu inokulacji) powoduje zahamowanie wzrostu kalusa *C. subternata* (Ryc. 6). Ponadto, doświadczenie wykazało istotny wpływ promieniowania ultrafioletowego na akumulację polifenoli w badanej tkance. Najwyższe stężenia wszystkich badanych metabolitów wtórnych odnotowano w

biomasie 28-dniowej, naświetlanej promieniami UVC w dniu 20. Wzrost zawartości poszczególnych polifenoli, w stosunku do kultury referencyjnej, był największy w przypadku hesperydyny (140 %) oraz 7-O- β -glukozydu pseudobaptygeniny (165 %), których poziomy akumulacji wyniosły odpowiednio 204,13 i 18,09 mg/100 g DW (Ryc. 7). W tym miejscu należy zaznaczyć, że uzyskane w kalusie stężenie hesperydyny było najwyższą ilością wtórnego metabolitu w serii doświadczeń obejmujących modyfikacje warunków oświetleniowych.

Podwyższenie bądź obniżenie temperatury w toku eksperymentu powodowało wyraźne zahamowanie wzrostu tkanki przyrannej *C. subternata*. Zastosowanie szoku temperaturowego skutkowało zarazem zwiększeniem poziomów akumulacji związków polifenolowych. Najwyższe stężenie hesperydyny (54,99 mg/100 g DW, ponad 200-krotny wzrost zawartości w stosunku do próby kontrolnej) oraz 7-O- β -glukozydów pseudobaptygeniny i formononetyny (odpowiednio 84,55 i 29,97 mg/100 g DW, 11- i 15-krotny wzrost stężeń) obserwowano w przypadku biomas rosnących w temp. 29 °C przez cały cykl wzrostowy (Ryc. 9). Obniżenie temperatury spowodowało przede wszystkim znaczące podwyższenie zawartości 7-O- β -glukozydu kalikozyny, którego ilość (235,29 mg/100 g DW, ponad 16-krotny wzrost stężenia w porównaniu z kontrolą) była największa w serii doświadczeń prezentowanych w niniejszym rozdziale.

Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że modyfikacje warunków prowadzenia kultury pozwalają na podwyższenie poziomów akumulacji związków polifenolowych w kalusie *C. subternata*. Dobre rezultaty w tym względzie przyniosło zwłaszcza naświetlanie biomas promieniami UVC (Ryc. 7), a także podwyższenie bądź obniżenie temperatury hodowli (Ryc. 9). Powyższe strategie doświadczalne, jakkolwiek skuteczne, wydają się jednak mało przydatne w przypadku pozyskiwania związków polifenolowych metodami biotechnologicznymi na dużą skalę. Rozważyć należy bowiem możliwość ich zastosowania dla kultur zawieszinowych, wyprowadzonych docelowo z kalusa badanego gatunku. Problematyczne jest zwłaszcza zastosowanie promieniowania ultrafioletowego w przypadku kultur wielkoskalowych prowadzonych w bioreaktorach, co związane jest przede wszystkim z napotykanymi trudnościami o charakterze technicznym, takimi jak konieczność umieszczenia lampy UV wewnątrz naczynia hodowlanego, przy jednoczesnym zachowaniu parametrów hydrodynamicznych fermentora, a także sterylności procesu (Cuello i Yue, 2008). Z uwagi na powyższe, opracowano jak dotąd jedynie nieliczne systemy bioreaktorów umożliwiające elicytację biomas roślinnych przy użyciu promieni UV (Sequeida i wsp., 2012).

Poddanie biomas szokowi termicznemu, jakkolwiek stosunkowo proste z technologicznego punktu widzenia także w przypadku hodowli o dużej objętości, jest jednak zdecydowanie niekorzystne dla biomas parenchymatycznej *C. subternata*, hamując jej przyrost (Ryc. 8). Z tego powodu, nawet zwielokrotnienie poziomu akumulacji poszczególnych związków polifenolowych w kulturze nie jest w stanie zrekompensować obniżenia ogólnej produktywności systemu, spowodowanego zahamowaniem wzrostu biomas parenchymatycznej. Pomimo opisanych wyżej problemów, uzyskane wyniki są interesujące z uwagi na ogólnie rozumianą fizjologię roślin i wskazują na możliwość wykorzystania kultur parenchymatycznych

C. subternata jako dogodnego modelu do badania reakcji obronnych roślin z rodziny *Fabaceae*. Wyjaśnienie mechanizmów obserwowanych zmian w profilach biosyntezy poszczególnych połączeń polifenolowych, pozwoliłoby także na opracowanie skuteczniejszych strategii zwiększania produktywności badanych biomas, w oparciu o modelowanie wtórnego metabolizmu na drodze zmian warunków hodowli.

II.1.2.2. Kultury zawiesinowe *Cyclopia subternata*

Podstawowa część prac biotechnologicznych, ukierunkowanych na uzyskanie wydajnego źródła wybranych połączeń polifenolowych w oparciu o kultury *in vitro* rodzaju *Cyclopia*, przeprowadzona została z wykorzystaniem hodowli zawiesinowych, wyprowadzonych z biomas kalusowych *C. subternata*, charakteryzujących się największą zdolnością produkcyjną w zakresie nie występujących w roślinie macierzystej związków izoflawonoidowych (rozdz. II.1.1.4.). W przeciwieństwie do kalusa, wspomniany typ kultury zapewnia wydajne napowietrzanie oraz dobry kontakt wszystkich komórek biomasy ze składnikami pożywki, co przekłada się bezpośrednio na efektywniejsze zużycie substancji odżywczych, a tym samym szybszy przyrost tkanek oraz wzrost ich produktywności w zakresie metabolitów wtórnych. Z uwagi na powyższe, hodowle zawiesinowe, jako typ kultury, są bardziej odpowiednie od kalusów do testowania wybranych strategii retrobiosyntetycznych, obejmujących suplementację podłoża prekursorami biosyntezy, jak również elicytacji oraz immobilizacji biomas, ze względu na ich wpływ na pierwotny oraz wtórny metabolizm tkankowy. Płynny charakter kultury umożliwia ponadto stosunkowo łatwe zwiększanie skali eksperymentu, poprzez przystosowanie hodowli zawiesinowych do wzrostu w warunkach bioreaktorów (Su i wsp., 1995; Kieran i wsp., 1997; Zhong, 2001; Verpoorte i wsp., 2002). Tym samym, uzyskanie zawiesiny *C. subternata* było kluczowe dla realizacji głównego celu projektu badawczego.

W ramach przeprowadzonych badań, opracowano sposób inicjacji parenchymatycznych hodowli wytrząsanych *C. subternata*, wykorzystywany następnie do prowadzenia doświadczeń biotechnologicznych z użyciem zawiesiny powyższego gatunku. W pierwszej kolejności, określono parametry wzrostowe wyprowadzonej kultury, wyznaczając krzywe zmian świeżej (FW) i suchej (DW) masy oraz współczynnika przyrostu (Gi) w czasie cyklu wzrostowego. Zebrane próbki biomas, po liofilizacji, poddano skryningowym analizom chromatograficznym, celem wykreślenia profili produkcyjnych zawiesin względem badanych związków polifenolowych. Dalsza część prac eksperymentalnych obejmowała zbadanie wpływu wybranych warunków fizycznych prowadzenia hodowli, strategii retrobiosyntetycznych, czynników stresowych oraz środków immobilizujących, na zawartość metabolitów wtórnych w otrzymanej kulturze.

Śród czynników fizycznych, zdecydowano się na modyfikację warunków oświetleniowych hodowli, przeprowadzając eksperyment przy całkowitym zaciemnieniu. Z uwagi na obecność w tkance przyrannej *C. subternata* połączeń o charakterze izoflawonów, tj. 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny

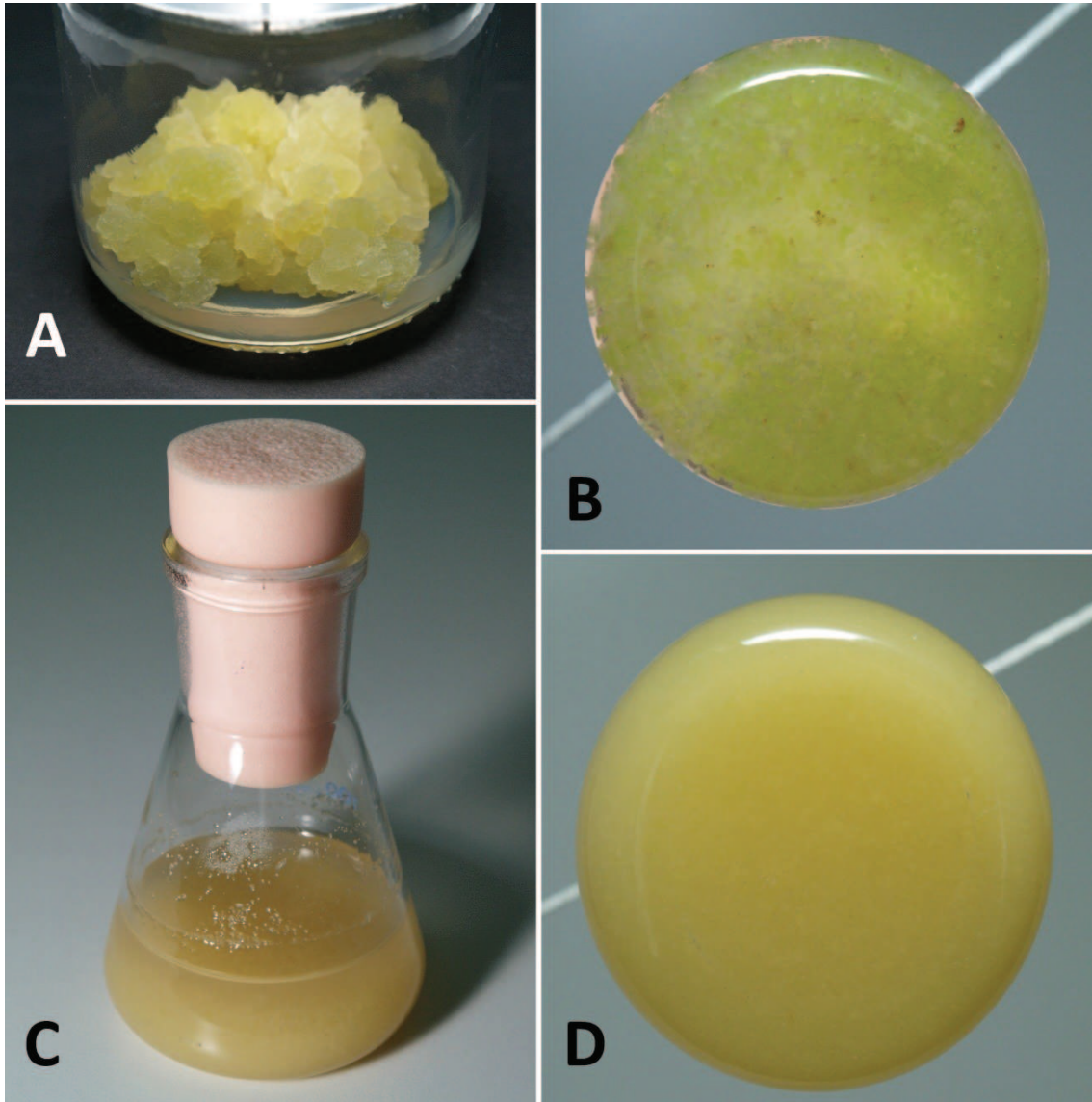
(rozdz. II.1.1.4.), a także fakt pełnienia przez szereg związków ze wspomnianej grupy funkcji fitoaleksyn lub fitoantycypin (Dixon, 1999; Łuczkiwicz, 2008), zaplanowane eksperymenty uwzględniały zastosowanie elicytacji biotycznej (chitosan) i abiotycznej (jasmonian metylu) jako czynników stymulujących wtórny metabolizm. Ponadto, przeprowadzono serię doświadczeń z zakresu suplementacji pożywki wzrostowej dalekim prekursorem biosyntezy polifenoli (fenyloalanina) oraz złożonymi substancjami odżywczymi i regulatorowymi (woda kokosowa, hydrolizat kazeiny), z uwagi na ich korzystny wpływ na wzrost biomasy i zawartość flawonoidów w roślinnych kulturach *in vitro* (Łuczkiwicz, 2008; Matkowski, 2008; Smetanska, 2008). Poza dodatkiem wymienionych substancji, zawiesiny *C. subternata* suplementowano substancjami o charakterze adsorbentów, tj. żywicą AmberliteTM XAD4 oraz rozdrobnionym korkiem (*Quercus suber* L.). Powyższe materiały miały pełnić dwojaką funkcję: czynników immobilizujących, imitujących w warunkach kultury parenchymatycznej korzystne zróżnicowanie tkankowe, a także środków adsorbujących produkowane metabolity wtórne (Dörnenburg i Knorr, 1995; Zhao i wsp., 2003). Podobnie jak w przypadku podstawowej kultury zawiesinowej, prowadzonej przy oświetleniu ciągłym i nie poddanej dodatkowym zabiegom doświadczalnym, zebrane w toku powyższych eksperymentów biomasy analizowano pod względem parametrów wzrostowych (określenie świeżej i suchej masy oraz wartości współczynnika przyrostu), a także zawartości polifenoli.

Ostatni etap prowadzonych badań stanowiła adaptacja uzyskanych kultur zawiesinowych *C. subternata* do wzrostu w prototypowych bioreaktorach, skonstruowanych w ramach opisywanego projektu. Zaplanowane w tym celu doświadczenia obejmowały dobór odpowiedniej konstrukcji fermentora oraz warunków prowadzenia hodowli, tzn. prędkości mieszania i poziomu napowietrzenia zawiesiny oraz dodatku do instalacji środków przeciwpiannych. Ostatecznie, kultury *C. subternata* prowadzono w bioreaktorze w wersji podstawowej oraz w kombinacji modyfikacji eksperymentalnych, które uprzednio okazały się najskuteczniejsze w zakresie stymulowania przyrostu biomasy i/lub akumulacji metabolitów wtórnych na poziomie hodowli wytrząsanych namnażanych w kolbach Erlenmeyera.

II.1.2.2.1. Wyprowadzenie kultur zawiesinowych *Cyclopia subternata*

Jak już wcześniej wspomniano, źródło biomasy służącej do wyprowadzenia hodowli zawiesinowej *C. subternata* stanowił kalus powyższego gatunku uzyskany w trakcie wcześniejszych prac biotechnologicznych (rozdz. II.1.1.2.). Wymieniona kultura parenchymatyczna charakteryzowała się dużą żywotnością oraz luźną konsystencją (rozdz. II.1.1.2. – Tab. 6; Fot. 5C), co czyniło z niej materiał odpowiedni do inicjacji kultur płynnych wytrząsanych. Hodowle zawiesinowe zakładano w sposób tradycyjny, obejmujący dyspersję tkanki przyrannej w pożywce płynnej, posiłkując się przy tym doświadczeniem zdobytym w czasie wcześniejszych prac nad kulturami wytrząsanymi roślin z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz i Głód, 2005; Łuczkiwicz, 2006; Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2012). Mając na względzie stosunkowo dużą wrażliwość biomasy

parenchymatycznej *C. subternata* na czynniki stresowe (rozdz. II.1.1.2. i II.1.2.1.), w celu uniknięcia nadmiernego uszkodzenia komórek, zdecydowano się na łagodne rozdrabnianie kalusa w zlewce szklanej przy użyciu pistla (rozdz. III.1.6.2.1.). Do eksperymentów przeznaczono kalus rosnący przez okres 20 dni na zmodyfikowanym podłożu MS (Fot. 9A).



Fot. 9. A – kalus *Cyclopia subternata* przeznaczony do inicjacji kultur zawiesinowych, rosnący przez 20 dni na zmodyfikowanej pożywce MS, suplementowanej 20,19 μM 4-PPU oraz 1,96 μM 2,4,5-T; B – zawiesina inicjalna *C. subternata* w kolbie stożkowej; C – kultura zawiesinowa prowadzona przez okres 20 dni (C, D).

Biomasy utrzymywane na podłożu stacjonarnym przez dłuższy czas były trudniejsze do rozdrobnienia ze względu na bardziej zwartą konsystencję, cechował je ponadto większy stopień cytodyferencji. Skutkiem powyższego, uzyskana zawiesina inicjalna składała się ze stosunkowo dużych agregatów wykazujących silne tendencje do zamierania, manifestujące się szybkim brunatnieniem. W rezultacie, jedynie kalus 3-

tygodniowy umożliwił uzyskanie homogennej, żywej biomasy, wykorzystywanej następnie do inokulacji kolb stożkowych na wszystkich etapach eksperymentów biotechnologicznych opisywanych w niniejszym rozdziale. Po wprowadzeniu rozdrobnionej mechanicznie tkanki (1,25 g) do płynnego medium (50,0 ml), następowała natychmiastowa dyspersja komórek kalusa, przy czym największe z obserwowanych agregatów miały średnicę ok. 2 mm (Fot. 9B). Na skutek mieszania, wielkość wspomnianych konglomeratów komórkowych ulegała zmniejszeniu w pierwszych 2-4 dniach eksperymentu, tworząc homogenną zawiesinę, zachowującą wysoki stopień rozdrobnienia przez cały cykl wzrostowy (Fot. 9C, D). Z uwagi na bardzo dobre parametry wzrostowe i produkcyjne kalusa *C. subternata* (rozdz. II.1.1.2. i II.1.1.4.), rosnącego na opisaną wcześniej, zmodyfikowanej pożywce MS, suplementowanej 20,19 μM 4-CPPU i 1,96 μM 2,4,5-T (pożywka MS_{STD} – rozdz. III.1.6.1.), do wyprowadzenia i późniejszego namnażania kultur zawiesinowych wykorzystano podłoże płynne o tym samym składzie. Omówiony sposób inicjacji zawiesiny (rozdz. III.1.6.2.1.), stosowany był następnie we wszystkich doświadczeniach z wykorzystaniem parenchymatycznych kultur wytrząsanych *C. subternata*, jak również w eksperymentach z użyciem bioreaktorów z uwzględnieniem odpowiednio większego *inoculum*).

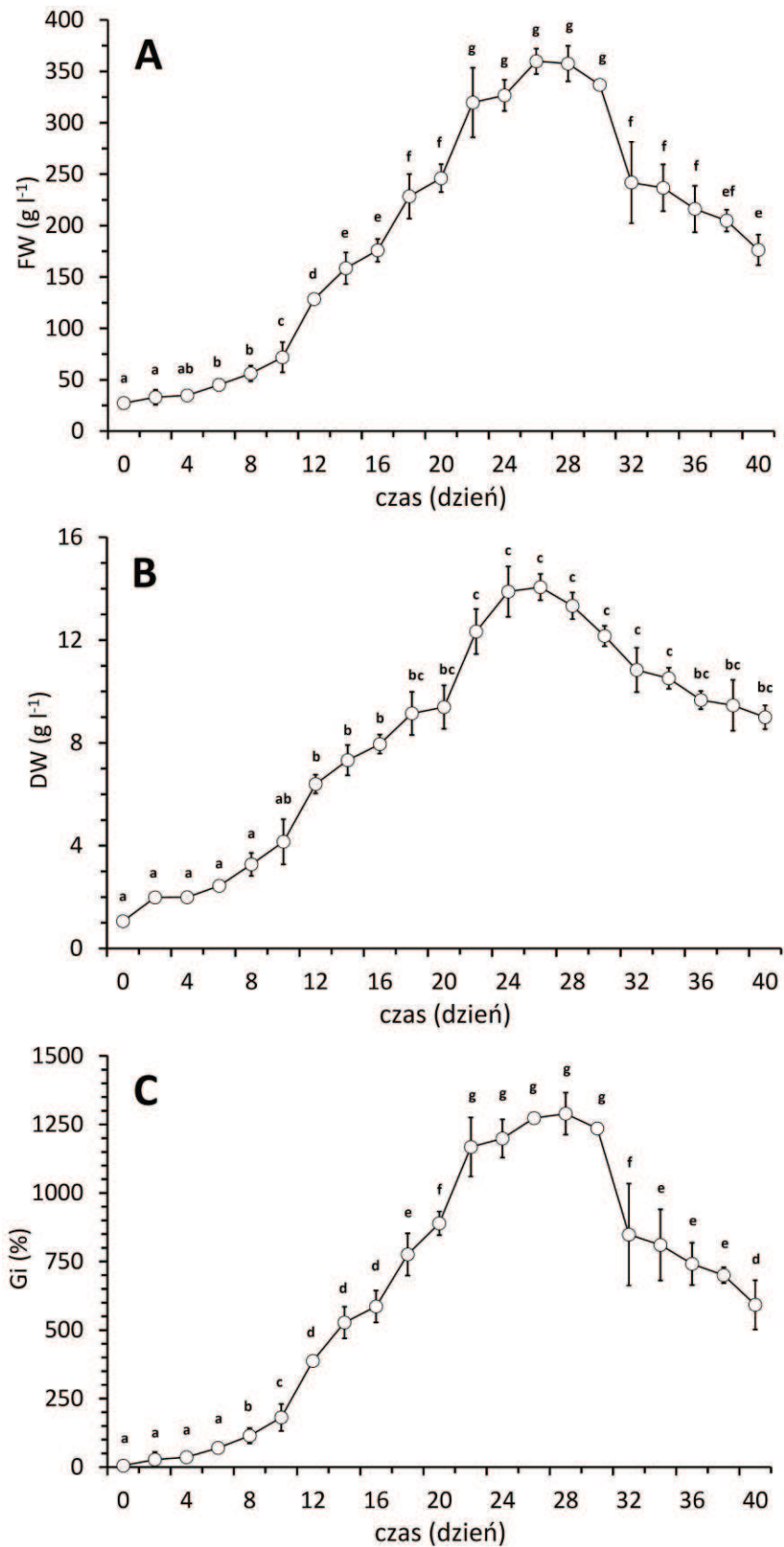
II.1.2.2.2. Wytrząsane hodowle zawiesinowe *Cyclopia subternata*

II.1.2.2.2.1. Podstawowa wytrząsana hodowla zawiesinowa *Cyclopia subternata*

II.1.2.2.2.1.1. Profil wzrostowy podstawowej wytrząsanej hodowli zawiesinowej *Cyclopia subternata*

Przyrost zawiesiny parenchymatycznej *C. subternata* badano w stosunkowo długim, 40-dniowym cyklu hodowlanym, celem uchwycenia wszystkich faz wzrostu charakterystycznych dla roślinnych kultur *in vitro* (Bhojwani i Razdan, 1996). Próbki biomas zbierano w 2-dniowych odstępach czasu, ważono, liofilizowano i ponownie ważono wg protokołu opisanego w części doświadczalnej (rozdz. III.1.4.1. i III.1.6.2.2.). Na podstawie wyznaczonych wartości świeżej (FW) i suchej masy (DW) oraz współczynnika przyrostu (G_i), wykreślono dla badanej kultury odpowiednie krzywe wzrostowe (Ryc. 10A-C).

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że biomasa *C. subternata* charakteryzuje się dużą żywotnością i ma charakter szybko rosnącej zawiesiny, o czym świadczyła znaczna ilość świeżej masy uzyskana już w 26 dniu eksperymentu (ok. 360 g l⁻¹). Odpowiadała ona ponad 14-krotnemu przyrostowi tkanki inokularnej ($G_i \approx 1300\%$). Jednocześnie należy zaznaczyć, że podwojenie ilości biomasy wyjściowej nastąpiło bardzo szybko, bo już w 6 dniu cyklu hodowlanego (krzywa wzrostowa dla DW – Ryc. 10B). Jest to zjawisko dość niezwykle w przypadku kultur nie modyfikowanych genetycznie (Kieran i wsp., 1997; Guillon i wsp., 2006; Georgiev i wsp., 2007).



Ryc. 10. Wzrost kultur zawieszinowych *CyclopiA subternata*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera w warunkach oświetlenia ciągłego. Profile wzrostowe wyrażono jako zmiany ilości świeżej (A) i suchej masy (B) oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi) w cyklu hodowlanym. Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

W profilu wzrostowym opisywanej kultury nie zaobserwowano wyraźnie zaznaczonej fazy opóźnienia, co wskazuje na dobrą adaptację komórek do nowych warunków środowiskowych, tj. wytrząsania powodującego niejednokrotnie mechaniczne uszkodzenie namnażanych tkanek (Kieran i wsp., 1997, 2000). Faza wzrostu logarytmicznego, widoczna na krzywych wzrostowych opracowanych w oparciu o świeżą i suchą masę, przypadała na okres od 2 do 10 dnia eksperymentu (Ryc. 10A, B). Począwszy od dnia 10, biomasa przyrastała liniowo do 26 dnia doświadczenia. Charakterystyczne dla badanej zawiesiny jest niewyraźnie zaznaczone i bardzo krótkie *plateau*, przypadające na okres od 24 do 28 dnia cyklu hodowlanego. Przechodziło ono szybko w fazę zamierania, trwającą do dnia 40 (koniec eksperymentu). W opisywanym przypadku nie odnotowano wyraźnych różnic w dynamice zmian ilości świeżej i suchej masy (Ryc. 10A, B) w cyklu eksperymentalnym, poza nieznacznym przesunięciem fazy stacjonarnej w kierunku dalszych dni hodowli, na wykresie przyrostu opracowanym w oparciu o zmiany FW. Zjawisko to jest dosyć oczekiwane i świadczy o stopniowym zaprzestaniu podziałów komórkowych w kulturze, przy trwającym dłużej zwiększaniu objętości komórek, mającym wpływ na finalną wartość świeżej masy (Bhojwani i Razdan, 1996). Zbierane w 2-dniowych odstępach próbki matryc roślinnych, aż do 30 dnia doświadczenia charakteryzowało, podobnie jak kalus (rozd. II.1.1.2.), jasnożółte zabarwienie oraz duża homogenność. Począwszy od dnia 32, obserwowano natomiast wyraźne zmiany nekrotyczne badanej zawiesiny. Biomasa *C. subternata* stała się lepka, drobnoziarnista (utrata turgoru przez komórki) i zaczęła wyraźnie ciemnieć (produkcja prostych fenoli oraz ich utlenianie). Wspomniane zmiany odpowiadają wyraźnie zaznaczonemu spadkowi ilości świeżej masy (zmniejszenie uwodnienia komórek) oraz obniżeniu wartości G_i (Ryc. 10A, C). Z technologicznego punktu widzenia, korzystną cechą zawiesiny *C. subternata* jest jej duża żywotność i intensywne tempo przyrostu, manifestujące się wysoką wartością maksymalnego współczynnika przyrostu (Ryc. 10C). Zdecydowanie niekorzystny jest natomiast krótki okres trwania fazy stacjonarnej oraz szybkie przechodzenie jej w fazę zamierania, mogące utrudniać prowadzenie hodowli w systemie ciągłym.

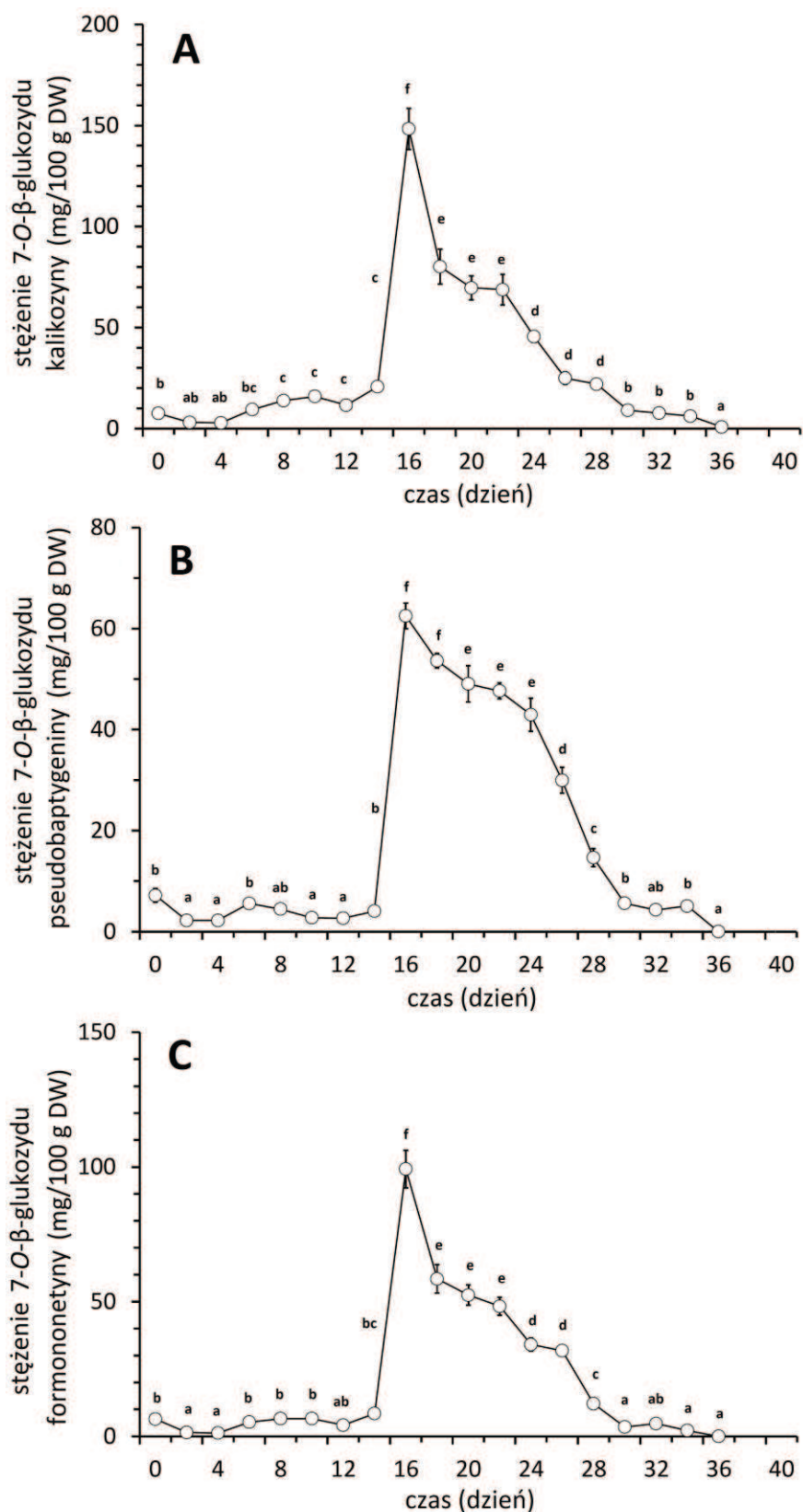
II.1.2.2.2.1.2. Biosynteza związków polifenolowych w podstawowej wytrząsanej hodowli zawiesinowej *Cyclopia subternata*

Skryningowe analizy HPLC wyciągów metanolowych przygotowanych z biomas zebranych w kolejnych dniach cyklu hodowlanego wykazały, że kultura zawiesinowa *C. subternata* zachowała zdolność do akumulacji związków polifenolowych charakterystycznych dla kalusa wspomnianego gatunku, tj. 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny oraz formononetyny (rozd. II.1.1.4.). Nie zawierała ona, podobnie jak tkanka przyranna, metabolitów o charakterze ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna), a także pochodnych benzofenonu (3-*C*- β -glukozydy makluryny i iriflofenonu). Jedyłą, a jednocześnie najistotniejszą różnicę w składzie jakościowym badanych metabolitów pomiędzy obydwooma rodzajami kultur, stanowił w hodowli zawiesinowej całkowity brak hesperydyny. Jak już wspomniano w rozdz.

II.1.1.4., spadek akumulacji powyższego połączenia może być związany z wiekiem kultury. Obniżenie stężenia hesperydyny, wraz z kolejnymi pasażami, obserwowano m.in. w przypadku biomas parenchymatycznych *Citrus* sp. (Barthe i wsp., 1987). Jednocześnie możliwe jest, że zanik zróżnicowania tkankowego w niniejszej kulturze wpłynął na zmianę szlaków metabolicznych badanej rośliny w kierunku biosyntezy izoflawonów. Tym samym, zawiesina *C. subternata* stanowiła *de facto* wybiórcze źródło wymienionych wyżej połączeń.

W toku doświadczeń zaobserwowano wyraźną zależność pomiędzy poziomem akumulacji pochodnych izoflawonoidowych a fazą wzrostu badanej biomasy parenchymatycznej. Co istotne, wspomniana korelacja kształtowała się identycznie w przypadku każdego z analizowanych połączeń. Stężenia wszystkich trzech izoflawonów ulegały obniżeniu w początkowych dniach eksperymentu (Ryc. 11A-C), a następnie utrzymywały się na niskim poziomie aż do dnia 14. Przyczyny tego zjawiska można upatrywać w konieczności dostosowania się komórek kalusa do warunków hodowli płynnej oraz w stopniowej biosyntezie prekursorów, biorących udział w powstawaniu finalnie rejestrowanych produktów tj. połączeń izoflawonoidowych. Maksymalne stężenia 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny (148,0 mg/100 g DW), formononetyny (99,0 mg/100g DW) oraz pseudobaptygeniny (76,8 mg/100 g DW) przypadały odpowiednio na 16 (2 pierwsze związki) oraz 18 dzień hodowli, czyli na fazę intensywnego wzrostu liniowego zawiesiny *C. subternata* (Ryc. 11A-C). Wysokie zawartości izoflawonów odnotowane we wspomnianej fazie wzrostu są najpewniej związane z ogólnie intensywnym metabolizmem szybko dzielących się komórek zawiesiny. Świadczy o tym stopniowy spadek zawartości izoflawonów w biomacie przed osiągnięciem fazy stacjonarnej i utrzymywanie się stężeń powyższych związków na zbliżonym poziomie aż do jej zakończenia. Intensywna produkcja izoflawonów w zawieszynie *C. subternata* w okresie przypadającym na jej szybki wzrost (Ryc. 10 i 11) jest zjawiskiem dość niezwykłym. Większość wtórnych metabolitów w roślinnych kulturach *in vitro* jest syntezowana bezpośrednio po zakończeniu intensywnego przyrostu tkanek, z uwagi na istniejące mechanizmy konkurencji o związki prekursorowe między szlakami pierwotnego i wtórnego metabolizmu (Federici i wsp., 2003; Boonsongcheep i wsp., 2010; Karwasara i Dixit, 2012, Udomsuk i wsp., 2012). W efekcie, procedury biotechnologiczne zmierzające do pozyskania określonych metabolitów trwają długo, a nierzadko wymagają zastosowania dwufazowych systemów hodowlanych, w których na następujących po sobie etapach, w pożywkach o różnym składzie, realizowany jest oddzielnie wzrost tkanki, a dopiero później wtórny metabolizm (Łuczkiwicz i Cisowski, 2001).

Wyraźny spadek zawartości analizowanych metabolitów obserwowano w zawieszynie od dnia 30, stanowiącego jednocześnie początek fazy zamierania. Należy zaznaczyć, że obniżeniu stężenia glukozydów izoflawonowych w badanej biomacie nie towarzyszyło pojawienie się w matrycach roślinnych odpowiednich aglikonów, tj. kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, co świadczyłoby o hydrolitycznym rozpadzie analizowanych połączeń. Zjawisko takie obserwowano np. w przypadku kultur *in vitro* *Genista* sp. (Łuczkiwicz, 2008).



Ryc. 11. Zawartość 7-O-β-glukozydu kalikozyny (A), 7-O-β-glukozydu pseudobaptigeniny (B) oraz 7-O-β-glukozydu formononetyny (C) w kulturach zawiesinowych *C. subternata*, rosnących w warunkach oświetlenia ciągłego.

Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Brak znacznika oznacza nieobecność związku w badanej biomasie.

Stwierdzono ponadto, że badane związki magazynowane były wyłącznie wewnątrzkomórkowo, analizy HPLC pożywek wzrostowych, pochodzących z poszczególnych dni hodowli, nie wykazały bowiem obecności w nich związków polifenolowych nawet na etapie spadku zawartości analizowanych metabolitów w kulturze *C. subternata*. Uzyskany wynik stanowi potwierdzenie wcześniejszych obserwacji, wskazujących na wewnątrzkomórkowe magazynowanie połączeń izoflawonoidowych w kulturach *in vitro* roślin motylkowych (Łuczkiwicz, 2008; Sharma i wsp., 2009; Shinde i wsp., 2009a)

Z uwagi na powyższe, nie można tłumaczyć spadku zawartości izoflawonów w matrycach roślinnych *C. subternata* zmianą ich sposobu magazynowania ani metabolizowaniem do innych połączeń z badanej grupy. Wydaje się natomiast, że obserwowane zmiany ich stężeń związane są z postępującym katabolizmem tkanek i być może rozpadem oznaczanych związków do form o charakterze prostych fenoli (brązowienie kultury).

Wąski przedział czasu, odpowiadający maksimum produkcji izoflawonoidów (16-18 dzień) i przypadający na fazę wzrostu liniowego, jest niekorzystny z technologicznego punktu widzenia, ogranicza bowiem w istotny sposób produktywność kultury. Ilość DW oznaczona w dniu 26, stanowiącym maksimum przyrostu, jest ponad 1,7-krotnie wyższa w porównaniu z dniem 16. Dla celów pozyskiwania metabolitów wtórnych na skalę komercyjną, odpowiedniejszy byłby zbiór biomasy właśnie w czasie trwania fazy stacjonarnej, co jednakże wiąże się w omawianym przypadku ze znacznie niższymi poziomami izoflawonów.

Porównując uzyskaną kulturę zawieszinową z opisanymi uprzednio hodowlami stacjonarnymi *C. subternata* należy zaznaczyć, że poziomy akumulacji poszczególnych izoflawonów w dniu 16 eksperymentu znacznie przekraczały maksymalne stężenia wspomnianych związków w kalusie parenchymatycznym (rozdz. II.1.1.4.). W omawianym przypadku, zawartości 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny w kulturze wytrząsanej były odpowiednio ok. 6-, 4- i 12-krotnie wyższe w porównaniu z kalusem. Jednocześnie, w danym przedziale czasowym otrzymano w hodowli wytrząsanej 4-krotnie większą ilość biomasy ($G_i \approx 1300\%$) niż w kulturze stacjonarnej ($G_i \approx 400\%$). Z drugiej strony zawiesina w dniu 26, odpowiadającym jej maksymalnemu przyrostowi, zawierała już tylko porównywalne do kalusów ilości poszczególnych związków (ok. 20 mg/100 g DW 7-*O*- β -glukozydu kalikozyny) lub jedynie nieznacznie je przekraczające (2- i 3,5-krotność odnotowanych w tkance przyrannej stężeń 7-*O*- β -glukozydów pseudobaptygeniny i formononetyny, co odpowiada ok. 30,0 mg/100 g DW zawartości powyższych związków) (Ryc. 11; rozdz. II.1.1.4. – Ryc. 5). Celem uzyskania systemu hodowlanego o stosunkowo dużej produktywności, należałoby więc zbierać zawiesinę *C. subternata* między 18 a 20 dniem kultury, gdzie oznaczono już dość znaczną ilość namnożonej biomasy i zadowalające stężenie izoflawonów.

Podsumowując, w wyniku zastosowanej procedury doświadczalnej otrzymano szybko rosnącą i żywotną zawiesinę *C. subternata*, stanowiącą wybiórcze i unikatowe źródło glukozydów izoflawonowych nie występujących w roślinie gruntowej. Z punktu widzenia pozyskiwania niniejszych związków, korzystny jest ponadto brak, w

omawianych biomasach, hesperydyny. Stwarza to możliwość uproszczenia procedur *downstream*, stanowiących nieodłączną część opracowywanego systemu do biotechnologicznej produkcji powyższych połączeń. Poziomy akumulowanych w zawieszynie wtórnych metabolitów oraz jej tempo wzrostu predestynują niniejszą kulturę do prowadzenia eksperymentów wielkoskalowych, zmierzających do komercyjnej produkcji 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, metabolitów o dużej wartości rynkowej oraz spodziewanej aktywności biologicznej.

II.1.2.2.2. Wpływ braku oświetlenia na wzrost biomasy i biosyntezę związków polifenolowych w wytrząsanych kulturach zawieszinowych *Cyclopia subternata*

Specyfika akumulacji polifenoli w kalusie *C. subternata* kultywowanym przy ciągłym dostępie światła, podobnie jak w zawieszynie, charakteryzowała się wystąpieniem maksymalnej produkcji izoflawonów w 14 dniu hodowli, po którym następował gwałtowny spadek stężeń oznaczanych połączeń. Brak światła w kulturze stacjonarnej spowodował przesunięcie intensywnej biosyntezy polifenoli dopiero na dzień 28 (rozdz. II.1.2.1.1.). Obserwacje profilów produkcyjnych i wzrostowych w zawieszynie *C. subternata*, rosnącej w warunkach światła dziennego wykazały, że w danym wypadku maksymalne stężenie izoflawonów osiągnięto 10 dni wcześniej (16 dzień) niż najwyższą ilość biomasy (Ryc. 10 i 11). Opóźnienie intensywnej biosyntezy badanych związków, stwierdzone dla kalusa kultywowanego w pełnej ciemności sugerowało, że niniejsza procedura eksperymentalna zastosowana dla zawiesziny badanego gatunku mogłaby zaowocować wystąpieniem maksymalnej produkcji polifenoli oraz osiągnięciem największej ilości biomasy z systemu w jak najbardziej zbliżonych dniach cyklu hodowlanego. W efekcie, wiązałoby się to z dużym podwyższeniem produktywności systemu roślinnego *in vitro*. W tym miejscu należy zaznaczyć, że kultury kalusowe prowadzone w ciemności ogólnie akumulowały mniej izoflawonów niż biomasa rosnąca przy dostępie światła (rozdz. II.1.2.1.1.). Zawieszinę *C. subternata* charakteryzował jednak nieco inny wtórny metabolizm (brak produkcji flawanonów) w stosunku do kalusów, stąd też w kulturze wytrząsanej badanego gatunku, prowadzonej bez dostępu światła, można było oczekiwać odmiennych rezultatów.

Z uwagi na powyższe, postanowiono zbadać wpływ całkowitego zaciemnienia na pierwotny (wzrost) oraz wtórny metabolizm (produkcja polifenoli) zawiesziny *C. subternata*. Poza odmiennymi warunkami oświetleniowymi, eksperyment przeprowadzono w sposób identyczny (rozdz. III.1.6.2.2. i III.1.6.2.3.) jak opisane wcześniej doświadczenie wykonane przy dostępie światła (rozdz. II.1.2.2.2.1.), stanowiące w tym przypadku próbę kontrolną.

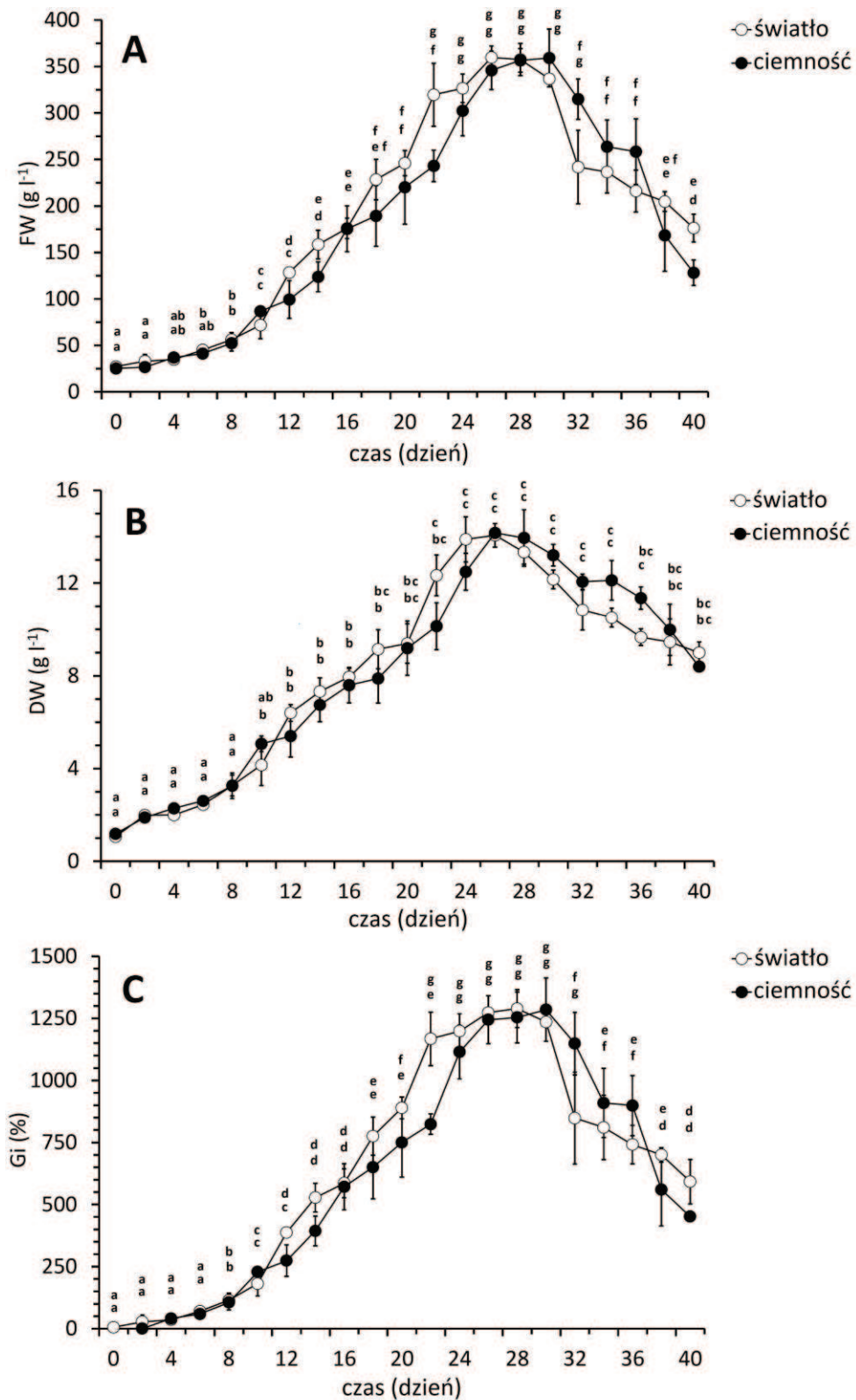
II.1.2.2.2.1. Profil wzrostowy wytrząsanej hodowli zawieszinowej *Cyclopi* *subternata* prowadzonej w warunkach całkowitej ciemności

Profile wzrostowe zawiesiny *C. subternata*, prowadzonej w warunkach całkowitej ciemności, wykreślone na podstawie zmian ilości świeżej (FW) i suchej (DW) masy oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi) w cyklu wzrostowym, były zbliżone do odpowiednich wykresów dla kultury referencyjnej, rosnącej przy dostępie światła (rozdz. II.1.2.2.2.1.1. – Ryc. 10).

Maksymalne wartości FW ($\approx 346 \text{ g l}^{-1}$), DW ($\approx 14 \text{ g l}^{-1}$) oraz Gi ($\approx 1300 \%$) były prawie identyczne w przypadku obydwu doświadczeń (Ryc. 12A-C). Uzyskane wyniki dowodzą więc, że wzrost biomasy parenchymatycznej *C. subternata* w hodowli wytrząsanej jest zasadniczo niezależny od warunków oświetleniowych. Podobnie jak kultura naświetlana, zawiesina rosnąca w ciemności charakteryzowała się prawie zupełnym brakiem fazy opóźnienia, po której następowała słabo zaznaczona faza wzrostu logarytmicznego (2-8 dzień) oraz faza intensywnego wzrostu liniowego, trwająca aż do dnia 26, w którym osiągnięto maksymalny przyrost tkanki (Ryc. 12). Krzywe wzrostowe wykreślone na podstawie zmian FW i DW były względem siebie nieznacznie przesunięte. Podobnie jak w biomacie referencyjnej, maksymalną ilość świeżej masy osiągnięto nieco później niż w przypadku suchej masy, co świadczy o zwiększeniu objętości komórek w kulturze po ukończeniu ich intensywnych podziałów (Ryc. 12A, B).

Faza stacjonarna, odpowiadająca w przybliżeniu okresowi od 26 do 30 dnia, była krótka i bardzo słabo zaznaczona, a ponadto szybko przechodziła w etap zamierania. Wygląd biomasy hodowanej w ciemności był taki sam jak tkanki naświetlanej (jasnozółta zawiesina o dużym stopniu homogenności). Wyraźne zmiany nekrotyczne obserwowano, podobnie jak na świetle, począwszy od 32 dnia eksperymentu. Wysoka, maksymalna wartość współczynnika przyrostu dla badanej zawiesiny ($Gi \approx 1300 \%$ – Ryc. 12C) wskazuje na bardzo dobre wykorzystanie pożywki do wzrostu tkanki, w dość krótkim przedziale czasowym, i przy stosunkowo niewielkiej ilości biomasy inokularnej. Zjawisko to jest bardzo korzystne z uwagi na aplikacyjny charakter realizowanego projektu.

Uzyskane wyniki, dotyczące wpływu oświetlenia na wzrost biomasy *C. subternata* w kulturze wytrząsanej, mają również implikacje praktyczne. Pokazano bowiem, że brak światła nie jest czynnikiem ograniczającym wzrost badanej zawiesiny, co jest niezwykle istotne w przypadku kultywacji tkanek roślinnych w bioreaktorach. Jak wskazują dane literaturowe, oświetlenie wnętrza typowych, stalowych fermentorów dużej pojemności jest zarówno energochłonne, jak również problematyczne z technologicznego punktu widzenia (Zhong i wsp., 1993; Kieran i wsp., 1997).



Ryc. 12. Wpływ braku oświetlenia na wzrost kultur zawieszinowych *Cyclopia subternata*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera. Próbkę kontrolną stanowiła zawieszina *C. subternata* rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego. Profile wzrostowe wyrażono jako zmiany ilości świeżej (A) i suchej masy (B) oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi) w cyklu hodowlanym.

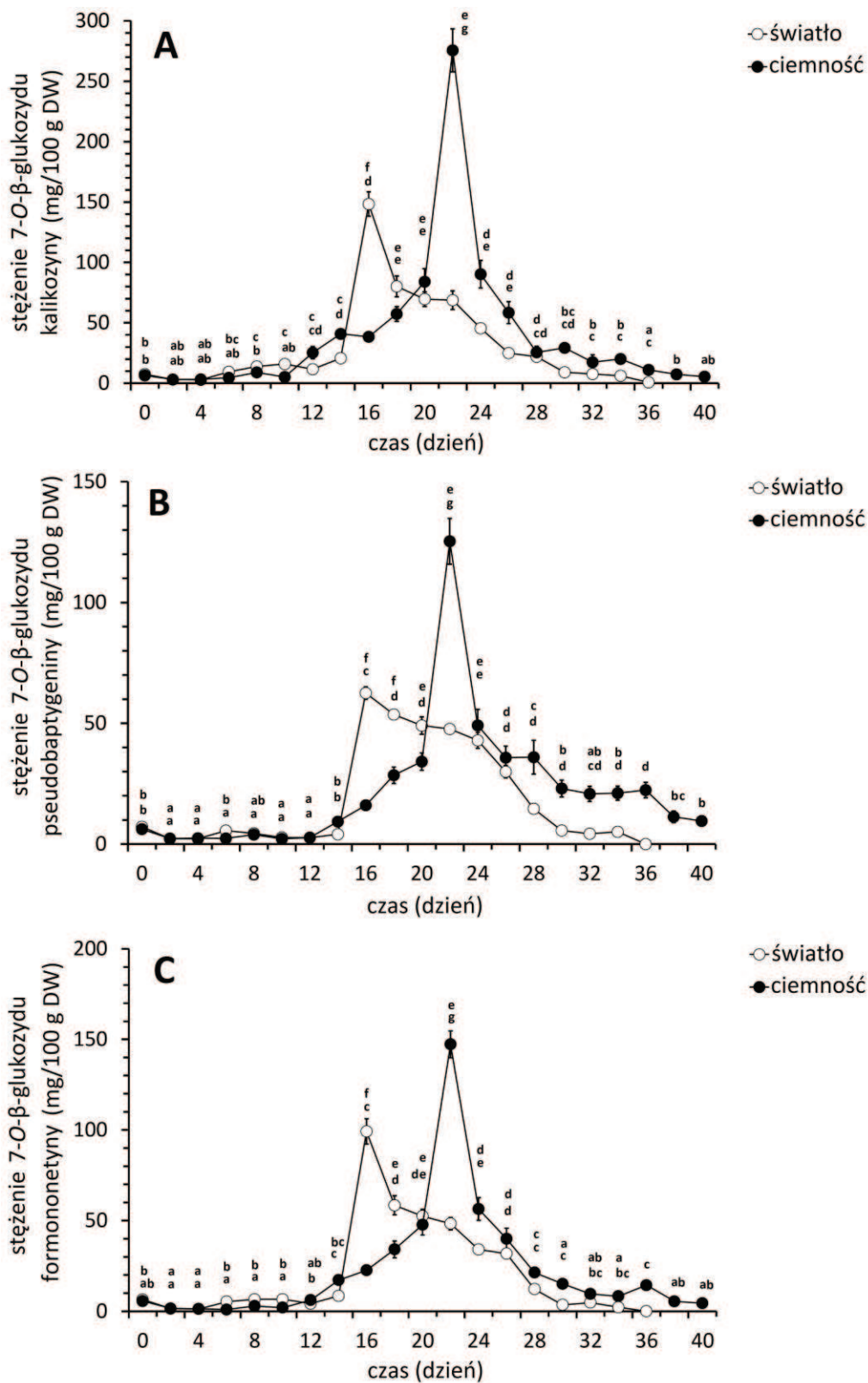
Odmiennymi literami oznaczono istotnie statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litera umieszczona w kolumnach odpowiada, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskanym odpowiednio dla kultur prowadzonych przy, i bez dostępu światła.

II.1.2.2.2.2. Biosynteza związków polifenolowych w wytrząsanych kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata* prowadzonych w warunkach całkowitej ciemności

Analizy HPLC wykazały, że brak oświetlenia nie wywiera jakościowego wpływu na wtórny metabolizm zawiesiny *C. subternata* pod względem akumulacji związków polifenolowych. Podobnie jak kultura prowadzona na świetle, biomasa rosnąca w warunkach pełnego zaciemnienia produkowała trzy wspomniane uprzednio połączenia izoflawonowe (tj. 7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny). Nie stwierdzono w niej również obecności flawanonu hesperydyny. Jakkolwiek skład frakcji polifenolowej z biomas naświetlanych i zaciemnianych był identyczny pod względem jakościowym, to dynamika produkcji analizowanych połączeń była wyraźnie odmienna dla obydwu rodzajów kultur. O ile w przypadku hodowli oświetlonej, w kolejnych dniach eksperymentu obserwowano natychmiastowy wzrost zawartości izoflawonów od niewielkich stężeń do maksimum ich produkcji (dni 14-16), to w kulturach prowadzonych bez dostępu światła odnotowano stopniowe zwiększanie akumulacji wspomnianych połączeń począwszy od 12 do 22 dnia doświadczenia (Ryc. 13).

Tym samym, maksima produkcji poszczególnych izoflawonów, w stosunku do próby kontrolnej (dzień 16-18), były w obrębie fazy wzrostu liniowego przesunięte na dalsze dni cyklu hodowlanego (dzień 22 – Ryc. 13). Co najistotniejsze, zawartości 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny (275,0 mg/100 g DW), pseudobaptygeniny (126,8 mg/100 g DW) oraz formononetyny (145,0 mg/100 g DW) były w ciemności odpowiednio o 86, 68 i 50 % wyższe w stosunku do kultury naświetlanej. Wzrost zawartości badanych izoflawonów, należących do grupy fitoaleksyn/fitoantycypin, w warunkach pełnego zaciemnienia, można wstępnie interpretować jako reakcję obronną biomasy roślinnej na działanie czynnika stresogennego. Wyjaśnienie powyższego fenomenu nie jest jednak możliwe bez przeprowadzenia badań aktywności poszczególnych enzymów szlaku fenylopropanoidowego oraz mediatorów reakcji obronnej (Dixon, 1999). Tego typu doświadczeń nie uwzględniono jednak w pracy z uwagi na profil projektu badawczego. Analiza HPLC podłoży wzrostowych pochodzących z opisywanego etapu doświadczeń nie wykazała w nich obecności izoflawonoidów, podobnie jak to miało miejsce w kulturze referencyjnej. Wydaje się więc, że wewnątrzkomórkowy sposób magazynowania wymienionych połączeń jest cechą specyficzną zawiesiny *C. subternata*, a nie wpływem zmiennych warunków oświetleniowych.

Porównując kultury kalusowe i zawiesinowe prowadzone w ciemności, można dostrzec między nimi podobieństwa z uwagi na opóźnienie, w cyklu wzrostowym, maksymalnej produkcji polifenoli w obydwu kulturach, w stosunku do eksperymentu realizowanego z dostępem światła.



Ryc. 13. Wpływ braku oświetlenia na zawartość 7-O-β-glukozydu kalikozyiny (A), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (B) oraz 7-O-β-glukozydu formononetyny (C) w kulturach zawiesinowych *Cyclopiopsis subternata*. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina *C. subternata* rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego. Odmiernymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litera umieszczona w kolumnach odpowiada, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskanym odpowiednio dla kultur prowadzonych przy, i bez dostępu światła. Brak znacznika oznacza nieobecność związku w badanej biomase.

Kalusy hodowane w warunkach całkowitego zaciemnienia produkowały natomiast mniej izoflawonów niż odpowiednie hodowle wytrząsane, co stanowi istotną zmianę w dynamice biosyntezy badanych związków. Podsumowując wyniki obydwu eksperymentów można więc jednoznacznie stwierdzić, że na profil metaboliczny biomas *C. subternata* można skutecznie wpływać zarówno zmieniając typ hodowli (kultura stacjonarna lub wytrząsana), jak i warunki oświetleniowe. W rezultacie, prowadząc kulturę zawiesinową bez dostępu światła osiągnięto rezultat roślinnego systemu *in vitro* produkującego, w przeciwieństwie do hodowli naświetlanej, znaczne stężenie izoflawonów uzyskując jednocześnie, w tym samym przedziale czasowym, najlepsze parametry wzrostowe biomasy. Zaproponowana procedura jest więc niezwykle korzystna z technologicznego punktu widzenia.

II.1.2.2.2.3. Wpływ dokarmiania zawiesin *Cyclopia subternata* prekursorem biosyntezy oraz złożonymi substancjami odżywczo-regulatorowymi na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych

Suplementacja pożywek wzrostowych prekursorami biosyntezy, bądź mieszaninami substancji o charakterze odżywczym należy, poza elicytacją, do najczęściej stosowanych, tradycyjnych (niegenetycznych) strategii zwiększania produktywności roślinnych kultur *in vitro*. Korzystny wpływ wymienionych wyżej składników podłoży może przejawiać się zarówno stymulowaniem metabolizmu pierwotnego (wzrost biomasy), jak i podwyższeniem zawartości wybranych metabolitów wtórnych (Łuczkiwicz, 2008; Smetanska, 2008). Spośród stosowanych w pracach biotechnologicznych mieszanin substancji odżywczych wymienić należy hydrolizat kazeiny, stanowiący bogate źródło aminokwasów (Smetanska, 2008), wodę i mleko kokosowe, dostarczające węglowodanów oraz roślinnych regulatorów wzrostu (Yong i wsp., 2009), a także rzadziej stosowane proszki bananowy i pomidorowy (Łuczkiwicz i Cisowski, 2001). Dane literaturowe wskazują na pozytywne efekty wzbogacania podłoży w powyższe składniki, manifestujące się lepszym wzrostem tkanek oraz wzmożoną akumulacją szeregu wtórnych metabolitów, w tym izoflawonów, co odnotowano m.in. w przypadku wielu roślin z rodziny Fabaceae (Li i Zhang, 2006; Łuczkiwicz, 2008; Shinde i wsp., 2009b; Lucchesini i wsp., 2010). W ramach badań prezentowanych w niniejszej pracy, zdecydowano się na suplementację kultur zawiesinowych *C. subternata* hydrolizatem kazeiny oraz wodą kokosową, w ilościach mieszczących się w zakresie stężeń powszechnie stosowanych w pracach biotechnologicznych (odpowiednio 100,0 mg l⁻¹ i 5,0 % v/v) (Łuczkiwicz i Cisowski, 2001). Wspomniane substancje dodawano w 16 dniu eksperymentu, odpowiadającemu osiągnięciu w biomasie maksymalnych stężeń połączeń izoflawonoidowych (rozd. II.1.2.2.1.2. – Ryc. 11) oraz wystąpieniu intensywnych podziałów komórkowych (faza wzrostu liniowego). Wybór momentu dokarmiania uzasadniony był obserwowanym, po 16 dniu doświadczenia, gwałtownym spadkiem zawartości analizowanych związków w zawieszynie miodokrzewu kultywowanej przy dostępie światła. Zgodnie z danymi

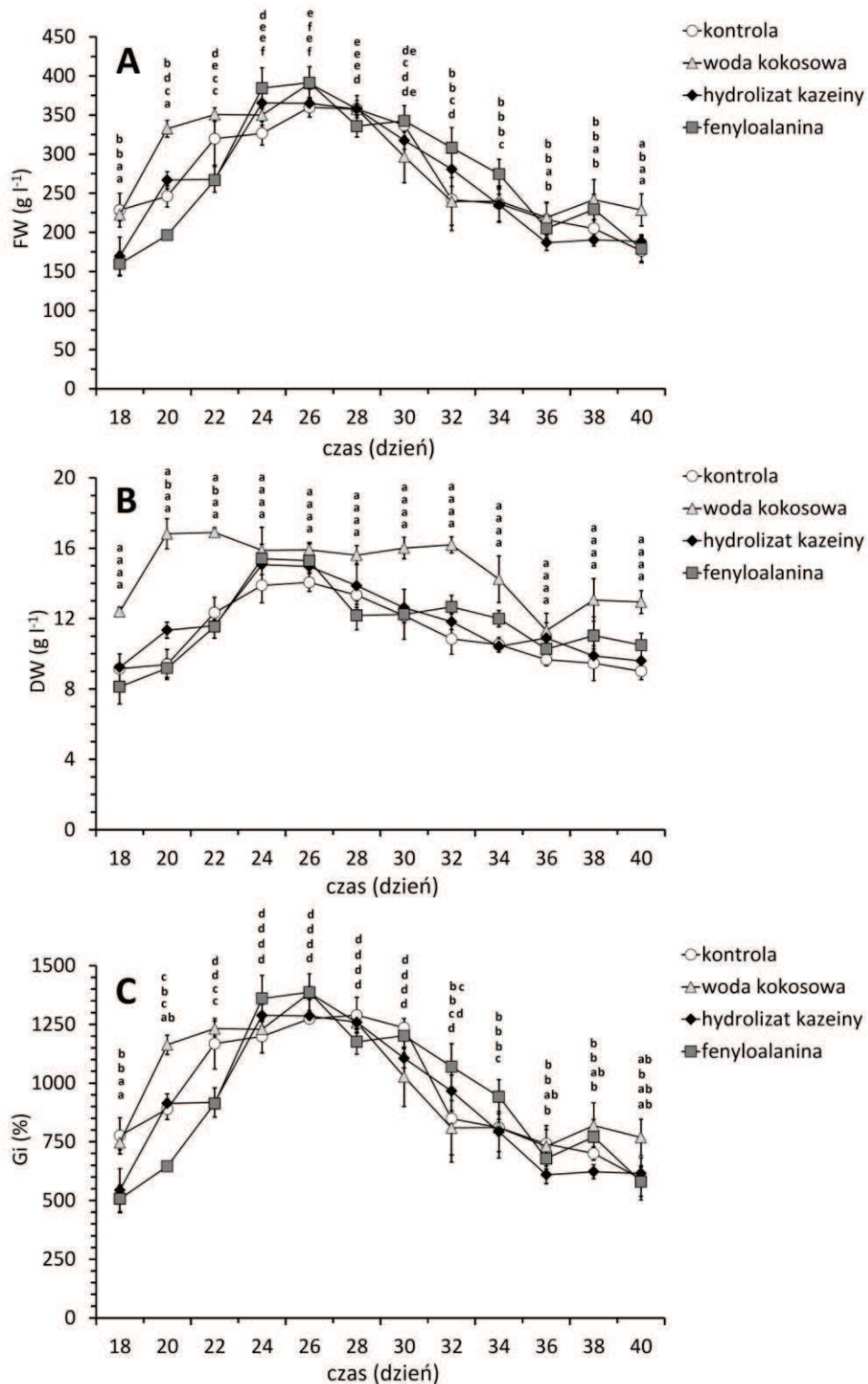
literaturowymi, jedną z przyczyn powyższego zjawiska mogło być szybkie zużycie dostępnych węglowodanów przez rosnącą biomasę, skutkujące spożytkowaniem przez nią również reszt cukrowych, dostępnych w postaci glukozydów flawonoidowych, dla celów metabolizmu pierwotnego (Gueven i Knorr, 2011). Z uwagi na powyższe spodziewano się, że suplementacja pożywki substancjami odżywczymi może zapobiec obserwowanemu obniżeniu zawartości 7-O- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny w badanych tkankach.

Oprócz opisanych schematów dokarmiania, uwzględniających dodatek do podłoża zespołów związków o charakterze odżywczym, w doświadczeniach wykorzystano również L-feniloalaninę, stanowiącą daleki prekursor metabolitów szlaku fenylopropanoidowego (Dixon, 1999; Ehltling i wsp., 2006). Wspomniany aminokwas, wprowadzony do pożywki wzrostowej, może podlegać biotransformacji do szeregu związków polifenolowych, w tym izoflawonów (Dixon, 1999; Łuczkiwicz, 2008) oraz ksantonów (Ehltling i wsp., 2006). Z tego względu, uznano za celowe określenie wpływu powyższego prekursora na akumulację glukozydów izoflawonoidów, a także zbadanie, czy suplementacja kultury zawiesinowej *C. subternata* feniloalaniną może spowodować wyraźne zmiany w obrębie metabolizmu ksantonów, nie stwierdzonych do tej pory w biomasach parenchymatycznych wspomnianego gatunku (rozdz. II.1.1.4., II.1.2.1. i II.1.2.2.2.1.2.). L-feniloalaninę dodawano do pożywki wzrostowej w ilości 100,0 mg l⁻¹, dobranej na podstawie danych literaturowych (Łuczkiwicz i Cisowski, 2001), w 16 dniu doświadczenia, podobnie jak to miało miejsce w przypadku pozostałych schematów dokarmiania. Próbę odniesienia dla uzyskanych wyników stanowiła biomasa zawiesinowa rosnąca w warunkach pełnego oświetlenia.

II.1.2.2.2.3.1. Wzrost kultur zawiesinowych *Cyclopia subternata* suplementowanych prekursorem biosyntezy oraz złożonymi substancjami odżywczo-regulatorowymi

Analiza profilów wzrostowych wykreślonych na podstawie zmian ilości świeżej (FW) i suchej masy (DW) oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi) w cyklu hodowlanym zawiesiny *C. subternata* wykazała, że suplementacja pożywki eksperymentalnej wodą kokosową wywarła największy wpływ na wymienione wyżej parametry. W przypadku pozostałych schematów dokarmiania, przebiegi krzywych zmian FW, DW i Gi były zbliżone do kultury referencyjnej (Ryc. 14A-C).

Dodatek wody kokosowej spowodował zauważalne przyspieszenie wzrostu biomasy parenchymatycznej *C. subternata* (Ryc. 14A-C). W rezultacie, badana kultura osiągnęła fazę stacjonarną już w dniu 20, w przeciwieństwie do hodowli kontrolnej, charakteryzującej się wzrostem liniowym aż do 26 dnia doświadczenia. Maksymalna ilość świeżej masy (≈ 390 g l⁻¹ w dniu 26) była w omawianym przypadku nieznacznie wyższa od próby referencyjnej (≈ 360 g l⁻¹). Opisana zmiana nie była jednak istotna statystycznie (Ryc. 14).



Ryc. 14. Wpływ dodatku wody kokosowej (5,0 % v/v), hydrolizatu kazeiny (100,0 mg l⁻¹) oraz fenyloalaniny (100,0 mg l⁻¹), w 16 dniu eksperymentu, na wzrost kultur zawiesinowych *C. subternata* prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Profile wzrostowe wyrażono jako zmiany ilości świeżej (A) i suchej masy (B) oraz wartości współczynnika przyrostu (C) w cyklu hodowlanym. Próbę kontrolną stanowiła niedokarmiona zawiesina *C. subternata*, rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego.

Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litery umieszczone w kolumnach odpowiadają, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskanym odpowiednio dla próby kontrolnej, dodatku wody kokosowej, hydrolizatu kazeiny oraz fenyloalaniny.

Wyraźniejsze efekty suplementacji pożywki wodą kokosową odnotowano w przypadku oznaczania suchej masy zawiesiny, której maksymalna ilość, oscylująca wokół 16 g l^{-1} , utrzymywała się na względnie równym poziomie w okresie od 20 do 32 dnia eksperymentu, rozpatrywanym jako znacznie wydłużona faza stacjonarna (Ryc. 14B). Powyższa wartość była wyraźnie wyższa od ilości DW w kulturze niedokarmianej (80, 15 i 45 % wzrost suchej masy odpowiednio dla 20, 26 i 32 dnia cyklu wzrostowego zawiesiny dokarmianej).

Dokarmianie kultur zawiesinowych *C. subternata* hydrolizatem kazeiny lub fenyloalaniną nie spowodowało wyraźnych zmian w profilach wzrostowych badanej biomasy. W obydwu przypadkach, przebieg krzywych FW i DW był zbliżony do próby odniesienia. Jakkolwiek maksymalne ilości świeżej i suchej masy były nieznacznie wyższe niż w próbie kontrolnej (około 10 % wzrost dla dnia 26), to nie zaobserwowano tu charakterystycznego, dla dokarmiania wodą kokosową, wydłużenia fazy stacjonarnej (Ryc. 14).

Suplementacja pożywki substancjami odżywczymi oraz fenyloalaniną nie wywierała zauważalnego wpływu na morfologię kultywowanych biomas. Wszystkie kultury zawiesinowe *C. subternata* poddane dokarmianiu były w tym względzie identyczne z biomasą referencyjną, charakteryzując się wysokim stopniem homogenności i jasnożółtym zabarwieniem. Jediną różnicę stanowiła większa żywotność tkanki rosnącej z dodatkiem wody kokosowej, nie wykazywała ona bowiem zmian nekrotycznych aż do 34 dnia doświadczenia. W przypadku kultury referencyjnej, jak również pozostałych schematów dokarmiania, początek fazy zamierania przypadał na 32 dzień eksperymentu.

Podsumowując, przeprowadzony cykl doświadczeń wykazał, że efekty dokarmiania zawiesiny *C. subternata*, obserwowane jako określony przyrost tkanek, są silnie uzależnione od charakteru użytych substancji suplementujących. W omawianym przypadku, wyraźnie pozytywny rezultat uzyskano jedynie po dodaniu do podłoża wody kokosowej, stanowiącej przede wszystkim bogate źródło, niezbędnych do wzrostu tkanek roślinnych, węglowodanów. Zgodnie z danymi literaturowymi, zawartość cukrów w opisywanej mieszance stanowi ok. 2,5-5,0 % w/w (Yong i wsp., 2009). Uwzględniając powyższe dane, 5,0 % v/v dodatek wody kokosowej odpowiadał wzbogaceniu pożywki wzrostowej w węglowodany w ilości ok. $2500\text{-}5000 \text{ mg l}^{-1}$. Pewien udział w stymulowaniu wzrostu biomasy mogły mieć pozostałe składniki wody kokosowej, takie jak proteiny, sole mineralne i roślinne regulatory wzrostu (Yong i wsp., 2009). W przeciwieństwie do suplementacji podłoża mieszaniną z dominującym udziałem węglowodanów (woda kokosowa), dokarmianie zawiesiny *C. subternata* hydrolizatem kazeiny bądź fenyloalaniną powodowało tylko nieznaczną poprawę parametrów wzrostowych, co sugeruje, że niniejsze substancje nie zostały wykorzystane w przypadku kultury wytrząsanej miodokrzewu, do syntezy podstawowej biomasy roślinnej.

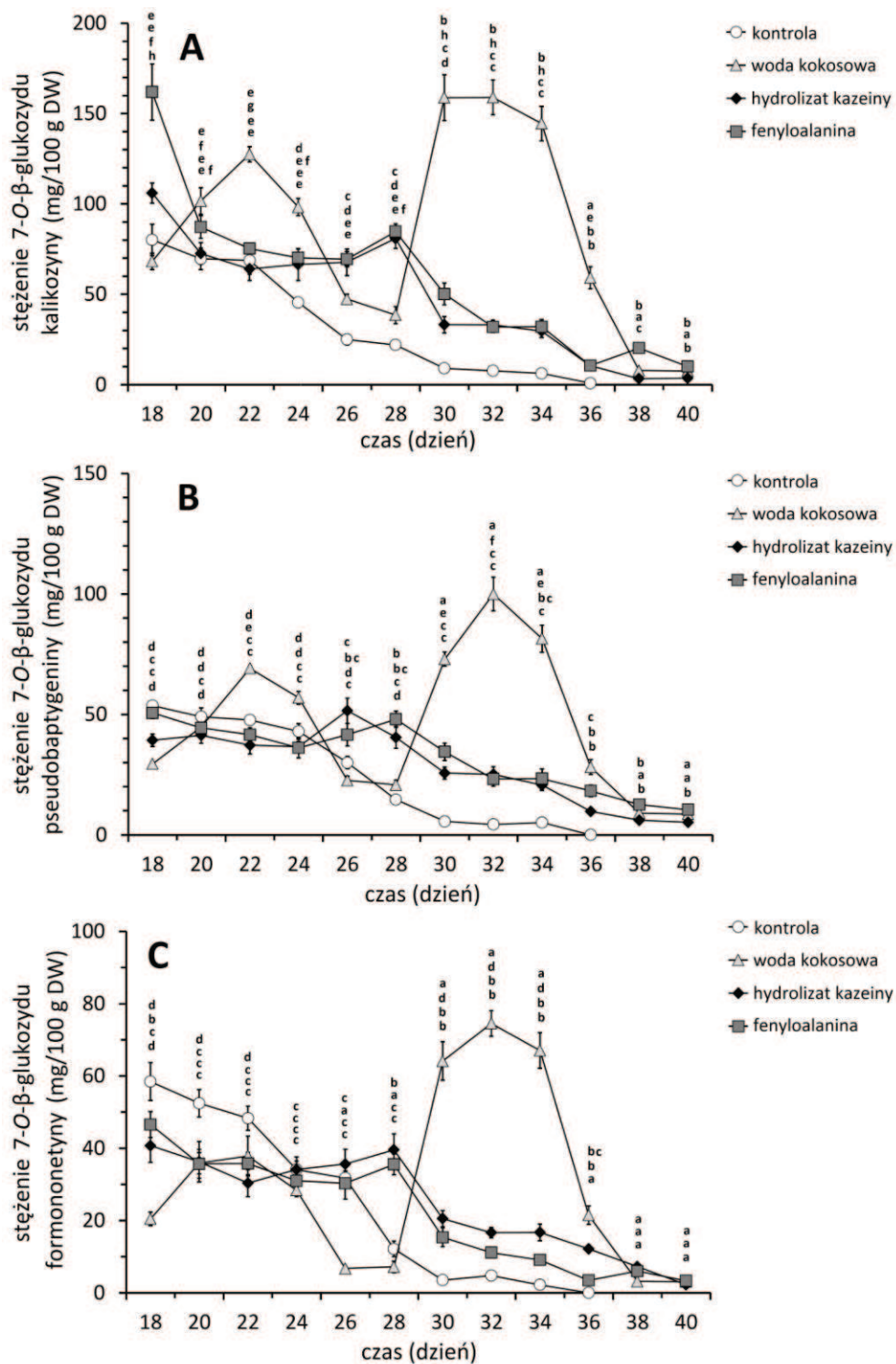
II.1.2.2.3.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych *Cyclopia subternata* suplementowanych prekursorem biosyntezy oraz złożonymi substancjami odżywczo-regulatorowymi

Jak przedstawiono na Ryc. 15, suplementacja pożywki wzrostowej mieszaninami o charakterze odżywczym (woda kokosowa i hydrolizat kazeiny), bądź prekursorem biosyntezy (fenyloalanina), wywierała istotny wpływ na poziom akumulacji połączeń izoflawonoidowych w zawieszinie *C. subternata*. Należy przy tym zaznaczyć, że obserwowane zmiany miały charakter wyłącznie ilościowy. Analizy HPLC nie wykazały różnic w składzie frakcji polifenolowych pomiędzy kulturą referencyjną a biomasami dokarmianymi wymienionymi wyżej składnikami. W szczególności nie stwierdzono dodatkowej obecności w badanych zawieszinach ksantonów (tj. mangiferyny i izomangiferyny), flawanonu hesperydyny oraz aglikonów odpowiadających oznaczanym połączeniom o charakterze glukozydów izoflawonowych (tj. kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny). Biomasy poddane procedurze dokarmiania, podobnie jak tkanka referencyjna, akumulowały charakterystyczny dla hodowli *in vitro* *C. subternata* 3 składnikowy zespół 7-O- β -glukozydowych pochodnych wymienionych wyżej aglikonów (Ryc. 15).

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu stwierdzono, że wpływ konkretnego modelu dokarmiania na biosyntezę izoflawonów był identyczny dla wszystkich występujących w zawieszinie związków. Ponadto, niezależnie od zastosowanej strategii hodowlanej, zebrane w toku eksperymentu pożywki wzrostowe nie zawierały żadnego z poszukiwanych połączeń, co potwierdziło wyłącznie wewnątrzkomórkowy mechanizm magazynowania izoflawonów w biomasach parenchymatycznych *C. subternata*.

Najwyraźniej zaznaczony wpływ strategii dokarmiania na biosyntezę polifenoli w zawieszinie miodokrzewu odnotowano w przypadku suplementacji pożywki wzrostowej wodą kokosową. Stwierdzono, że dodatek wspomnianej substancji spowodował wystąpienie w profilu biosyntezy izoflawonów dwóch dodatkowych maksimum ich produkcji, przypadających odpowiednio na początek (22 dzień) i koniec (32 dzień) fazy stacjonarnej. Co ciekawe, okres pomiędzy 22 a 32 dniem charakteryzował się fluktuacją stężeń analizowanych polifenoli, wyrażającą się następującymi po sobie spadkami i wzrostem zawartości wszystkich izoflawonów. Jak już wcześniej wspomniano, obniżeniu stężeń poszczególnych glukozydów izoflawonowych w matrycach roślinnych nie towarzyszyło jednoczesne pojawienie się odpowiednich aglikonów bądź ich wydzielanie do pożywki wzrostowej.

Z uwagi na powyższe, wyjaśnienie mechanizmu opisanych, na skutek dodatku wody kokosowej, zmian poziomów akumulacji izoflawonów w cyklu wzrostowym, jakkolwiek interesujące z punktu widzenia fizjologii badanej biomasy, okazało się niemożliwe bez przeprowadzenia dodatkowych badań nie wchodzących w zakres niniejszej pracy, w tym określenia aktywności enzymów szlaku fenylopropanoidowego, ekspresji odpowiadających im genów i stosowania znakowanych radioizotopowo prekursorów.



Ryc. 15. Wpływ dodatku wody kokosowej (5,0 % v/v), hydrolizatu kazeiny (100,0 mg l⁻¹) oraz fenyloalaniny (100,0 mg l⁻¹), w 16 dniu eksperymentu, na zawartość 7-O-β-glukozydu kalikozyny (A), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (B) oraz 7-O-β-glukozydu formononetyny (C) w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata* prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Próbę kontrolną stanowiła niedokarmiana zawiesina *C. subternata* rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego.

Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litera umieszczona w kolumnach odpowiada, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskanych odpowiednio dla próby kontrolnej, dodatku wody kokosowej, hydrolizatu kazeiny oraz fenyloalaniny. Brak znacznika oznacza nieobecność związku w badanej biomase.

Z praktycznego punktu widzenia, istotnym rezultatem eksperymentu było przesunięcie maksimum produkcji izoflawonów w kierunku końca fazy stacjonarnej (dzień 32). Jakkolwiek maksymalne stężenia 7-*O*- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny (odpowiednio ok. 160, 100 i 80 mg/100 g DW, Ryc. 15) były w przypadku opisywanego doświadczenia zbliżone do kultury referencyjnej (odpowiednio ok. 150, 60 i 100 mg/100 g DW w dniu 16, Ryc. 15), to zbiór surowca w 32 dniu wzrostu jest zdecydowanie bardziej korzystny ze względu na znacznie większą ilość suchej masy uzyskanej z systemu roślinnego (ok. 2-krotny wzrost w porównaniu z dniem 16 hodowli kontrolnej – Ryc. 10 i 15).

W przeciwieństwie do dokarmiania zawiesiny *C. subternata* wodą kokosową, suplementacja pożywki wzrostowej hydrolizatem kazeiny oraz fenyloalaniną nie spowodowała znaczącego podwyższenia zawartości badanych izoflawonów. W tym przypadku, w profilu produkcyjnym biomasy obserwowano, po pierwszym maksimum akumulacji badanych związków (dzień 16), stopniowy spadek ich stężenia (dzień 20). W dalszych dniach hodowli zawartość izoflawonów ciągle rosła aż do dnia 28, w którym stwierdzono słabo zaznaczone, drugie maksimum ich biosyntezy (zawartości 7-*O*- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny odpowiednio na poziomach ok. 80, 50 i 40 mg/100 g DW). W tym samym czasie, w biomacie referencyjnej obserwowano już wyraźne obniżenie ilości powyższych metabolitów (Ryc. 15A-C).

Ogólnie, w przypadku dokarmiania zawiesiny miodokrzewu fenyloalaniną lub hydrolizatem kazeiny, poziomy akumulacji poszczególnych izoflawonów były wyraźnie niższe niż w przypadku dodatku wody kokosowej. Rezultaty eksperymentów wskazują tym samym na większą skuteczność strategii retrobiosyntetycznych obejmujących dokarmianie kultury wytrząsanej *C. subternata* mieszaninami odżywczymi bogatymi w węglowodany, niż zespołami aminokwasów lub dalekim prekursorem biosyntezy badanych związków. Wydaje się, że w testowanej zawieszynie nie doszło do wbudowania egzogenne podanych aminokwasów w szlaki przemian biogennych, wiodących do syntezy izoflawonów.

Podsumowując, próby uzyskania zwiększonej produkcji wybranych polifenoli w zawieszynie *C. subternata* na drodze dokarmiania kultury substancjami odżywczymi lub prekursorem biosyntezy badanych związków wykazały stosunkowo niską efektywność niniejszej strategii hodowlanej. Jedynie suplementacja pożywek wzrostowych wodą kokosową może być uzasadniona z uwagi na możliwość komercyjnego wykorzystania wymienionej procedury w procesie biotechnologicznego pozyskiwania związków polifenolowych w oparciu o kultury zawiesinowe powyższego gatunku.

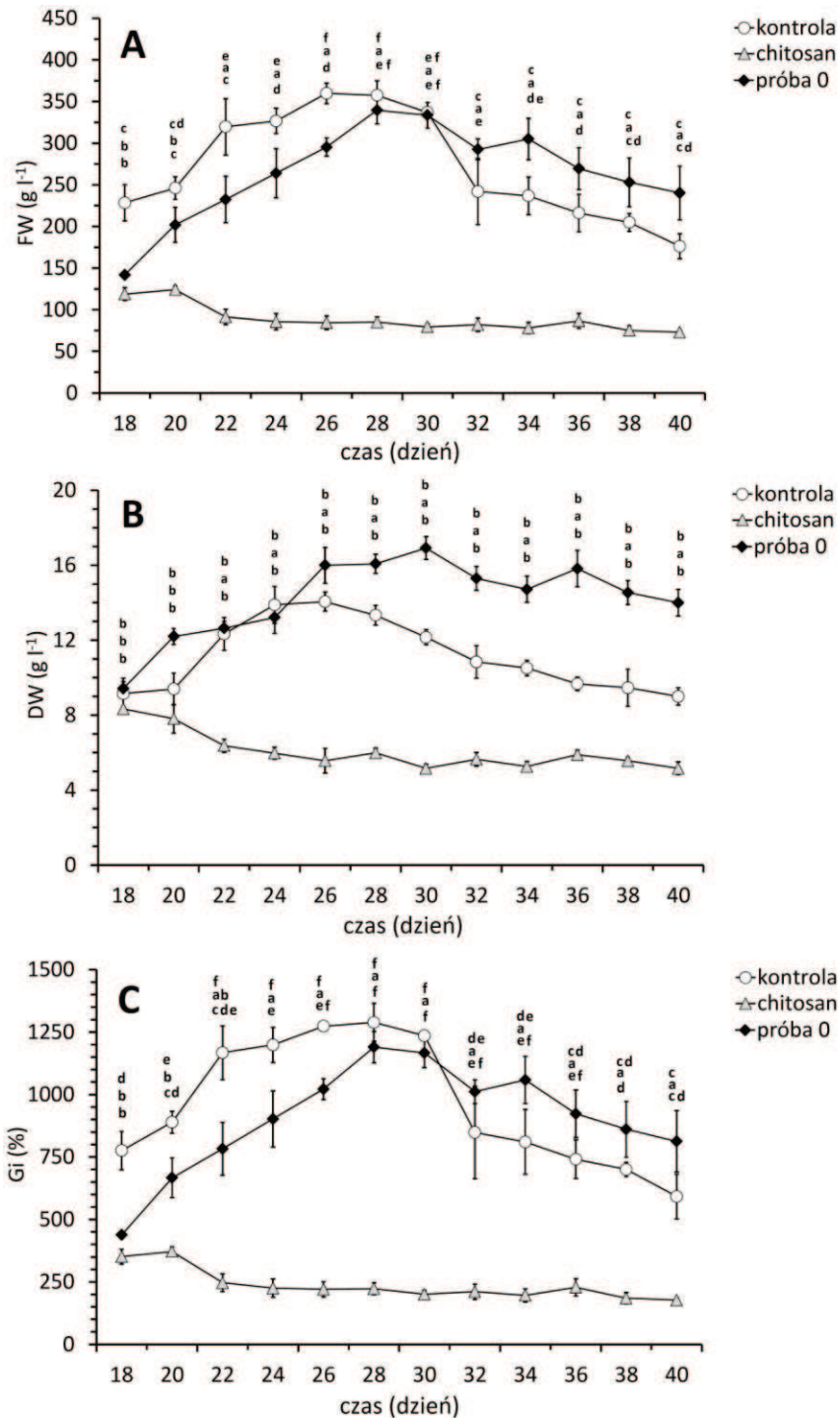
II.1.2.2.2.4. Wpływ elicytacji na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata*

Szereg metabolitów o budowie izoflawonoidowej należy do połączeń o charakterze fitoaleksyn lub fitoantycypin, tzn. substancji wytwarzanych przez roślinę w

odpowiedzi na działanie czynników stresowych, takich jak atak patogenów, szok temperaturowy bądź promieniowanie ultrafioletowe. Z uwagi na powyższe, możliwe jest wywołanie, w warunkach kultur *in vitro*, reakcji obronnej, skutkującej wzrostem zawartości niniejszych związków, ich rozpadem hydrolitycznym bądź zmianą profilu magazynowania. Stosowane w tym celu substancje, określane mianem elicytorów, mogą być wykorzystane do zwiększenia produktywności biomas *in vitro* pod względem wybranych metabolitów wtórnych, bądź wywołania zjawisk korzystnych z technologicznego punktu widzenia, np. wydzielania połączeń polifenolowych do podłoża wzrostowego (Dixon, 1999; Łuczkiwicz, 2008). Z uwagi na fakt, że dominującymi składnikami kultur zawiesinowych *C. subternata* były właśnie izoflawony, postanowiono określić wpływ elicytacji na akumulację wspomnianych związków w hodowlach wytrząsanych powyższego gatunku. Do doświadczeń wybrano dwie modelowe substancje, stosowane najczęściej w czasie eksperymentów z wykorzystaniem kultur *in vitro* roślin wyższych: chitosan oraz jasmonian metylu, zaliczane odpowiednio do elicytorów biotycznych oraz abiotycznych (Dörnenburg i Knorr, 1995; Łuczkiwicz, 2008; Matkowski, 2008; Smetanska, 2008). Stężenia powyższych związków dobierano w oparciu o dane literaturowe, a także doświadczenie własne związane z prowadzeniem kultur *in vitro* roślin z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz, 2006; Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2012). Ze względu na konieczność rozpuszczenia elicytorów w dedykowanych dla nich rozpuszczalnikach organicznych (alkohol etylowy lub lodowaty kwas octowy, rozdz. III.1.6.2.4.), wyniki przeprowadzonych doświadczeń odnoszono zarówno do próby 0 (kultura zawiesinowa prowadzona jedynie z dodatkiem odpowiedniego rozpuszczalnika), jak i podstawowej kultury zawiesinowej (kontrola). Podobnie jak w przypadku opisanych uprzednio eksperymentów, obejmujących dokarmianie zawiesiny *C. subternata* substancjami odżywczymi, elicytory dodawano do podłoża wzrostowego w 16 dniu doświadczenia, tożsamym z maksymalną akumulacją izoflawonów w systemie hodowlanym. Po uprzedniej ocenie morfologicznej oraz wyznaczeniu parametrów wzrostowych, biomasy pochodzące z kolejnych dni eksperymentu, a także odpowiadające im próbki pożywek, poddano analizie fitochemicznej pod względem zawartości związków polifenolowych.

II.1.2.2.4.1. Wzrost biomasy w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata* elicytowanych za pomocą chitosanu

Jak przedstawiono na Ryc. 16, dodatek chitosanu, w 16 dniu doświadczenia, spowodował zahamowanie przyrostu, a następnie szybkie zamieranie kultury zawiesinowej *C. subternata*. W wyniku suplementacji pożywki powyższym elicytorem, ilości świeżej i suchej masy tkankowej sukcesywnie spadały, osiągając w dniu 26 (maksimum przyrostu dla podstawowej kultury zawiesinowej) wartości odpowiednio ok. 80 i 6 g l⁻¹. W porównaniu do próby kontrolnej, uzyskano więc ok. 4,5-krotne zmniejszenie ilości FW oraz 2,5-krotne obniżenie zawartości DW (Ryc. 16A, B).



Ryc. 16. Wpływ dodatku chitosanu ($150,0 \text{ mg l}^{-1}$), w 16 dniu eksperymentu, na wzrost kultur zawiesinowych *Cyclops subternata* prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina *C. subternata* rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego bez dodatku elicytora, zaś próbę 0 kultura zawiesinowa z dodatkiem kwasu octowego (rozpuszczalnik dla chitosanu) zobojętnionego przy użyciu roztworu NaOH. Profile wzrostowe wyrażono jako zmiany ilości świeżej (A) i suchej masy (B) oraz wartości współczynnika przyrostu (C) w cyklu hodowlanym.

Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litera umieszczona w kolumnach odpowiada, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskanym odpowiednio dla próby kontrolnej, dodatku chitosanu oraz próby 0.

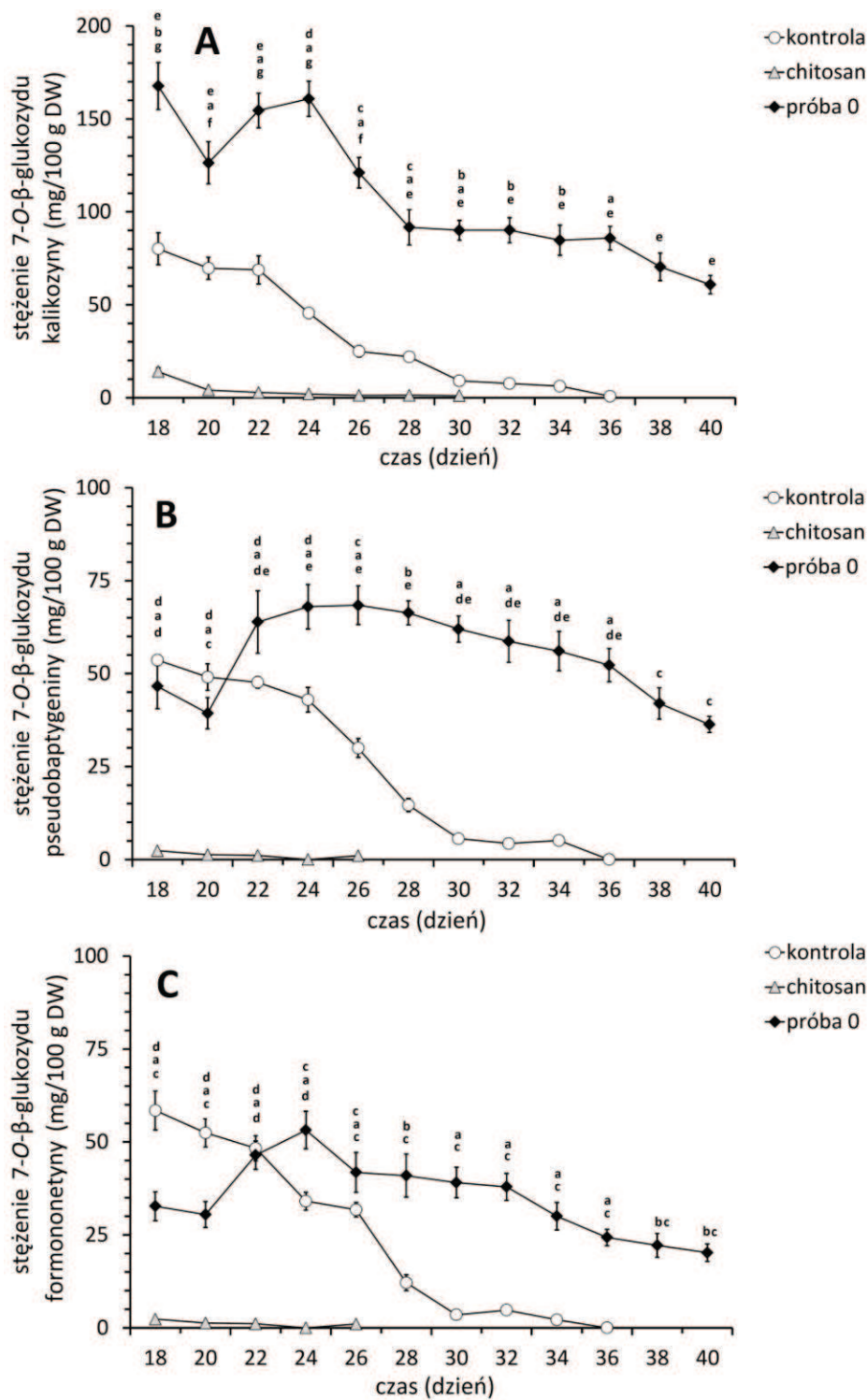
Wspomniane, niskie wartości powyższych parametrów wzrostowych utrzymywały się następnie aż do końca trwania eksperymentu, co świadczy o permanentnym zahamowaniu wzrostu zawiesiny. Opisanym wyżej zjawiskom towarzyszyły silne zmiany nekrotyczne badanej tkanki, przejawiające się brunatnieniem i spadkiem uwodnienia komórek. Były one zauważalne już w okresie 48 godzin od momentu elicytacji, maksymalne nasilenie osiągnęły zaś w 24 dniu cyklu wzrostowego. Na tej podstawie można więc wnioskować, że dodatek do medium hodowlanego chitosanu spowodował, w okresie zaledwie kilku dni, całkowite zamarcie kultury. Świadczy to o bardzo dużej wrażliwości badanej biomasy na wspomniany czynnik, ograniczającej możliwości jego praktycznego wykorzystania w toku prowadzonych badań. Należy przy tym zaznaczyć, że niekorzystny wpływ elicytacji na wzrost biomas parenchymatycznych stwierdzono także podczas wcześniejszych eksperymentów z wykorzystaniem kultur *in vitro* wybranych roślin wyższych, w tym krzewów z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz, 2006, 2008; Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2012).

Wyniki doświadczenia pokazały jednoznacznie, że obserwowane zahamowanie wzrostu zawiesiny *C. subternata* jest związane z obecnością w pożywce chitosanu, nie zaś towarzyszącego mu rozpuszczalnika (kwas octowy, zobojętniony po rozpuszczeniu chitosanu za pomocą wodorotlenku sodu, rozdz. III.1.6.2.4.). Eksperyment wykonany w analogiczny sposób bez dodatku elicytora (Ryc. 16) wykazał pozytywny wpływ octanu sodu na wzrost biomasy w ostatnich dwóch tygodniach hodowli. Efekt ten jest szczególnie zauważalny na krzywej przyrostu wykreślonej na podstawie zmian DW (Ryc. 16B). Jakkolwiek powyższa substancja stosowana jest w większości przypadków jako elicytor (Donnez i wsp., 2009), bądź prekursor wybranych metabolitów szlaku fenylopropanoidowego (Ouyang i wsp., 2005b), niewykluczone jest wykorzystanie octanu sodu, przez badaną biomasę, w szlakach metabolizmu pierwotnego (Dixon, 1999; Ehlting i wsp., 2006).

W opisywanym doświadczeniu, maksymalna ilość suchej masy wyniosła dla próby 0 (stanowiącej *de facto* kulturę suplementowaną octanem sodu) ok. 17 g l⁻¹ w dniu 30. Powyższa wartość jest ok. 20 % wyższa w porównaniu z zawiesiną kontrolną, w przypadku której największa wartość DW wyniosła ok. 14 g l⁻¹. Zawiesina *C. subternata* kultywowana w obecności octanu sodu charakteryzowała się również profilem wzrostowym o przedłużonej fazie stacjonarnej (Ryc. 16A-C).

II.1.2.2.2.4.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata* elicytowanych za pomocą chitosanu

Analiza wyciągów uzyskanych z biomas parenchymatycznych *C. subternata* poddanych działaniu chitosanu w dniu 16 wykazała, że suplementacja pożywki powyższym elicytorem powoduje praktycznie całkowity zanik połączeń izoflawonoidowych w zawieszynie. Gwałtowny spadek zawartości 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny (< 20 mg/100 g DW) odnotowano już w 18 dniu eksperymentu, tj. 48 godzin od momentu elicytacji (Ryc. 17A-C).



Ryc. 17. Wpływ dodatku chitosanu ($150,0 \text{ mg l}^{-1}$), w 16 dniu eksperymentu, na zawartość 7-O- β -glukozydu kalikozyny (A), 7-O- β -glukozydu pseudobaptigeniny (B) oraz 7-O- β -glukozydu formononetyny (C), w kulturach zawiesinowych *CyclopiA subternata*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina *C. subternata* rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego bez dodatku elicytora, zaś próbę 0 kultura zawiesinowa z dodatkiem kwasu octowego (rozpuszczalnik dla chitosanu) zobojętnionego przy użyciu roztworu NaOH. Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litera umieszczona w kolumnach odpowiada, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskanym odpowiednio dla próby kontrolnej, dodatku chitosanu oraz próby 0. Brak znacznika oznacza nieobecność związku w badanej biomacie.

Stężenia poszczególnych metabolitów utrzymywały się następnie na minimalnym poziomie przez 8-12 kolejnych dni. Po dniu 30 nie stwierdzono metodą HPLC obecności w kulturze miodokrzewu żadnego z badanych związków. W omawianym przedziale czasowym nie odnotowano też wzrostu stężeń izoflawonów w podłożach wzrostowych, jak również hydrolitycznego rozpadu wspomnianych metabolitów, manifestującego się pojawieniem się w kulturze odpowiednich aglikonów, tj. fitoaleksyn aktywowanych w procesie odpowiedzi obronnej na czynnik stresowy. Z uwagi na powyższe można wnioskować, że obserwowany spadek zawartości polifenoli w biomasach *C. subternata* związany jest wyłącznie z gwałtownym zamieraniem komórek zawiesiny, nie zaś z hydrolizą fitoantycypin bądź ze zmianą sposobu magazynowania wspomnianych połączeń, na skutek tradycyjnie rozumianej elicytacji.

W przeciwieństwie do suplementacji chitosanem, dodatek do pożywki jedynie rozpuszczalnika niniejszej substancji (próba 0, kwas octowy zubożony przy użyciu wodorotlenku sodu, odpowiadający, po wprowadzeniu do kultury, stężeniu jonów octanowych równemu ok. 5000 μM) spowodował zauważalny wzrost zawartości 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny w zawieszynie. Po początkowym spadku, w dniach 18 i 20, stężenia powyższych metabolitów ciągle rosły osiągając, w dniu 24, maksymalne wartości wynoszące odpowiednio ok. 160, 70 i 50 mg/100 g DW (Ryc. 17A-C).

Najwyraźniej zaznaczony efekt suplementacji zawiesiny jonami octanowymi odnotowano w przypadku 7-O- β -glukozydu kalikozyny (ok. 3-krotne podwyższenie stężenia związku w dniu 24), słabszy natomiast dla pozostałych 2 metabolitów (ok. 1,5-krotny wzrost ich zawartości). W kolejnych dniach eksperymentu, stężenia izoflawonów ulegały stopniowemu obniżeniu, utrzymując się jednak ciągle na poziomie wyższym w porównaniu z podstawową kulturą zawieszinową. Niestety, obserwowany od 24 do 28 dnia, spadek zawartości badanych połączeń w biomasie (z wyjątkiem 7-O- β -glukozydu pseudobaptygeniny) jest niekorzystny z technologicznego punktu widzenia. Poprzedza on bowiem osiągnięcie maksymalnego przyrostu zawiesiny w dniu 30. Z uwagi na powyższe, niemożliwe jest pełne wykorzystanie potencjału badanej biomasy (w rozumieniu jej produktywności tj. ilości związku pozyskiwanej z 1 l kultury w ciągu 1 dnia), elicytowanej kwasem octowym, w celach komercyjnych.

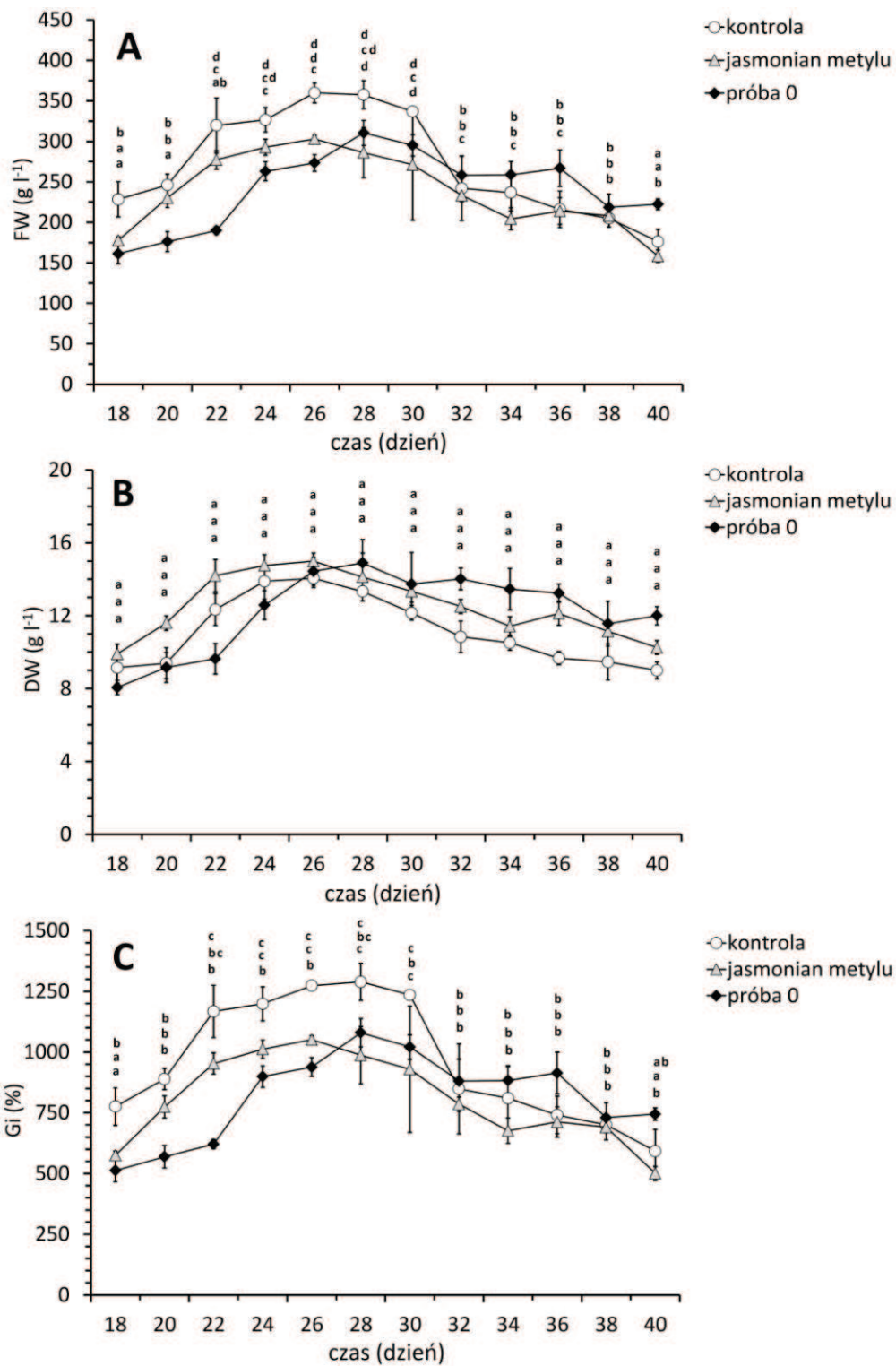
Wzrost zawartości polifenoli w zawieszynie *C. subternata*, rosnącej z dodatkiem kwasu octowego zubożonego przy użyciu wodorotlenku sodu, stanowi potwierdzenie wcześniejszych doniesień literaturowych dotyczących wykorzystania wspomnianej substancji w roślinnych kulturach *in vitro*. Wykazano m.in. korzystny wpływ jonów octanowych na poziom akumulacji glikozydów fenolowych w biomasach parenchymatycznych *Cistanche deserticola* (Ouyang i wsp., 2005b), oraz stilbenoidów w korzeniach włóknikowatych *Arachis hypogea* (Donnez i wsp., 2009). W zależności od modelu eksperymentalnego, suplementacja kultur *in vitro* octanem sodu może być rozpatrywana jako elicytacja (Donnez i wsp., 2009), bądź dokarmianie związkiem o charakterze prekursora (Ouyang i wsp., 2005b). Jony octanowe wchodzą, po uprzedniej transformacji do malonylo-CoA, w szlaki biosyntezy pochodnych fenylopropanu, do których zalicza się przede wszystkim związki flawonoidowe (Dixon, 1999; Dixon i Steele, 1999; Quideau i wsp., 2011). Bez dodatkowych badań, obejmujących określenie

aktywności enzymów szlaku fenylopropanoidowego oraz użycia znakowanych radioizotopowo prekursorów, niemożliwe jest stwierdzenie, czy wzrost zawartości izoflawonów w zawieszynie *C. subternata*, pod wpływem jonów octanowych, związany jest pośrednio ze stymulowaniem przez nie przyrostu biomasy, lub ich bezpośrednim wykorzystaniem do produkcji analizowanych połączeń

II.1.2.2.2.4.3. Wzrost biomasy w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata* elicytowanych za pomocą jasmonianu metylu

W przeciwieństwie do suplementacji medium hodowlanego chitosanem, dodatek jasmonianu metylu nie spowodował wyraźnych zmian w profilach wzrostowych zawieszyny *C. subternata*. Krzywe zmian FW, DW i Gi miały w omawianym przypadku przebieg zbliżony do kultury kontrolnej (Ryc. 18A-C). Uwagę zwracała jedynie zauważalnie mniejsza, dla zawieszyny elicytowanej, ilość świeżej masy, wynosząca w dniu 26 ok. 300 g l⁻¹, co stanowiło ok. 17 % jej spadek w stosunku do biomasy referencyjnej (Ryc. 18A). Nie odnotowano zarazem dla opisywanej tkanki obniżenia ilości suchej masy, której maksymalna ilość wynosiła ok. 14 g l⁻¹ (Ryc. 18B). Na tej podstawie można wnioskować, że obserwowany spadek FW związany był z utratą turgoru przez komórki zawieszyny, a nie z obniżeniem tempa podziałów komórkowych. Opisane wyżej zjawisko spowodowane było najprawdopodobniej dodatkiem do podłoża wzrostowego alkoholu etylowego, obserwowano je bowiem także w przypadku próby 0, suplementowanej czystym etanolem, stanowiącym rozpuszczalnik dla użytego elicytora. Przebiegi krzywych wzrostowych, wyznaczonych dla kultury zawiesinowej zawierającej jasmonian oraz próby 0, były praktycznie identyczne, poza niewielkimi przesunięciami maksimum przyrostu nie mającymi istotnego znaczenia praktycznego (Ryc. 18A-C).

Morfologia biomas parenchymatycznych, elicytowanych jasmonianem metylu oraz alkoholem etylowym, była identyczna z kulturą referencyjną rosnącą w warunkach pełnego oświetlenia. W szczególności nie obserwowano tu niekorzystnych zmian nekrotycznych, widocznych w przypadku zawiesin suplementowanych chitosanem. Uzyskane wyniki dowodzą, że biomasa *C. subternata* wykazuje różny poziom wrażliwości na poszczególne typy elicytorów. Można przypuszczać, że reakcja na dany czynnik chemiczny stanowi w omawianym przypadku specyficzną cechę gatunkową badanej rośliny.



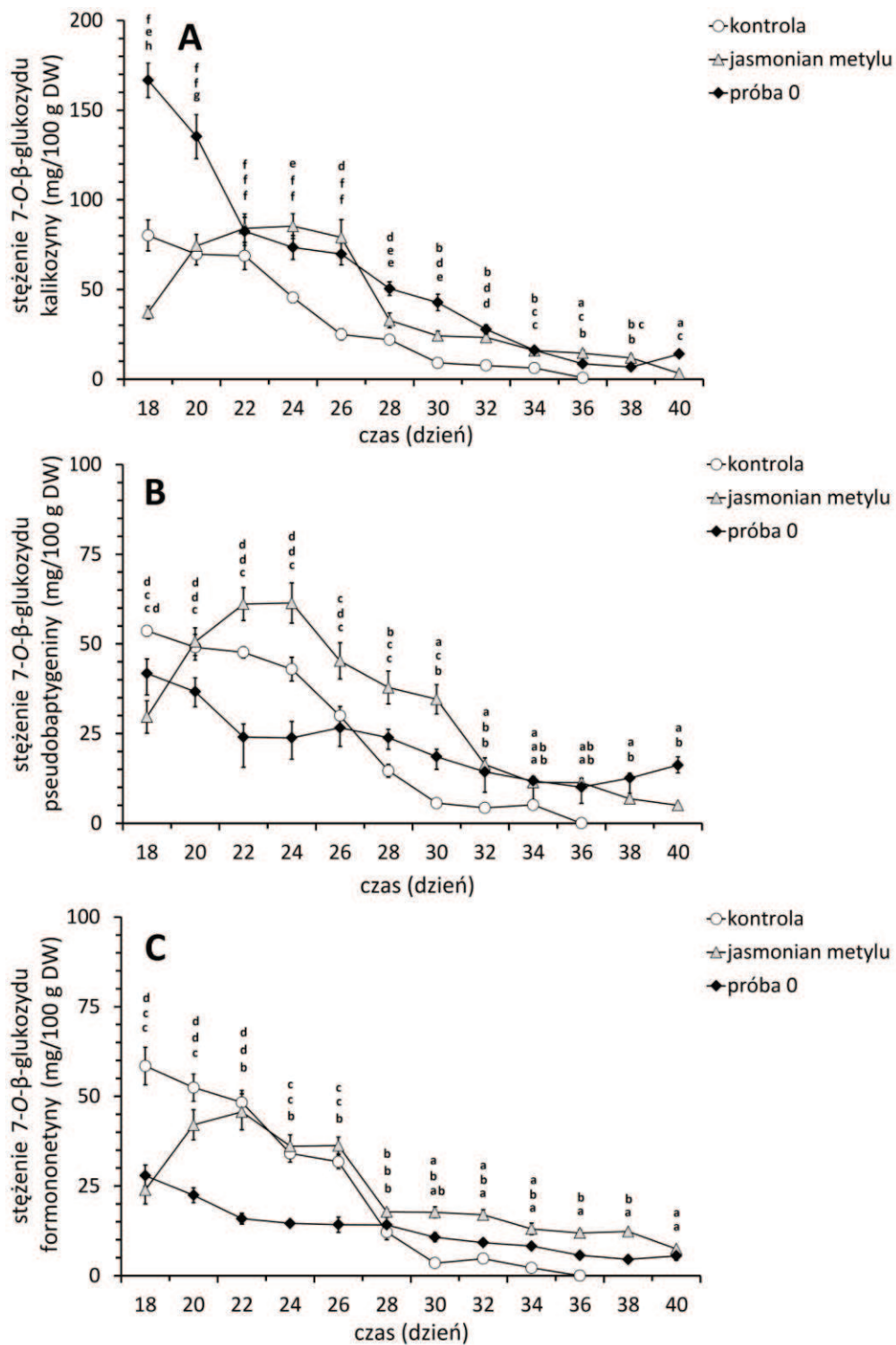
Ryc. 18. Wpływ dodatku jasmonianu metylu (100,0 μM), w 16 dniu eksperymentu, na wzrost kultur zawieszinowych *Cyclopia subternata*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Próbkę kontrolną stanowiła zawieszina *C. subternata* rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego bez dodatku elicytora, zaś próbkę 0 kultura zawieszinowa z dodatkiem 96,0 % v/v alkoholu etylowego (rozpuszczalnik dla jasmonianu metylu). Profile wzrostowe wyrażono jako zmiany ilości świeżej (A) i suchej masy (B) oraz wartości współczynnika przyrostu (C) w cyklu hodowlanym. Odmiennymi literami oznaczono istotnie statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litery umieszczone w kolumnach odpowiadają, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskanym odpowiednio dla próby kontrolnej, dodatku jasmonianu metylu oraz próby 0.

II.1.2.2.2.4.4. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawieszinowych *Cyclopia subternata* elicytowanych za pomocą jasmonianu metylu

Dodatek jasmonianu metylu do kultury zawieszinowej *C. subternata*, w 16 dniu doświadczenia, spowodował zauważalny wzrost stężenia poszczególnych połączeń izoflawonowych w biomacie, z wyraźnie zaznaczonymi maksimami ich produkcji, przypadającymi między 22 a 24 dniem eksperymentu. W tym miejscu należy jednak zaznaczyć, że osiągnięte we wspomnianym przedziale czasowym (dni 22-24) poziomy badanych metabolitów, jakkolwiek znacznie wyższe niż w tych samych dniach w zawieszinie podstawowej, nie dorównywały jednak maksymalnym stężeniom izoflawonów w biomacie referencyjnej, które przypadały na dzień 16. Zjawisko to ilustruje najlepiej 7-*O*- β -glukozyd kalikozyny, którego zawartość w dniach 22-24 (\approx 80 mg/100 g DW – Ryc. 19A) była około 2-krotnie niższa niż stężenie niniejszego metabolitu w biomacie kontrolnej, oznaczone w dniu 16 (\approx 150 mg/100g DW – rozdz. II.1.2.2.2.1.2., Ryc. 11). W przypadku pozostałych połączeń, tj. 7-*O*- β -glukozydów pseudobaptygeniny oraz formononetyny, uzyskane jako wynik elicytacji maksymalne poziomy ich akumulacji jedynie dorównywały najwyższym stężeniom opisywanych związków w zawieszinie podstawowej w dniu 16 (Ryc. 19B, C; rozdz. II.1.2.2.2.1.2., Ryc. 11B, C). Opisane powyżej zmiany zawartości badanych polifenoli w biomacie *C. subternata* są wynikiem zastosowanego w pożywce dodatku jasmonianu metylu, a nie efektem działania rozpuszczalnika niniejszego związku tj. alkoholu etylowego. W próbie 0 nie stwierdzono bowiem wzrostu stężenia izoflawonów, co mogłoby być bezpośrednim rezultatem suplementacji medium hodowlanego etanolem. Przeciwnie, szczególnie w pierwszych dniach po dodaniu powyższego rozpuszczalnika do kultury, obserwowano spadek zawartości badanych metabolitów, który wyrównywał się w zawieszinie w przeciągu dalszych dni eksperymentu (Ryc. 19).

Podobnie jak w opisanych uprzednio doświadczeniach, elicytacja biomasy *C. subternata* jasmonianem metylu nie spowodowała zmiany profilu magazynowania analizowanych związków ani ich rozkładu hydrolytycznego. W ciągu całego cyklu hodowlanego, nie stwierdzono obecności połączeń polifenolowych w zebranych podłożach wzrostowych. Powyższa obserwacja potwierdza wcześniejsze doniesienia literaturowe, wskazujące na wewnątrzkomórkowe magazynowanie związków izoflawonoidowych w kulturach *in vitro* (Łuczkiwicz, 2008; Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2012).

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia wykazały, że zawieszina *C. subternata* charakteryzuje się różną podatnością na działanie elicytorów należących do odmiennych grup chemicznych. Jakkolwiek chitosan powodował, w krótkim czasie, całkowite zamieranie powyższej biomasy i zanik w niej analizowanych połączeń, to dodatek jasmonianu metylu wywierał słabo zaznaczony, stymulujący wpływ zarówno na wzrost tkanki, jak i akumulację izoflawonów.



Ryc. 19. Wpływ dodatku jasmonianu metylu (100,0 μ M), w 16 dniu eksperymentu, na zawartość 7-O- β -glukozydu kalikozydu (A), 7-O- β -glukozydu pseudobaptygeniny (B) oraz 7-O- β -glukozydu formononetyny (C), w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina *C. subternata* rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego, bez dodatku elicytora, zaś próbę 0 kultura zawiesinowa z dodatkiem 96,0 % v/v alkoholu etylowego (rozpuszczalnik dla jasmonianu metylu).

Odmiernymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya). Litera umieszczona w kolumnach odpowiada, począwszy od góry do dołu, wartościom uzyskany odpowiednio dla próby kontrolnej, dodatku jasmonianu metylu oraz próby 0. Brak znacznika oznacza nieobecność związku w badanej biomacie.

Umiarkowana skuteczność jasmonianu metylu w zakresie indukcji biosyntezy badanych związków może być spowodowana faktem, że izoflawony zawarte w biomacie parenchymatycznej *C. subternata* nie należą do typowych fitoaleksyn bądź fitoantycypin, produkowanych przez rośliny strączkowe w toku reakcji obronnej. W większości przeprowadzonych do tej pory badań z zakresu elicytacji, wykorzystywano kultury *in vitro* takich roślin jak *Glycine max*, *Medicago sativa* czy *Cicer arietinum*, syntezujących izoflawony o prostej budowie, głównie daidzeinę lub genisteinę (Dixon, 1999; Łuczkiwicz, 2008). Być może, znaczący wzrost biosyntezy izoflawonów w przypadku kultur *in vitro* *C. subternata* możliwy byłby dopiero po zastosowaniu bardziej specyficznych elicytorów, np. charakterystycznych dla danego gatunku patogenów grzybowych lub bakteryjnych.

Z praktycznego punktu widzenia, opisane w niniejszym rozdziale zabiegi eksperymentalne mogą znaleźć ograniczone zastosowanie jedynie dla celów pozyskiwania 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptygeniny. Podwyższony poziom akumulacji wspomnianego połączenia w późniejszych dniach doświadczenia, odpowiadających uzyskaniu większej ilości biomasy z roślinnego systemu, odnotowano bowiem w przypadku kultur elicytowanych za pomocą jasmonianu metylu, bądź suplementowanych kwasem octowym zubożonym przy użyciu wodorotlenku sodu.

II.1.2.2.2.5. Wpływ immobilizacji na wzrost biomasy i akumulację związków polifenolowych w kulturach zawieszonych *Cyclopia subternata*

Oprócz określenia skuteczności dokarmiania oraz elicytacji w zakresie stymulacji wzrostu biomasy oraz akumulacji związków polifenolowych w zawieszynie *C. subternata*, zaplanowane eksperymenty obejmowały zbadanie wpływu immobilizacji na wybrane aspekty metabolizmu pierwotnego i wtórnego prowadzonych kultur. Ogólnie, wspomniana procedura zapewnia m.in. lepszy kontakt między komórkami, imitując do pewnego stopnia zróżnicowanie histologiczne w roślinie macierzystej. Oprócz tego, immobilizowana biomasa jest bardziej odporna na stres mechaniczny związany z mieszaniem kultury, a także pozostaje przez dłuższy czas w stacjonarnej fazie wzrostu. Z uwagi na powyższe, stosując niniejszą strategię możliwe jest znaczące podniesienie produktywności roślinnych biomas *in vitro* pod względem wybranych metabolitów wtórnych (Buitelaar i Tramper, 1992; DiCosmo i Misawa, 1995; Dörnenburg i Knorr, 1995; Mühlbach, 1998; Verpoorte i wsp., 2002). Szczególnie korzystna, z technologicznego punktu widzenia, wydaje się immobilizacja powierzchniowa, zapewniająca dobry transfer składników pożywki do komórek, a także sprawne odprowadzanie produktu (w sytuacji, gdy jest on wydzielany do podłoża). Do dodatkowych zalet immobilizacji powierzchniowej należy również możliwość jej zastosowania dla kultur o wysokiej gęstości, a także do hodowli wielkoskalowych (DiCosmo i Misawa, 1995). W wybranych przypadkach może nawet dochodzić do wyrzutu metabolitów wtórnych do pożywki oraz ich absorpcji przez czynnik immobilizujący (Buitelaar i Tramper, 1992; DiCosmo i Misawa, 1995; Dörnenburg i

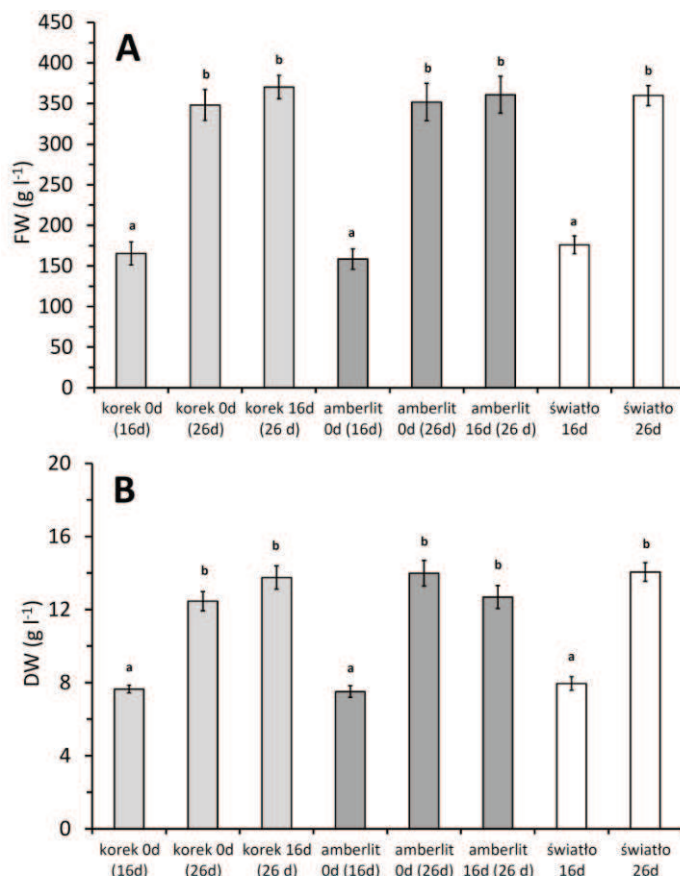
Knorr, 1995). Z uwagi na powyższe, w toku badań, wchodzących w zakres niniejszej pracy, zdecydowano się na powierzchniowe unieruchomienie komórek, zainicjowane na drodze dodatku do rosnącej kultury zawiesinowej odpowiednich matryc immobilizujących.

Spośród czynników immobilizujących, wybrano żywicę Amberlite™ XAD4 oraz oczyszczony i rozdrobniony korek (*Quercus suber* L.), stosowane uprzednio w doświadczeniach biotechnologicznych opisanych w literaturze (Buitelaar i Tramper, 1992; Dönenburg i Knorr, 1995; Pavlov i wsp., 2001; Zhao i wsp., 2003). W cytowanych pracach stwierdzono zwiększony poziom akumulacji polifenoli w kultywowanych biomasach, jak również adsorpcję wspomnianych połączeń na użytych matrycach. Kierując się danymi literaturowymi, wskazującymi na istotne znaczenie momentu aplikacji czynnika immobilizującego do kultury (Buitelaar i Tramper, 1992), oczyszczony uprzednio korek lub żywicę Amberlite (rozdz. III.1.6.2.5.1.), dodawano do zawiesiny *C. subternata* zarówno na początku cyklu wzrostowego, jak i w 16 dniu doświadczenia. Biomasy zbierano następnie w dniach 16 i/lub 26 eksperymentu, które odpowiadały maksymalnej produkcji izoflawonów oraz największej ilości uzyskanej biomasy.

II.1.2.2.5.1. Wpływ dodatku korka i żywicy Amberlite™ XAD4 na wzrost kultur zawiesinowych *Cyclopia subternata*

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że immobilizacja zawiesiny *C. subternata* przy użyciu korka lub żywicy Amberlite™ XAD4 nie wywiera znaczącego wpływu na wzrost badanej biomasy. Zarówno w przypadku dodatku wspomnianych substancji na początku, jak i w późniejszym okresie cyklu hodowlanego, parametry wzrostowe kultury parenchymatycznej były zbliżone do próby kontrolnej (Ryc. 20). Nie obserwowano także różnic w morfologii kultur zawiesinowych poddanych oraz nie poddanych immobilizacji. Zebrane biomasy charakteryzowały się dużym stopniem uwodnienia, jasnożółtą barwą i luźną konsystencją. W przypadku komórek rosnących z dodatkiem korka lub żywicy, zawiesina równomiernie obrastała cząstki matrycy immobilizującej, co skutkowało nieznacznym wzrostem średnicy tworzących się agregatów komórkowych.

Immobilizowane biomasy *C. subternata*, rosnące przez 16 jak i 26 dni, charakteryzowały się dużą żywotnością i brakiem widocznych zmian nekrotycznych. Kultury suplementowane żywicą Amberlite™ XAD4 i zbierane w 26 dniu cyklu wzrostowego cechowała jednak zauważalnie jaśniejsza barwa, co mogło być związane z absorpcją przez wspomniany czynnik prostych związków fenolowych, odpowiedzialnych za umiarkowane ciemnienie zawiesiny.



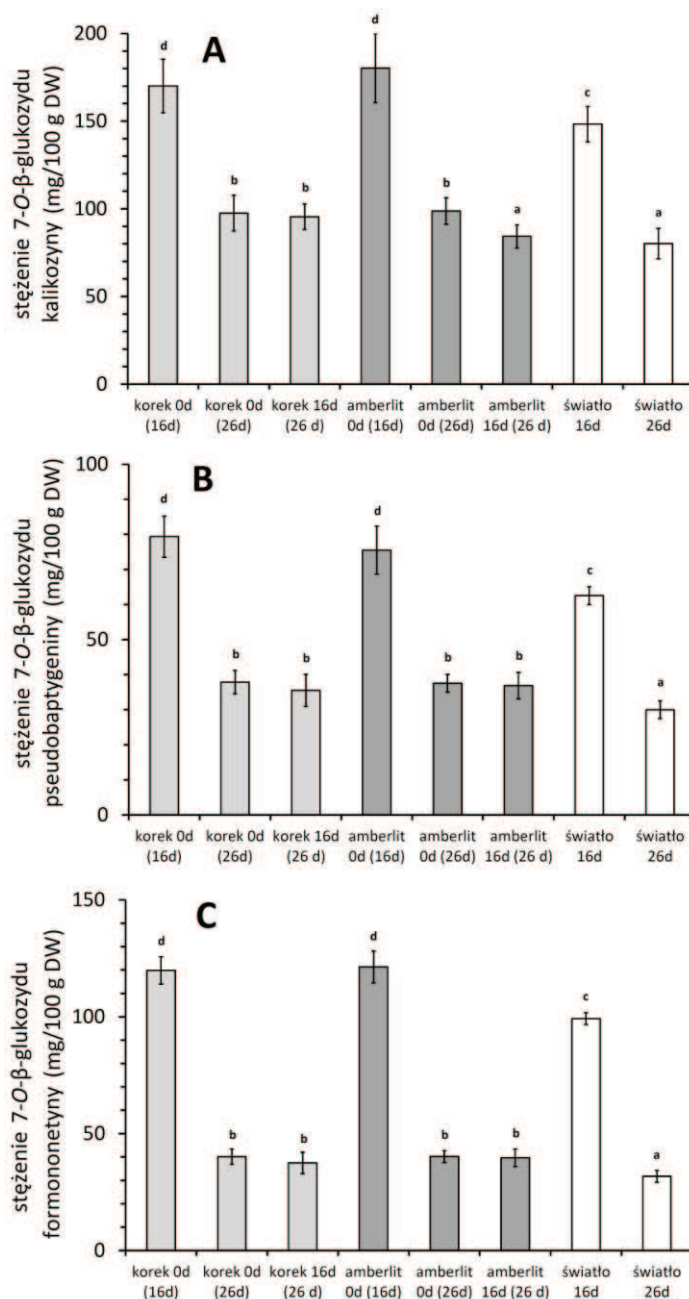
Ryc. 20. Wpływ dodatku korka ($10,0 \text{ g l}^{-1}$) oraz żywicy Amberlite™ XAD4 ($10,0 \text{ g l}^{-1}$), w 0 lub 16 dniu eksperymentu, na wzrost kultur zawieszinowych *Cyclopiya subternata* (wyrażony jako ilość świeżej – A oraz suchej masy – B), prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Próbę kontrolną stanowiła zawieszina *C. subternata* nie poddana procedurze immobilizacji, rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego przez 16 oraz 26 dni.

Odmiernymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Zastosowane skróty: wartości przed nawiasem oznaczają dzień dodatku czynnika immobilizującego, zaś umieszczone w nawiasach – czas trwania eksperymentu.

II.1.2.2.5.2. Wpływ dodatku korka i żywicy Amberlite™ XAD4 na akumulację polifenoli w kulturach zawieszinowych *Cyclopiya subternata*

Analiza fitochemiczna biomas uzyskanych w toku eksperymentu wykazała, że immobilizacja komórek zawiesziny *C. subternata* nie wywiera oczekiwanego wpływu na akumulację połączeń polifenolowych w badanej kulturze (Ryc. 21). Obok frakcji izoflawonoidowej, nie zaobserwowano w hodowli powstawania połączeń nowych, nie stwierdzonych uprzednio w biomasach parenchymatycznych powyższego gatunku. Nie odnotowano także wydzielania akumulowanych izoflawonów do podłoża wzrostowego. Istotny wydaje się ponadto brak w zawieszynie związków o charakterze ksantonów, co świadczy o braku wpływu imitacji zróżnicowania histologicznego na potencjał biomasy w kierunku biosyntezy wspomnianych związków, występujących jedynie w roślinie gruntowej i kulturach mikropędowych o wysokim stopniu cytodyferencjacji (rozdz. II.1.1.4.).



Ryc. 21. Wpływ dodatku korka ($10,0 \text{ g l}^{-1}$) oraz żywicy Amberlite™ XAD4 ($10,0 \text{ g l}^{-1}$) w 0 lub 16 dniu eksperymentu na zawartość 7-O-β-glukozydu kalikozydu (A), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (B) oraz 7-O-β-glukozydu formononetyny (C) w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, w warunkach pełnego oświetlenia. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina *C. subternata* nie poddana procedurze immobilizacji, rosnąca w warunkach oświetlenia ciągłego przez 16 i 26 dni.

Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Zastosowane skróty: wartości przed nawiasem oznaczają dzień dodatku czynnika immobilizującego, zaś umieszczone w nawiasach – czas trwania eksperymentu.

Chromatograficzne analizy ilościowe wykazały, że omawiane procedury eksperymentalne spowodowały zauważalny wzrost akumulacji połączeń izoflawonowych, tj. 7-O-β-glukozydów kalikozydu, pseudobaptygeniny i

formononetyny w badanej biomacie. Wynosił on, w zależności od związku, od ok. 10 do 15 %, i dotyczył zarówno 16, jak i 26 dnia eksperymentu (Ryc. 21A-C). Świadczy to o korzystnym wpływie immobilizacji na wtórny metabolizm kultury zawiesinowej *C. subternata*. Istotny jest ponadto fakt, że dodatek korka lub żywicy Amberlite™ do medium hodowlanego nie wpływał negatywnie na wzrost biomasy parenchymatycznej *C. subternata*.

Należy zwrócić uwagę, że ze względu na specyfikę prowadzenia eksperymentu, skutkującą silnym obrastaniem cząstek matrycy immobilizacyjnej przez zawiesinę, niemożliwe było określenie dystrybucji połączeń polifenolowych pomiędzy korkiem/żywicą a hodowaną biomasą. Nie można zatem stwierdzić, na ile uzyskany rezultat jest efektem lepszego kontaktu pomiędzy komórkami, na ile zaś stymulowaniem wydzielania i absorpcji bioflawonoidów przez czynniki immobilizujące.

Pomijając obserwacje o charakterze czysto naukowym, opisane procedury doświadczalne wydają się mało praktyczne z punktu widzenia biotechnologicznego pozyskiwania izoflawonów. Jakkolwiek odnotowano tu wyraźny wzrost zawartości poszczególnych połączeń flawonoidowych w porównaniu z próbą kontrolną (maksymalne stężenia 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny wyniosły odpowiednio ok. 180, 80 i 120 mg/100g DW, Ryc. 21A-C), to zastosowanie immobilizacji wiąże się jednak ze znacznie wyższymi kosztami prowadzenia kultury. W omawianym przypadku należy bowiem uwzględnić konieczność zakupu odpowiedniej żywicy Amberlite™, bądź koszty i czas potrzebne do oczyszczenia korka (rozdz. III.1.6.2.5.1.). Jednocześnie, wymienione matryce immobilizacyjne są ze względu na specyfikę doświadczenia praktycznie niemożliwe do odzyskania (przerastanie tkanką parenchymatyczną).

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty wykazały, że możliwe jest wyprowadzenie szybko rosnących kultur zawiesinowych w oparciu o kalus *C. subternata*. Uzyskana hodowla wytrząsana charakteryzowała się dużą żywotnością, a jednocześnie zachowała zdolność do produkcji połączeń izoflawonowych charakterystycznych dla nieuorganizowanych kultur stacjonarnych powyższego gatunku, tj. 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny. Co istotne, nie stwierdzono w jej przypadku obecności flawanonu hesperydyny, występującej w kalusie, kulturach pędowych oraz roślinie macierzystej *C. subternata*. W rezultacie można uznać, że omawiana zawiesina jest wybiórczym źródłem izoflawonów.

Doświadczenia ukierunkowane na zwiększenie poziomu akumulacji związków izoflawonowych w uzyskanych kulturach udowodniły przede wszystkim paradoksalnie korzystny wpływ braku oświetlenia na produktywność biomas względem wspomnianych połączeń (Tab. 9). Stwierdzono ponadto w tym względzie stosunkowo dużą skuteczność strategii dokarmiania badanej biomasy złożonymi substancjami odżywczymi z dominującym udziałem węglowodanów (woda kokosowa), bądź prostym związkiem wchodzącym w reakcje szlaku fenylopropanoidowego (octan sodu).

Tab. 9. Wpływ oświetlenia, wybranych strategii retrobiosyntetycznych, elicytacji oraz immobilizacji na produktywność zawiesinowych kultur wytrząsanych *Cyclopiia subternata*, pod względem połączeń izoflawonoidowych.*

Warunki eksperymentalne ^a	Czas wzrostu biomasy (dni)	Produktywność (mg l ⁻¹ d ⁻¹)				suma izoflawonów
		7-O-β-glukozyd kalikozyny	7-O-β-glukozyd pseudobaptygeniny	7-O-β-glukozyd formononetyny		
oświetlenie ciągłe (próba kontrolna)	16	0,74	0,31	0,49	1,54	
ciemność	22	1,27	0,58	0,68	2,53	
oświetlenie ciągłe + woda kokosowa (16)	22	0,98	0,53	0,29	1,80	
oświetlenie ciągłe + hydrolizat kazeiny (16)	18	0,54	0,20	0,21	0,95	
oświetlenie ciągłe + fenyloalanina (16)	18	0,73	0,23	0,21	1,17	
oświetlenie ciągłe + chitosan (16)	18	0,06	0,01	0,01	0,08	
oświetlenie ciągłe + kwas octowy zobojętniony przy użyciu wodorotlenku sodu (16) /próba 0 dla chitosanu/	24	0,89	0,37	0,29	1,55	
oświetlenie ciągłe + jasmonian metylu (16)	22	0,54	0,39	0,29	1,22	
oświetlenie ciągłe + 96 % v/v alkohol etylowy (16) /próba 0 dla jasmonianu metylu/	18	0,75	0,19	0,12	1,06	
oświetlenie ciągłe + korek (0)	16	0,81	0,38	0,57	1,76	
oświetlenie ciągłe + korek (0)	26	0,47	0,18	0,19	0,84	
oświetlenie ciągłe + korek (16)	26	0,51	0,19	0,20	0,90	
oświetlenie ciągłe + żywica Amberlite™ XAD4 (0)	16	0,85	0,35	0,57	1,77	
oświetlenie ciągłe + żywica Amberlite™ XAD4 (0)	26	0,53	0,20	0,22	0,95	
oświetlenie ciągłe + żywica Amberlite™ XAD4 (16)	26	0,41	0,18	0,19	0,78	

* Produktywność kultury wyrażona jako ilość mg związku syntezowana w 1 l kultury w ciągu 1 dnia; pogrubioną czcionką zaznaczono modyfikacje o produktywności > 1,5 mg l⁻¹ d⁻¹.

^a W nawiasie zaznaczono dzień suplementacji pożywką/elicytacji/dodatku czynnika immobilizującego.

Znacznie gorsze efekty, w postaci braku stymulacji produkcji izoflawonów, uzyskano w przypadku suplementacji zawiesiny mieszaniną aminokwasów (hydrolizat kazeiny), jak również substancją o charakterze dalekiego prekursora połączeń polifenolowych (L-fenyloalanina).

Mało obiecujące rezultaty przyniosła też procedura elicytacji zawiesiny badanego gatunku, skutkująca całkowitym zamieraniem tkanki oraz spadkiem zawartości bioflawonoidów w kulturze (w przypadku chitosanu), bądź jedynie słabo zaznaczonym wzrostem stężeń badanych metabolitów w namnażanych komórkach (jasmonian metylu). W przeciwieństwie do elicytacji, stosunkowo korzystna (pomijając koszty procedury) wydaje się powierzchniowa immobilizacja biomas *C. subternata*, powodująca zwiększenie poziomów akumulacji wszystkich izoflawonów, przy jednoczesnym zachowaniu dobrych parametrów wzrostowych kultury.

W Tab. 9 zestawiono produktywności względem poszczególnych połączeń izoflawonoidowych, wyznaczone dla kultur zawiesinowych *C. subternata*, poddanych wymienionym wyżej strategiom eksperymentalnym. Uzyskane wyniki pokazują, że najbardziej korzystne, z technologicznego punktu widzenia, jest prowadzenie hodowli wytrząsanej w warunkach całkowitej ciemności (64 % wzrost produktywności, wyrażonej jako ilość mg związku syntezowana w 1 l kultury w ciągu 1 dnia, w stosunku do kultury odniesienia), jak również dokarmianie zawiesiny wodą kokosową (17 % wzrost produktywności). Immobilizacja biomasy żywicą Amberlite™ w 0 dniu eksperymentu charakteryzowała się skutecznością zbliżoną do stwierdzonej wobec wody kokosowej (wzrost produktywności o ok. 15%), wymagała jednak bardziej kosztownych i czasochłonnych czynności przygotowawczych, związanych z przygotowaniem czynników immobilizujących.

II.1.2.2.3. Kultury zawiesinowe *Cyclopia subternata* prowadzone w bioreaktorze

Rezultaty doświadczeń przeprowadzonych w kolbach Erlenmeyera wykazały, że w przypadku zoptymalizowanych kultur zawiesinowych *C. subternata* mamy do czynienia z matrycą roślinną zdolną do wybiórczej i znacznej produkcji unikatowego zespołu trzech związków izoflawonoidowych (7-O- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nie występujących w roślinie macierzystej. Poziomy biosyntezy powyższych metabolitów wtórnych, nieobecność innych polifenoli w omawianej kulturze oraz szybkie tempo przyrostu namnażanych komórek spowodowały, że w finalnej części projektu badawczego postanowiono zaadaptować zawiesiny *C. subternata* do wzrostu w warunkach dużych instalacji, umożliwiających ciągłą produkcję wybranych związków w skali wielkolaboratoryjnej. Realizacja powyższego zamierzenia, stanowiącego jednocześnie jeden z podstawowych celów niniejszej pracy, wiąże się z kompletnym opracowaniem procedury *upstream* biotechnologicznego systemu do otrzymywania izoflawonów w warunkach *in vitro*.

Na pierwszym etapie prowadzonych badań konieczne okazało się dokonanie wyboru odpowiedniej konstrukcji fermentora do kultywacji zawiesin *C. subternata*, a następnie

empiryczne dobranie warunków prowadzenia eksperymentu w skali wielkolaboratoryjnej. Doświadczenia prowadzone w tym względzie dotyczyły sposobu inokulacji, mieszania, napowietrzania, oraz ewentualnego użycia środków przeciwpiannych. W rezultacie zmierzano do opracowania prototypowej instalacji, umożliwiającej efektywną kultywację zawiesiny *C. subternata*. Analiza danych literaturowych wskazała na konstrukcję typu *stirred-tank* jako najczęściej stosowaną w czasie wielkoskalowych eksperymentów z wykorzystaniem kultur *in vitro* roślin wyższych. Wymieniony typ bioreaktora posiada szereg zalet, w tym efektywny sposób mieszania i napowietrzania, sprawdzający się zwłaszcza w przypadku kultur o wysokiej gęstości, jak również możliwość stosunkowo łatwego zwiększenia skali hodowli (Kieran i wsp., 1997; Doran, 2000, 2010). Nie bez znaczenia jest również bogata oferta rynkowa wspomnianych konstrukcji, począwszy od reaktorów laboratoryjnych do instalacji przemysłowych. Opisany typ fermentora znalazł zastosowanie w pozyskiwaniu szeregu roślinnych metabolitów wtórnych w celach komercyjnych, w tym ginsenozydów, paklitakselu oraz szikoniny (rozdz. I.2.3. – Tab. 5). Z uwagi na zasadniczy cel niniejszej pracy, istotne były korzystne rezultaty doświadczeń obejmujących prowadzenie kultur zawiesinowych roślin z rodziny *Fabaceae*, w tym *Pueraria lobata* (Chen i Li, 2007), *Pueraria tuberosa* (Sharma i wsp., 2009) oraz *Glycine max* (Federici i wsp., 2003; Terrier i wsp., 2007), w bioreaktorach mieszająco-napowietrzających. Wykazały one, że biomasy parenchymatyczne powyższych gatunków, rosnące w fermentorach, charakteryzują się parametrami wzrostowymi i zawartością izoflawonów porównywalną z kulturami wytrąsanymi.

W eksperymentach przeprowadzonych w ramach niniejszego projektu wykorzystano szklaną konstrukcję typu *stirred-tank* (rozdz. III.1.6.2.6.1. – Ryc. 43), zapewniającą dobry dostęp światła do rosnącej biomasy i wyposażoną w napędzane magnetycznie wolnoobrotowe mieszadło płytowe generujące stosunkowo niskie siły ścinające (Kieran i wsp., 1997; Doran, 2000, 2010). Podobnie jak podczas wcześniejszych badań nad kulturami zawiesinowymi roślin strączkowych (Federici i wsp., 2003; Chen i Li, 2007; Terrier i wsp., 2007; Sharma i wsp., 2009), zdecydowano się na prowadzenie doświadczeń w systemie okresowym (*batch model*), obejmującym dostarczenie całości pożywki na początku eksperymentu, a następnie rozładowanie bioreaktora po zakończonym cyklu wzrostowym. Optymalny poziom napowietrzania, wynoszący w omawianym przypadku 0,2 vvm (*volume per volume per minute*, objętość powietrza przepuszczana przez daną objętość cieczy w ciągu 1 min), ustalono empirycznie na podstawie obserwacji wzrostu kultury w bioreaktorze i towarzyszących temu zjawisk (nasilenie powstawania piany, sedymentacja biomasy bądź zamieranie komórek), posiłkując się dodatkowo dostępnymi danymi literaturowymi (Min i wsp., 2007; Cui i wsp., 2011).

Zaplanowane doświadczenia były pierwszą próbą wprowadzenia zawiesiny *C. subternata* do hodowli bioreaktorowej, postanowiono więc na wstępie przeprowadzić eksperyment w warunkach identycznych jak dla biomasy rosnącej w kolbach stożkowych przy pełnym oświetleniu, która stanowiła w tym przypadku również kulturę kontrolną. Powyższe doświadczenie umożliwiło określenie wpływu zmiany sposobu mieszania i napowietrzania na przyrost komórek oraz akumulację izoflawonów w

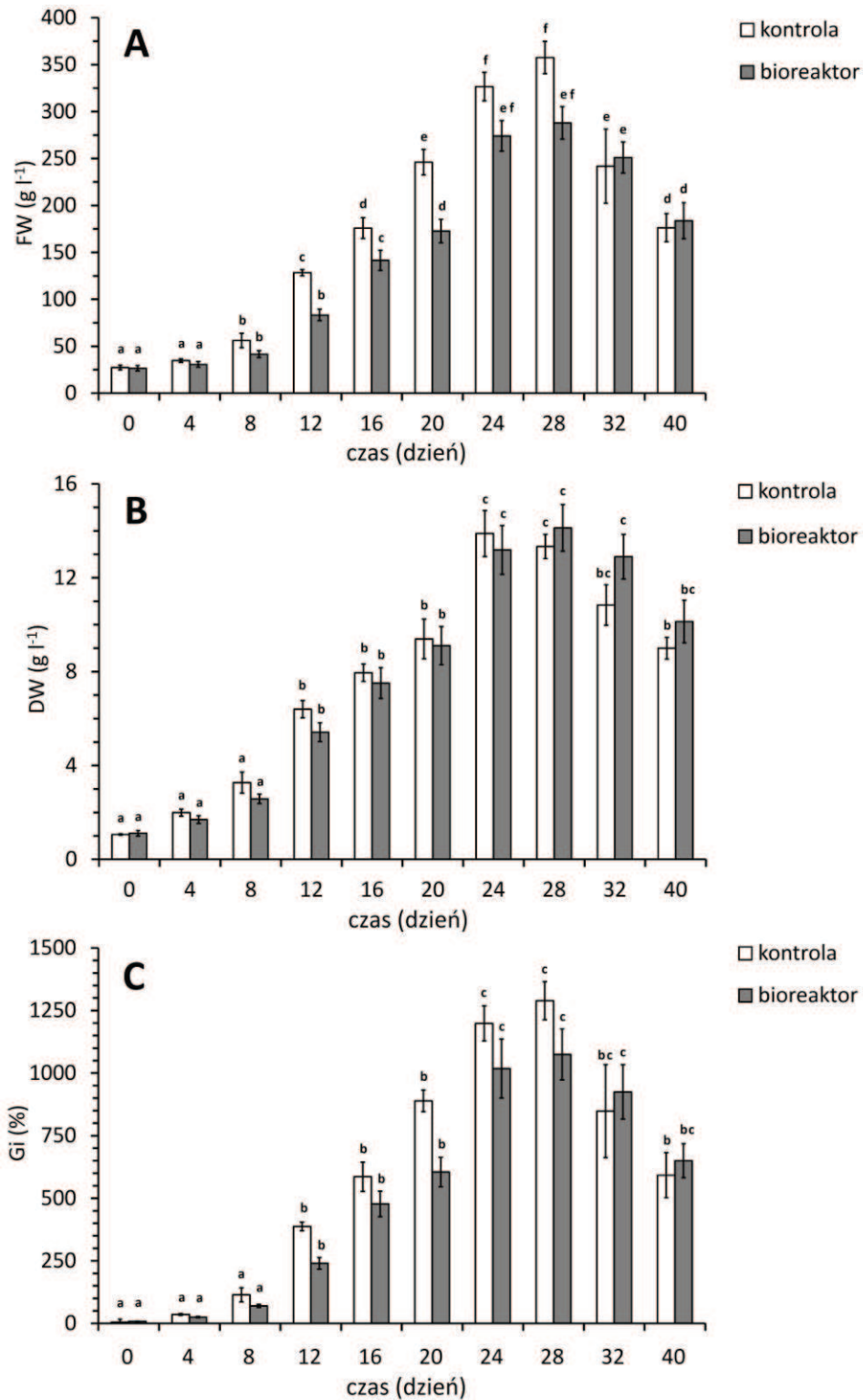
zawiesinie badanego gatunku. W czasie prac z wykorzystaniem bioreaktorów zastosowano procedurę hodowlaną analogiczną do postępowania towarzyszącego prowadzeniu kultur wytrząsanych miodokrzewu. Biomasy pochodzące z poszczególnych dni eksperymentu zbierano w określonych odstępach czasu a następnie ważono, celem wyznaczenia profilów wzrostowych. W dalszej kolejności, zliofilizowane próbki zawiesiny oraz podłoża wzrostowe, odpowiadające poszczególnym dniom hodowli, poddawano analizie fitochemicznej pod względem zawartości polifenoli.

Finalny etap doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem bioreaktorów, stanowiło zastosowanie w instalacji hodowlanej wybranych strategii reterobiosyntetycznych oraz modyfikacji warunków fizycznych eksperymentu, celem podwyższenia produktywności kultur zawiesinowych *C. subternata* pod względem badanych połączeń polifenolowych. Kierując się rezultatami doświadczeń na poziomie hodowli wytrząsanych (rozd. II.1.2.2.2. – Tab. 9), zdecydowano się na przeprowadzenie eksperymentów w warunkach całkowitej ciemności, suplementując dodatkowo kulturę wodą kokosową, w 16 dniu cyklu wzrostowego (model *fed-batch*).

II.1.2.2.3.1. Wzrost biomasy w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata* prowadzonych w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym

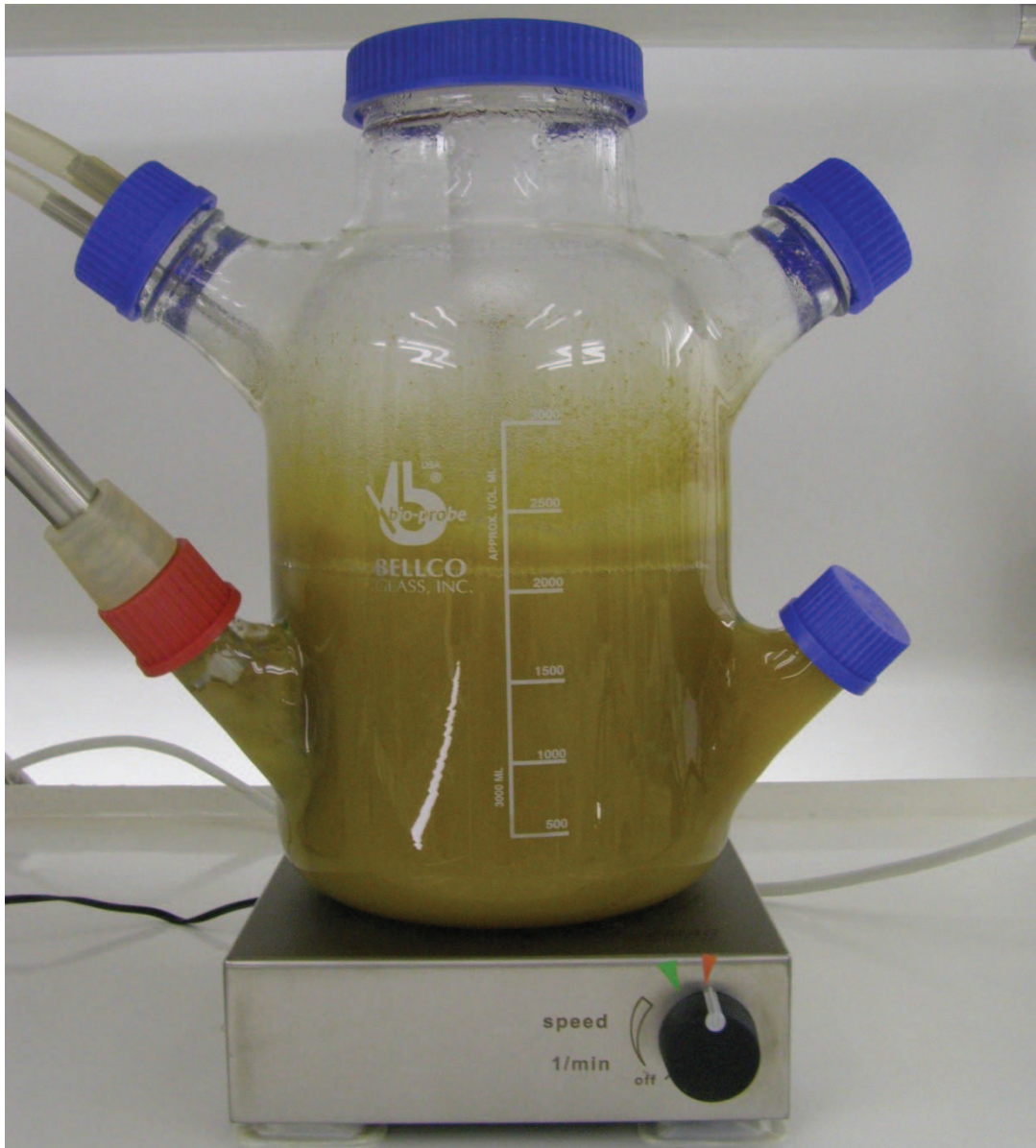
Analiza profilów zmian świeżej (FW) i suchej (DW) masy oraz współczynnika przyrostu (Gi) w cyklu hodowlanym wykazała, że kinetyka wzrostu zawiesiny *C. subternata* jest, w bioreaktorze typu *stirred-tank*, zbliżona do krzywej charakterystycznej dla kultur wytrząsanych powyższego gatunku (Ryc. 22A-C). Nie zaobserwowano tu obecności fazy opóźnienia, zaś maksimum przyrostu świeżej masy, przypadające na dzień 28 było, w stosunku do próby kontrolnej, nieznacznie przesunięte w kierunku końca eksperymentu, (Ryc. 22A). Ponadto, w przypadku hodowli prowadzonej w bioreaktorze, znacznemu wydłużeniu uległa faza stacjonarna, odpowiadająca, wg profilu zmian DW, okresowi od 24 do 32 dnia eksperymentu (Ryc. 22B). Jakkolwiek maksymalne ilości suchej masy były zbliżone w obydwu doświadczeniach (ok. 14 g l⁻¹), to kultura rosnąca w bioreaktorze charakteryzowała się mniejszym stopniem uwodnienia. Największa ilość FW wyniosła w opisywanym eksperymencie ok. 275 g l⁻¹, co stanowiło dość znaczny jej spadek w porównaniu z ok. 350 g l⁻¹ uzyskanymi dla próby kontrolnej (Ryc. 22A). Powyższe zjawisko było najprawdopodobniej związane ze zmianą sposobu mieszania i napowietrzania hodowli w fermentorze. W tym miejscu należy zaznaczyć, że uzyskane w instalacji laboratoryjnej ogólnie wysokie parametry wzrostowe, były ciągle atrakcyjne z technologicznego punktu widzenia.

Nie odnotowano również widocznych różnic w morfologii biomas rosnących w bioreaktorze oraz kolbach Erlenmeyera. Zawiesina namnażana w fermentorze charakteryzowała się, podobnie jak hodowle wytrząsane, jasnożółtą barwą oraz dużą żywotnością aż do 32 dnia eksperymentu (Fot. 10).



Ryc. 22. Wzrost kultur zawieszinowych *Cyclopia subternata* prowadzonych w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, w warunkach oświetlenia ciągłego. Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina *C. subternata* rosnąca w kolbach Erlenmeyera, przy oświetleniu ciągłym. Profile wzrostowe wyrażono jako zmiany ilości świeżej (A) i suchej masy (B) oraz wartości współczynnika przyrostu (C) w cyklu hodowlanym.

Odmiernymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 (kontrola) lub 2 (bioreaktor) prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).



Fot. 10. Kultura zawieszinowa *Cyclopia subternata* prowadzona w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym przez okres 20 dni.

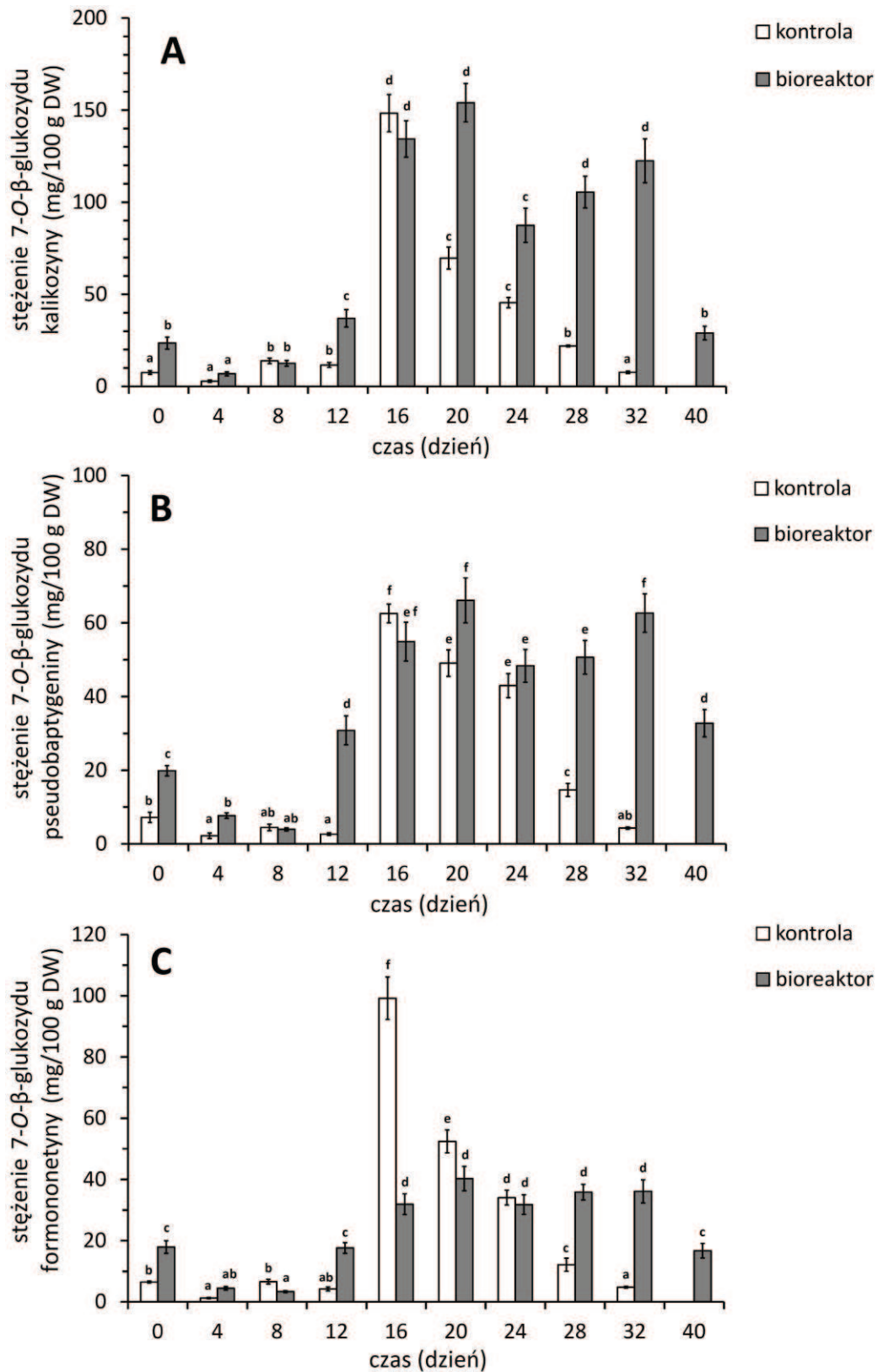
Pewien problem stanowiło natomiast powstawanie w zbiorniku hodowlanym znacznych ilości piany, co było bezpośrednio związane ze zmianą sposobu napowietrzania kultury. W rezultacie, powyżej poziomu pożywki dochodziło do nadmiernej adhezji komórek zawiesiny do ścian bioreaktora, a w dalszej kolejności, do powstawania zwartych agregatów komórek objętych nekrozą. Jakkolwiek powyższy fenomen wydawał się nie wywierać niekorzystnego wpływu na prowadzoną kulturę (Ryc. 22A-C), to obecność twardych konglomeratów komórek objętych nekrozą może niekiedy zakłócać działanie systemów mieszania oraz urządzeń pomiarowych (Kieran i wsp., 1997; Abdullah i wsp., 2000; Chattopadhyay i wsp., 2002a; Junker, 2007). Z tego względu, na dalszych etapach prowadzonych doświadczeń zdecydowano się na dodatek do naczynia hodowlanego czynnika przeciwpianego.

II.1.2.2.3.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach zawieszonych *Cyclopia subternata* prowadzonych w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym

Adaptacja zawiesiny *C. subternata* do wzrostu w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym nie spowodowała zmian w składzie frakcji polifenolowej, jak również modyfikacji sposobu magazynowania analizowanych połączeń w badanej kulturze. Podobnie jak w przypadku hodowli wytrząsanych, wszystkie składniki zespołu izoflawonoidowego, tj. 7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, były magazynowane w fermentorze wyłącznie wewnątrzkomórkowo.

Zmiana sposobu napowietrzania i mieszania kultury spowodowała otrzymanie biomasy o innej, w stosunku do hodowli prowadzonych w kolbach Erlenmeyera, kinetyce produkcji wspomnianych wyżej połączeń. Zawiesinę miokrzewu namnażaną w bioreaktorze charakteryzowała obecność dwóch maksimum akumulacji wszystkich izoflawonów, przypadających na 20 i 32 dzień eksperymentu. Dla kultury wytrząsanej wyznaczono zaś tylko jedno maksimum produkcji w dniu 16, po którym obserwowano jedynie spadek zawartości powyższych związków aż do końca cyklu wzrostowego (Ryc. 23A-C). Uzyskane w fermentorze najwyższe stężenia 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, wynoszące odpowiednio ok. 150, 65 i 40 mg/100g DW, dotyczyły pierwszego maksimum akumulacji niniejszych połączeń (20 dzień) i były, za wyjątkiem ostatniego z wymienionych metabolitów, porównywalne do największej zawartości izoflawonoidów w kulturze referencyjnej. W obydwu biomasach, intensywne biosynteza polifenoli przypadała na fazę wzrostu liniowego komórek, z tym że w hodowli bioreaktorowej należy pamiętać o drugim maksimum akumulacji badanych związków (32 dzień), odpowiadającym późnej fazie stacjonarnej. Osiągnięte wtedy stężenia izoflawonów nie dorównywały jednak pierwszemu maksimum ich produkcji (zawartość 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny na poziomie ok. 120, 60 i 35 mg/100 g DW). Warto również dodać, że w 32 dniu hodowli zawiesina kontrolna, w przeciwieństwie do biomasy namnażanej w bioreaktorze, charakteryzowała się postępującym spadkiem akumulacji izoflawonów (Ryc. 23A-C). W efekcie, w przypadku kultury wielkoskalowej można mówić o znacznym przedłużeniu „fazy produkcyjnej” w zawieszynie. Wysokie stężenia polifenoli utrzymywały się bowiem w omawianej tkance około dwóch tygodni podczas gdy w próbie kontrolnej był to okres zaledwie 4 dni. Tym samym, zabiegi technologiczne mające na celu zwiększenie poziomów biosyntezy badanych związków w fermentorze mogą być wykonywane w dużym przedziale czasowym, co jest korzystne z uwagi na otrzymywanie omawianych polifenoli.

Podsumowując przeprowadzone doświadczenia można stwierdzić, że z punktu widzenia pozyskiwania metabolitów wtórnych, kultury zawieszony *C. subternata*, prowadzone w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, wydają się być obiecującym źródłem połączeń izoflawonoidowych.



Ryc. 23. Zawartość 7-*O*- β -glukozydu kalikozyny (A), 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptigeniny (B) oraz 7-*O*- β -glukozydu formononetyny (C) w kulturach zawieszinowych *Cyclopia subternata* rosnących w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, w warunkach oświetlenia ciągłego. Próbę kontrolną stanowiła zawieszina *C. subternata* rosnąca w kolbach Erlenmeyera, przy oświetleniu ciągłym. Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 (kontrola) lub 2 (bioreaktor) prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

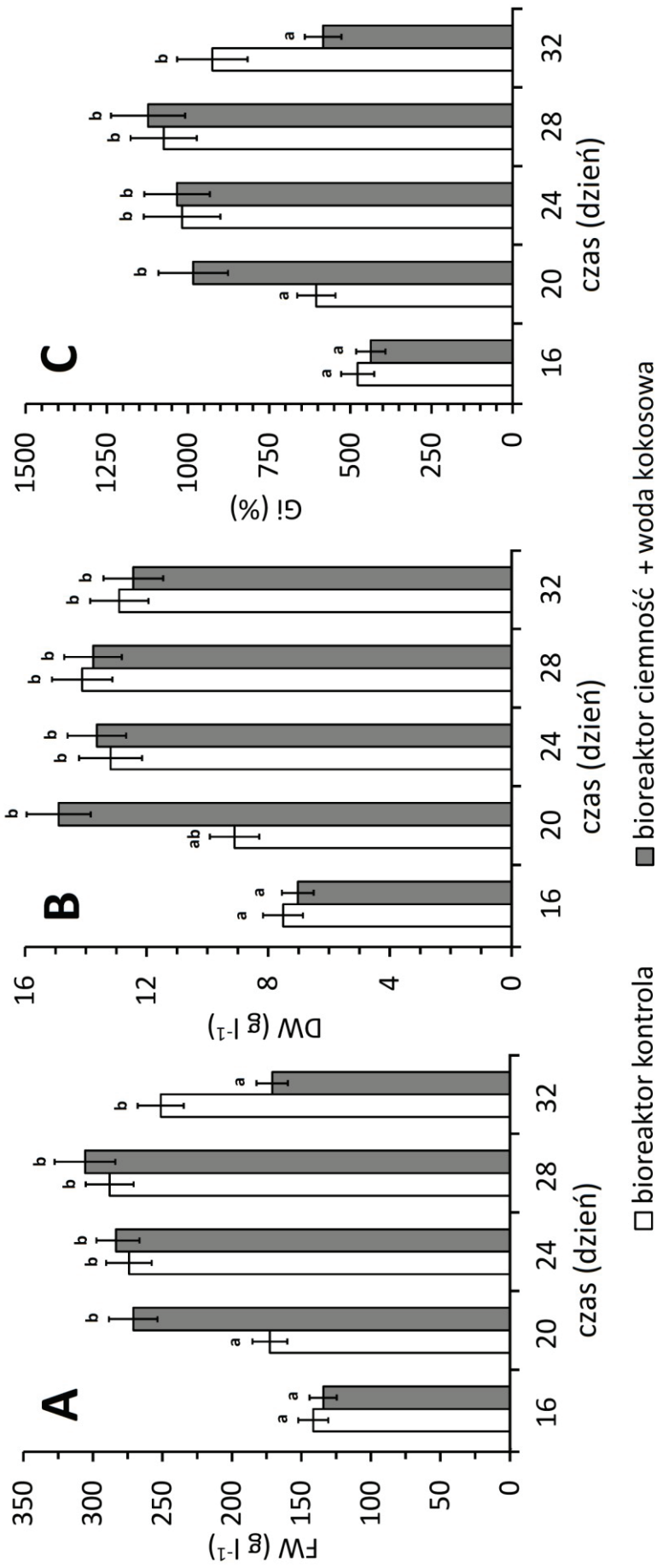
Produktywność uzyskanego systemu była jedynie nieznacznie obniżona w stosunku do hodowli referencyjnej. Aby uzyskać znaczną ilość biomasy o wysokiej zawartości izoflawonów, należało bowiem w omawianym przypadku dwukrotnie wydłużyć (do dnia 32) czas eksperymentu w stosunku do kultury odniesienia (maksimum produkcji w dniu 16) (Ryc. 23). W efekcie, niniejsza procedura skutkowała właśnie pewnym obniżeniem wydajności systemu hodowlanego, pod względem produkcji powyższych związków (odpowiednio 1,54 i 1,18 mg izoflawonów l⁻¹ d⁻¹ dla próby referencyjnej oraz instalacji wielkolaboratoryjnej – rozdz. II.1.2.2.3.4., Tab. 10). Uzyskane wyniki były na tyle obiecujące, że opracowany system roślinny na bazie zawieszin *C. subternata*, rosnących w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, w końcowym etapie doświadczeń, postanowiono przetestować w zmodyfikowanych warunkach, które na poziomie kultur wytrząsanych umożliwiły wzmoczoną produkcję badanych związków.

II.1.2.2.3.3. Wpływ braku oświetlenia i dodatku wody kokosowej na wzrost zawiesziny *Cyclopia subternata* w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym

Jak już wcześniej wspomniano, w celu zwiększenia produktywności kultury zawieszinowej *C. subternata* rosnącej w bioreaktorze, zastosowano w opisywanym eksperymencie modyfikację warunków oświetleniowych hodowli (całkowita ciemność) oraz suplementację pożywki wodą kokosową w 16 dniu (kultura *fed-batch*). Z uwagi na, wywołane napowietrzaniem, silne pienienie systemu hodowlanego oraz związane z tym powstawanie wielokomórkowych agregatów biomasy objętej nekrozą, podłoże wzrostowe wzbogacono dodatkowo standardowym (Junker, 2007), silikonowym środkiem przeciwpiennym (SE-15, Sigma-Aldrich). Eksperyment prowadzono przez 32 dni, zbierając tkanki i pożywkę w 16, 20, 24 i 28 dniu doświadczenia. Pozostałe dni cyklu wzrostowego pominięto na podstawie obserwacji wzrostu i produktywności kultur *C. subternata* namnażanych w bioreaktorze, w wersji podstawowej (Ryc. 22 i 23) oraz z uwagi na dostępność jedynie 2 fermentorów, co znacznie wydłużało czas przeprowadzenia pełnego eksperymentu.

Podobnie jak to miało miejsce w przypadku kultur wytrząsanych, modyfikacja warunków oświetleniowych oraz dokarmianie wodą kokosową zawiesziny rosnącej w bioreaktorze, nie spowodowało widocznych zmian w morfologii badanej tkanki. Biomasy poddane wymienionym zabiegom eksperymentalnym charakteryzowały się szybkim wzrostem, jasnożółtą barwą oraz brakiem widocznych zmian nekrotycznych do 28 dnia hodowli włącznie. Zgodnie z oczekiwaniami, dodatek środka przeciwpiennego w istotnym stopniu ograniczył adhezję komórek do ścian naczynia i powstawanie zwartych agregatów komórek.

Wymienione powyżej strategie hodowlane wpłynęły w istotnym stopniu na kinetykę przyrostu badanej kultury. Znaczne ilości zarówno świeżej jak i suchej masy (odpowiednio ok. 270 i 15 g l⁻¹) uzyskano już w 20 dniu cyklu wzrostowego (Ryc. 24A, B).



Ryc. 24. Wpływ braku oświetlenia oraz dodatku wody kokosowej (5,0 % v/v), w 16 dniu eksperymentu, na wzrost kultury zawieszinowej *Cyclopa subternata* prowadzonej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym. Profile wzrostowe wyrażono jako zmiany ilości świeżej (A) i suchej masy (B) oraz wartości współczynnika przyrostu (C) w cyklu hodowlanym. Próbę kontrolną stanowiła zawieszina *C. subternata* rosnąca w bioreaktorze, w warunkach pełnego oświetlenia bez suplementacji wodą kokosową. Odmiernymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 2 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

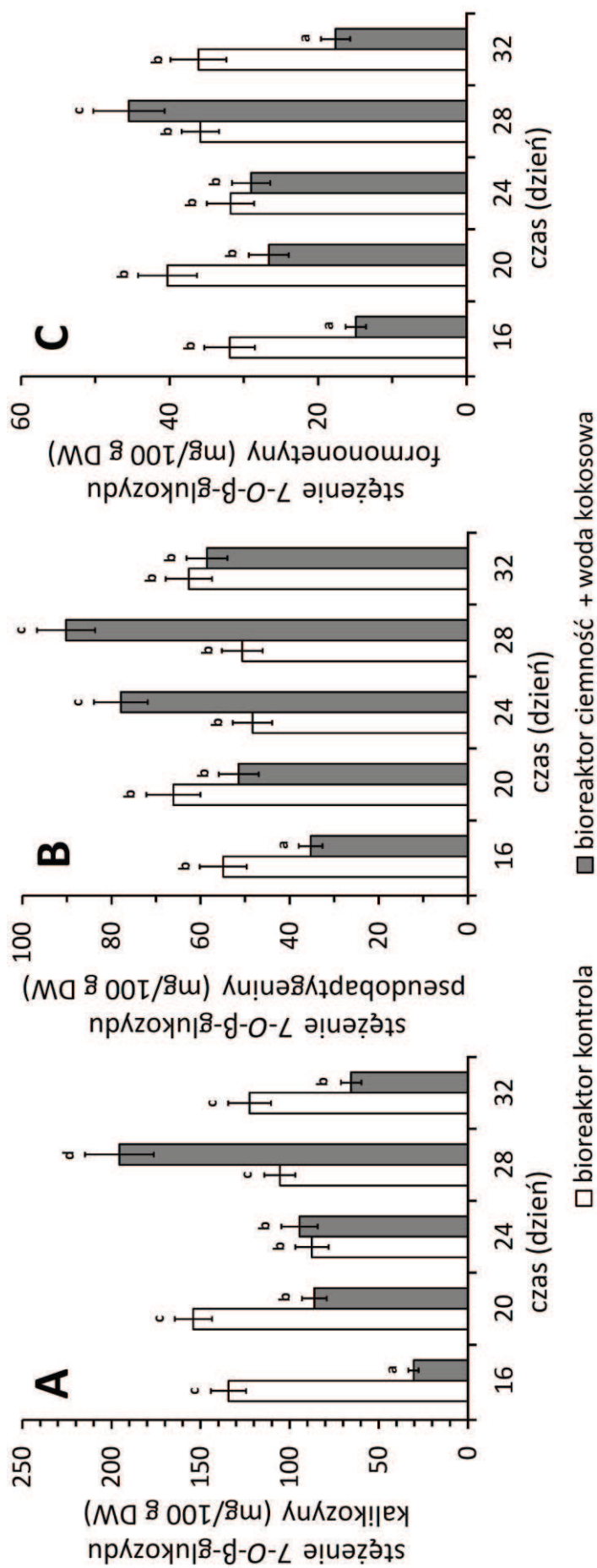
Wspomniane wartości były o ok. 50% wyższe w porównaniu z ilościami świeżej i suchej masy, a także wartością G_i , uzyskaną w dniu 20 w kulturze referencyjnej, prowadzonej w bioreaktorze przy pełnym oświetleniu bez dokarmiania (Ryc. 24A-C). Obserwowany wzrost ilości biomasy w krótkim czasie od momentu dodatku wody kokosowej (16 dzień) był analogiczny do rezultatów wcześniejszych doświadczeń, obejmujących suplementację kultur wytrząsanych wspomnianą mieszaniną odżywczą bez modyfikacji oświetlenia (rozdz. II.1.2.2.2.3.1. – Ryc. 14).

Jako, że w fermentorze oprócz dodatku wody kokosowej czynnikiem zmiennym były również warunki hodowli (ciemność), trudno uznać, że obserwowane zjawisko jest jedynie wynikiem dokarmiania zawiesiny. Specyfiką wzrostu zawiesin *C. subternata* rosnących w bioreaktorze, w warunkach zmodyfikowanych, są również charakterystyczne relacje między zawartością suchej (DW) i świeżej (FW) masy, przypadające na konkretne dni cyklu eksperymentalnego. Podczas gdy w fermentorze kontrolnym maksymalną wartość DW i FW osiągnięto w tym samym, 28 dniu hodowli, to w systemie modyfikowanym najwyższa zawartość suchej masy przypadała na dzień 20, a świeżej o wiele później, bo dopiero na dzień 28 (Ryc. 24A, B). Świadczy to o szybkim zakończeniu intensywnych podziałów komórkowych w kulturze „modyfikowanej”. Rosnące wartości FW dla omawianej zawiesiny są wynikiem postępującego uwodnienia komórek (Ryc. 24A). Obserwowane zjawisko, zgodnie z danymi literaturowymi, jest raczej wynikiem suplementacji pożywki wodą kokosową (Kononowicz i Janick, 1988; Al-Khayri i wsp., 1992), niż zastosowanym zaciemnieniem. Jako, że po 20 dniu poziomy suchej masy w bioreaktorze eksperymentalnym i kontrolnym utrzymywały się do 28 dnia na mniej więcej podobnym poziomie (Ryc. 24B), omówiony powyżej fenomen nie ma *de facto* bezpośredniego przełożenia na produktywność kultur.

II.1.2.2.3.4. Wpływ braku oświetlenia i dodatku wody kokosowej na akumulację związków polifenolowych w zawieszynie *Cyclopia subternata* namnażanej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym

Analiza chromatograficzna biomas uzyskanych w toku eksperymentu wykazała istotny wpływ braku oświetlenia oraz dokarmiania kultury wodą kokosową na akumulację polifenoli w zawieszynie *C. subternata*, rosnącej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym. Podobnie jak w przypadku hodowli wytrząsanych (rozdz. II.1.2.2.2.3.2. – Ryc. 15), obserwowane zmiany miały charakter wyłącznie ilościowy, w badanej kulturze stwierdzono bowiem obecność jedynie 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, magazynowanych wewnątrzkomórkowo.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowane zabiegi eksperymentalne powodują wyraźny wzrost zawartości wszystkich połączeń izoflawonoidowych, w stosunku do stężeń metabolitów oznaczonych w zawieszynie niedokarmianej, rosnącej w warunkach pełnego oświetlenia (bioreaktor kontrolny) (Ryc. 25A-C).



Ryc. 25. Wpływ braku oświetlenia oraz dodatku wody kokosowej (5,0 % v/v), w 16 dniu eksperymentu, na zawartość 7-O-β-glukozydu kalikozy (A), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (B) oraz 7-O-β-glukozydu formononetyny (C) w kulturze zawiesinowej *Cycloptia subternata*, prowadzonej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina *C. subternata* rosnąca w bioreaktorze, w warunkach pełnego oświetlenia, bez suplementacji wodą kokosową. Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 2 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Maksymalne stężenia 7-*O*- β -glukozydów kalikozy, pseudobaptygeniny i formononetyny wyniosły w omawianym przypadku odpowiednio ok. 200, 90 i 45 mg/100 g DW, co stanowiło 30, 40 i 12 % wzrost ich zawartości w porównaniu z najwyższymi stężeniami wymienionych związków w próbie kontrolnej (Ryc. 25A-C). W profilu akumulacji poszczególnych izoflawonów wyznaczono tylko jedno maksimum produkcji, przypadające na 28 dzień eksperymentu (Ryc. 25A-C). Co ciekawe, wcześniejsze doświadczenia wskazały, że zarówno kultury wytrząsane suplementowane wodą kokosową (II.1.2.2.2.3.2. – Ryc. 15), jak i hodowle prowadzone w bioreaktorze, w warunkach pełnego oświetlenia (rozdz. II.1.2.2.3.2. – Ryc. 23), charakteryzowały się dwoma wyraźnie zaznaczonymi maksimami produkcji izoflawonoidów. Odmienne rezultaty, uzyskane w toku niniejszego eksperymentu, mogły być spowodowane jedynie zmianą warunków oświetleniowych, bądź też stanowić wypadkowy efekt dokarmiania kultury wodą kokosową oraz prowadzenia doświadczenia w ciemności. Ze względu na duże koszty prowadzonych badań oraz dostępność tylko 2 bioreaktorów, niemożliwe było, w ograniczonych ramach czasowych trwania projektu, przeprowadzenie eksperymentów rozdzielających obydwie strategie hodowlane.

„Łączona” procedura doświadczalna, obejmująca wzrost zawiesiny *C. subternata* w warunkach całkowitej ciemności oraz dokarmianie jej wodą kokosową, umożliwiła podwyższenie produktywności badanych kultur zarówno w stosunku do podstawowej hodowli wytrząsanej, jak i biomasy rosnącej w bioreaktorze w warunkach pełnego oświetlenia (Tab. 10). Uzyskane wartości były jednak niższe w porównaniu do kultur prowadzonych w kolbach Erlenmeyera oddzielnie bez dostępu światła lub suplementowanych wodą kokosową. Rezultaty doświadczeń prowadzonych na poziomie bioreaktora wykazują tym samym, że efekty wymienionych strategii eksperymentalnych nie dopełniają się w stopniu dostatecznym by osiągnąć produktywność wyznaczoną dla odpowiednich kultur wytrząsanych *C. subternata* (Tab. 10).

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń osiągnięto podstawowy cel pracy, obejmujący uzyskanie roślinnego systemu *in vitro* do produkcji połączeń polifenolowych o spodziewanej aktywności biologicznej. Powyższe założenie zrealizowano w oparciu o zawiesinę parenchymatyczną *C. subternata*, rosnącą w zoptymalizowanej w toku projektu pożywce MS, suplementowanej 3,0 % w/v sacharozy, 20,19 μ M 4-PPU i 1,96 μ M 2,4,5-T. Opisana kultura charakteryzowała się obecnością unikatowego zespołu połączeń izoflawonoidowych, złożonego z 7-*O*- β -glukozydów kalikozy, pseudobaptygeniny i formononetyny, nieobecnych w roślinie gruntowej wymienionego gatunku. Zawiesina *C. subternata* nie zawierała ponadto szeregu metabolitów wtórnych charakterystycznych dla materiału gruntowego, w tym ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna) oraz flawanonu hesperydyny. Powyższe cechy, a także dynamiczny wzrost, czyniły z badanej biomasy doskonały materiał do opracowania wspomnianego systemu produkcyjnego.

Tab. 10. Wpływ braku oświetlenia oraz dodatku wody kokosowej na produktywność połączeń izoflawonoidowych w kulturach zawieszonych *Cyclopia subternata*, prowadzonych w kolbach Erlenmeyera oraz bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym.*

Warunki eksperymentalne ^a	Czas wzrostu biomasy (dni)	Produktywność (mg l ⁻¹ d ⁻¹)			
		7- <i>O</i> -β-glukozyd kalikozyny	7- <i>O</i> -β-glukozyd pseudobaptygeniny	7- <i>O</i> -β-glukozyd formononetyny	suma izoflawonów
kultury wytrząsane/oświetlenie ciągle (próba kontrolna)	16	0,74	0,31	0,49	1,54
kultury wytrząsane/ciemność	22	1,27	0,58	0,68	2,53
kultury wytrząsane/oświetlenie ciągle + woda kokosowa (16)	22	0,98	0,53	0,29	1,80
bioreaktor/oświetlenie ciągle	20	0,70	0,30	0,18	1,18
bioreaktor/ciemność + woda kokosowa (16)	28	0,96	0,44	0,22	1,62

* Produktywność kultury wyrażona jako ilość mg związku syntezowana w 1 l kultury w ciągu 1 dnia.

^a W nawiasie zaznaczono dzień suplementacji pożywki wodą kokosową.

Zastosowanie wybranych strategii retrobiosyntetycznych, elicytacji i immobilizacji, pozwoliło na wyłonienie procedur eksperymentalnych skutkujących polepszeniem parametrów wzrostowych zawiesiny *C. subternata* oraz podwyższeniem stężeń połączeń izoflawonoidowych akumulowanych w badanej biomacie. W dalszej kolejności, zoptymalizowano warunki do wzrostu powyższej kultury w bioreaktorze typu *stirred-tank* skonstruowanym w ramach opisywanego projektu. Wspomniana instalacja umożliwiła, w połączeniu z procedurami doświadczalnymi, obejmującymi prowadzenie hodowli w warunkach całkowitej ciemności oraz suplementację podłoża wodą kokosową, opracowanie wydajnego systemu *in vitro* zawierającego znaczne ilości izoflawonów. Produktywność powyższej kultury wyniosła odpowiednio 0,96, 0,44 i 0,22 mg l⁻¹ d⁻¹ dla 7-*O*-β-glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny. Kultury zawieszinowe *C. subternata*, prowadzone w bioreaktorze w zmodyfikowanych warunkach, stanowią kompletny etap *upstream* biotechnologicznego procesu otrzymywania wymienionych połączeń izoflawonoidowych. W połączeniu z opracowanymi równoległe procedurami *downstream*, dotyczącymi izolacji czystych produktów (frakcjonowana ekstrakcja, chromatografia kolumnowa oraz semipreparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa – rozdz. II.2.3. i III.2.4.), stworzony system umożliwił wybiórcze pozyskiwanie 7-*O*-β-glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny.

Zawiesina *C. subternata*, uzyskana w toku prezentowanych badań, stanowi pierwszy roślinny system *in vitro* ukierunkowany na produkcję powyższych związków. Eksperymenty obejmujące kultury bioreaktorowe korzeni odciętych gatunku *Astragalus membranaceus*, stanowiącego w warunkach naturalnych podstawowe źródło kalikozyny i jej 7-*O*-β-glukozydu, nie zostały jak dotąd zoptymalizowane pod względem produkcji wspomnianych połączeń (Wu i wsp., 2011). Spośród innych źródeł poszukiwanych

związków izoflawonoidowych wymienić należy gatunki *Trifolium pratense* i *Maackia amurensis*. Niestety, badania nad kulturami *in vitro* powyższych roślin nie wykazywały obecności pożądaných połączeń (Kašparová i wsp., 2009) bądź dotyczyły jedynie wstępnych eksperymentów nad biomasami kalusowymi (Fedoreyev i wsp., 2008). Co istotne, ograniczone są również zasoby naturalne roślin takich jak wspomniane już *A. membranaceus* i *M. amurensis* (Fedoreyev i wsp., 2008; Wu i wsp., 2011).

Obecne w zawiesinie *C. subternata* metabolity wtórne, tj. 7-*O*- β -glukozydy kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny, należą do grupy metoksyłowanych izoflawonoidów. Aktywność biologiczna wymienionych związków jest jednocześnie stosunkowo słabo poznana w porównaniu do izoflawonów o prostej budowie, co czyni ich pozyskiwanie opłacalnym z punktu widzenia planowanych badań farmakologicznych. Dotychczas stwierdzono między innymi ochronne działanie 7-*O*- β -glukozydu kalikozyiny w króliczym modelu choroby zwyrodnieniowej stawów (Choi i wsp., 2007). Wspomniany izoflawon i/lub jego metabolity wykazywały ponadto aktywność przeciwwirusową (Chen i wsp., 2011b), estrogeną (Chen i wsp., 2011a) i hamującą wytwarzanie melaniny (Kim i wsp., 2011). Drugi z wymienionych związków, tj. 7-*O*- β -glukozyd formononetyny, hamował spadek masy kości u owariektomizowanych szczurów (Ha i wsp., 2010) oraz wywierał pozytywny wpływ na metabolizm osteoblastów w ludzkim modelu choroby zwyrodnieniowej stawów (Huh i wsp., 2010). Powyższe dane wskazują na szerokie spektrum aktywności opisywanych związków, wydaje się ono jednak w znacznym stopniu niewykorzystane z uwagi na ich ograniczoną dostępność. Przykładowo, renomowany dostawca substancji pochodzenia roślinnego, firma Extrasynthese (Francja), posiada w swojej ofercie jedynie jeden spośród wymienionych metabolitów: 7-*O*- β -glukozyd formononetyny (ononina). Cena powyższego związku, przekraczająca 100 € za 5 mg, jest jednocześnie bardzo wysoka z punktu widzenia potrzeb szeroko rozumianych badań biomedycznych. Pewną alternatywę stanowią w tym względzie firmy azjatyckie, oferujące szereg substancji po znacznie niższych (jednak w dalszym ciągu wysokich) cenach. Przykładowo, koszt zakupu 20 mg 7-*O*- β -glukozydu kalikozyiny w firmie Phytomarker (Tianjin, Chiny) wynosił ok. 400 \$. Biorąc pod uwagę powyższe dane, opracowany w toku niniejszej pracy roślinny system *in vitro* może być z powodzeniem wykorzystany do pozyskiwania wspomnianych połączeń izoflawonoidowych.

II.1.3. Kultury pędowe *Cyclopia genistoides*

Kultury pędowe *C. genistoides*, których inicjację opisano w rozdz. II.1.1.3., stanowiły, obok kalusa *C. subternata*, materiał przeznaczony do prac biotechnologicznych ukierunkowanych na opracowanie roślinnego systemu do produkcji wybranych polifenoli w warunkach *in vitro*. Wybór wspomnianej biomasy uwarunkowany był stosunkowo szybkim wzrostem, a także zdolnością do biosyntezy ksantonów oraz pochodnych benzofenonu, nieobecnych w kulturach parenchymatycznych *Cyclopia* sp (rozd. II.1.1.4.).

Eksperymenty z użyciem pędów *in vitro* *C. genistoides* prowadzono dwutorowo. Obejmowały one z jednej strony opracowanie protokołu mikrorozmnażania

powyższego gatunku, co uzasadniono endemicznym charakterem badanej rośliny, z drugiej zaś strony dążono do uzyskania systemu pędowego do biotechnologicznego otrzymywania wymienionych wcześniej połączeń polifenolowych. Obydwa aspekty prowadzonych doświadczeń były ze sobą ściśle powiązane. Pracom nad mikrorozmnażaniem *C. genistoides* towarzyszyły analizy fitochemiczne uzyskanych biomas, pozwalające m.in. na określenie wpływu regulatorów wzrostu, dodawanych do podłoża, na poziom akumulacji metabolitów wtórnych z grupy ksantonów, flawanonów i benzofenonów. Uzyskane informacje wykorzystano następnie w trakcie eksperymentów ukierunkowanych na opracowanie systemu *in vitro* do pozyskiwania wybranych polifenoli w oparciu o kultury pędowe badanego gatunku, prowadzone w bioreaktorze.

II.1.3.1. Mikrorozmnażanie *Cyclopia genistoides*

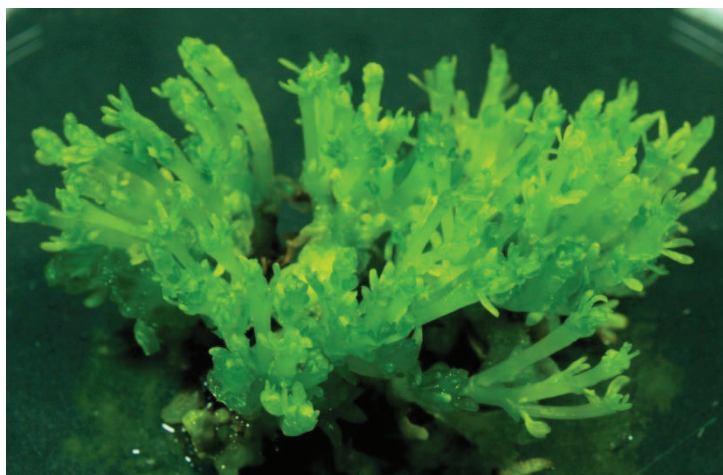
Rośliny z rodzaju *Cyclopia* należą do endemitów o ograniczonym zasięgu występowania. Rosnący popyt na herbatę honeybush stwarza ryzyko nadmiernej eksploatacji naturalnych stanowisk miodokrzewów, będących do niedawna jedynym źródłem surowca do celów komercyjnych (Joubert i wsp., 2008a, 2011). Dodatkowy problem stanowią pożary formacji roślinnej fynbos, stanowiącej naturalne siedlisko większości gatunków z rodzaju *Cyclopia*, prowadzące do poważnych deficytów surowca (Thomas, 2011). Aby ograniczyć zagrożenia środowiskowe związane ze zbiorem dziko rosnących roślin, a także zwiększyć wydajność produkcji omawianej herbaty, podjęto próby utworzenia plantacji miodokrzewów, z możliwością doboru do upraw roślin charakteryzujących się najlepszym wzrostem, wysoką zawartością związków aktywnych biologicznie oraz pożądanymi parametrami organoleptycznymi (Jones, 2004; Joubert i wsp., 2008a, 2011). Miodokrzewy do celów komercyjnych, uzyskuje się na niniejszych plantacjach poprzez wegetatywne rozmnażanie pędów. Pomimo licznych doświadczeń w tym zakresie, uzyskane rezultaty nie są w pełni zadowalające. Wynika to z faktu, że tradycyjne metody propagacji miodokrzewów są uzależnione od pory roku, co ogranicza okres pozyskiwania sadzonek do kilku miesięcy. Przykładowo, uzyskanie wysokiego stopnia ukorzenienia roślinek jest możliwe jedynie latem (86,0 %), zimą zaś wynosi ono tylko 8,4 % (Mbangcolo, 2008).

Jak wynika z danych literaturowych, skuteczne metody mikropropagacji roślin wyższych, zastosowane w przypadku wielu cennych gatunków, mogą dostarczyć w krótkim czasie znacznych ilości materiału dla upraw gruntowych niezależnie od pory roku, a także poza strefą ich naturalnego występowania. Tym samym, mogą one służyć ratowaniu roślin, których stanowiska naturalne są zagrożone. Techniki propagacji *in vitro* umożliwiają ponadto namnażanie materiału roślinnego o pożądanych właściwościach (szybki wzrost, odporność na szkodniki, wysoka zawartość metabolitów wtórnych), w celach komercyjnych. Pozyskane w toku opisywanych procedur rośliny wykazują także, w określonych przypadkach, cechy korzystne z punktu widzenia badań naukowych, takie jak identyczność genetyczna oraz całkowita sterylność (Rout i wsp., 2000; Debnath i wsp., 2006; Moyo i wsp., 2011).

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że nie opracowano do tej pory metody mikrorozmnażania roślin z rodzaju *Cyclopia*. Z tego względu, sformułowano oboczny cel projektu, którym było przedstawienie skutecznego protokołu namnażania miodokrzewów w warunkach *in vitro*, mogącego stanowić alternatywę dla obecnych zabiegów agrotechnicznych.

Do doświadczeń wybrano gatunek *C. genistoides*, najcenniejszy z uwagi na wysoką zawartość ksantonów (Joubert i wsp., 2003, 2008c). Jest on ponadto wydajniejszy od *C. intermedia* i *C. subternata* pod względem przyrostu biomasy (Joubert i wsp. 2008a, 2011). W związku z powyższym, wymieniona roślina wydaje się najbardziej odpowiednia do prowadzenia masowych upraw. Procedury mikrorozmnażania postanowiono przeprowadzić metodą bezpośrednią, z pominięciem powstawania kalusa oraz biomasy embriogenicznej, które mogą powodować szeroko rozumiane zmiany w profilu genetycznym namnażanego gatunku. Optymalizację kolejnych etapów mikrorozmnażania, a więc uzyskanie kultur mikropędowych, multiplikację i wydłużanie pędów, a także ryzogenezę realizowano więc poprzez dobór odpowiedniej kompozycji regulatorów wzrostu, węglowodanów oraz soli mineralnych w podłożu hodowlanym (Rout i wsp., 2000; Debnath i wsp., 2006). Metoda ta okazała się skuteczna m.in. w przypadku mikrorozmnażania pokrewnych miodokrzewom roślin z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz i Piotrowski, 2005).

Eksplantatami inicjalnymi w opisywanych procedurach były kultury mikropędowe *C. genistoides*, rosnące na stacjonarnym (0,6 % w/v agaru) podłożu SH z dodatkiem 9,84 μ M 2iP i 1,0 μ M TDZ (rozdz. II.1.1.3.). Jak omówiono uprzednio, uzyskanie pierwotnej, primordialnej biomasy pędowej badanego gatunku okazało się wyjątkowo trudne. Jedynie z eksplantatów, które stanowiły szczytowe fragmenty siewek miodokrzewu, w opisanych warunkach, otrzymano kultury mikroroslinek. Morfologia namnożonych mikropędów nie była niestety tożsama z rośliną macierzystą. Uzyskana tkanka nie była stabilna, ulegała procesowi szklenia, przy podstawie przekształcała się w zwarty, kalafiorowaty kalus i szczególnie w trakcie 4 pierwszych pasaży, wykazywała zmiany nekrotyczne związane z produkcją prostych fenoli. Ostatecznie, otrzymane po kilku kolejnych pasażach kultury inicjalne nadawały się do prowadzenia dalszych doświadczeń biotechnologicznych, nie były jednak gotowe do ukorzenia (Fot. 11). Z uwagi na powyższe, trudno jednoznacznie zakwalifikować opisany proces jako klasyczny, pierwszy etap mikrorozmnażania. Postanowiono więc niniejszą, najbardziej czasochłonną procedurę określić jako wstępne pozyskiwanie eksplantatów roślinnych, nazwanych dalej „pośrednimi” (rozdz. III.1.7.1.1.), w przeciwieństwie do „pierwotnych”, które stanowiły wierzchołki jałowych siewek *C. genistoides* (rozdz. II.1.1.3. oraz III.1.5.2.). Właściwy protokół mikrorozmnażania stanowiły zaś eksperymenty opisane od tego momentu czyli przeprowadzenie multiplikacji, elongacji oraz ukorzenia pędów, a następnie aklimatyzacji zregenerowanych roślinek.



Fot. 11. Kultura pędowa *Cyclopia genistoides*, prowadzona na zmodyfikowanej, stacjonarnej pożywce SH, suplementowanej 9,84 μM 2iP i 1,0 μM TDZ, wykorzystywana jako źródło eksplantatów „pośrednich” do prowadzenia eksperymentów z zakresu mikrorozmnażania.

Równoległe do prowadzonych doświadczeń biotechnologicznych wykonano analizy chromatograficzne HPLC biomas uzyskanych na poszczególnych etapach procedury mikrorozmnażania. Celem przeprowadzonych oznaczeń było, z jednej strony, potwierdzenie identyczności składu jakościowego roślin zregenerowanych oraz surowca referencyjnego, pod względem związków polifenolowych, z drugiej zaś określenie wpływu morfogenezy na profil metaboliczny biomas *C. genistoides*, namnażanych w warunkach *in vitro*.

II.1.3.1.1. Multiplikacja pędów

Na pierwszym etapie opisywanej procedury mikrorozmnażania postanowiono uzyskać stabilne kultury mikropędowe *C. genistoides* zdolne do szybkiej multiplikacji, a tym samym zapewniające dużą ilość wyjściowej biomasy primordialnej. Doświadczenia w tym zakresie wykonano na pożywce Schenka-Hildebrandta (SH), opisanej w rozdz. II.1.1.3. jako optymalnej do prowadzenia kultur *in vitro* badanego gatunku. Zgodnie z danymi literaturowymi (Rout i wsp., 2000; Rathore i wsp., 2004; Debnath i wsp., 2006), niniejsze podłoże wzbogacano dodatkiem regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin, określając ich przydatność w tworzeniu kultury zawierającej jak największą ilość primordiów pędowych.

Wpływ cytokinin na powstawanie i morfologię pędów badano poprzez umieszczenie eksplantatów „pośrednich” na pożywkach suplementowanych związkami o budowie purynowej, tj. benzyloadeniną (BAP) oraz (6- γ,γ -dimetyloallilo)-aminopuryną (2iP), i/lub pochodną fenylolewnicy (tidiazuron, TDZ) (Tab. 11). Wybór powyższych regulatorów wzrostu uzasadniony był rezultatami wcześniejszych badań z zakresu mikrorozmnażania roślin strączkowych. Wskazują one na BAP jako jedną z najczęściej stosowanych cytokinin, wykorzystywanych do indukcji mikropędów w kulturach *in vitro* wybranych gatunków z rodziny Fabaceae (Saafi i Borthakur, 2002; Barik i wsp., 2007; Buendia-Gonzales i wsp., 2007). Do mniej popularnych

fitohormonów, stymulujących morfogenezę, należą 2iP oraz jedna z najsilniejszych syntetycznych cytokinin – tidiazuron (TDZ). Wymienione regulatory wzrostu stosowano podczas mikropropagacji szeregu roślin motylkowych, w tym: *Phaseolus vulgaris*, *Vigna* sp. (Mohamed i wsp., 1992; Nagl i wsp., 1997), *Leucaena leucocephala* (Maity i wsp., 2005), *Mucuna pruniens* (Faisal i wsp., 2006), *Psoralea corylifolia* (Faisal i Anis, 2006) i *Genista* sp. (Łuczkiwicz i Piotrowski, 2005).

W grupie auksyn, zdecydowano się na wybór kwasu indolilo-3-masłowego (IBA), ze względu na jego pozytywny wpływ na morfologię eksplantatów (ograniczenie wiotryfikacji), szczególnie w przypadku jednoczesnej suplementacji pożywki cytokininami (Rout i wsp., 2000). Eksperymentalnie wykazano również, że dodatek IBA jedynie w nieznacznym stopniu pobudza wytwarzanie kalusa (Łuczkiwicz i Piotrowski, 2005), co było korzystne z uwagi na podstawowy cel zaplanowanych doświadczeń, tj. opracowanie protokołu mikrorozmnażania miodokrzewów.

Wymienione powyżej regulatory wzrostu dodawano do podłoża eksperymentalnych w stężeniach powszechnie stosowanych podczas prac nad namnażaniem roślin wyższych w warunkach *in vitro* (Rout i wsp., 2000; Debnath i wsp., 2006). W ramach doświadczenia, eksplantaty pośrednie (Fot. 11) umieszczano na zmodyfikowanych, pod względem zawartości fitohormonów, pożywkach stacjonarnych SH (rozdz. III.1.7.1.1.; Tab. 22). Pędy zbierano po upływie 30 dni, po czym oceniano ich morfologię biorąc pod uwagę takie kryteria jak nasilenie zjawiska szklenia, tworzenie tkanki przyrannej oraz obecność zmian nekrotycznych. Określano przy tym ilość i średnią długość mikropędów powstałych przy zastosowaniu poszczególnych kompozycji regulatorów wzrostu (modyfikacje M1-M15 – Tab. 11). Próbkę kontrolną stanowiła kultura M0, prowadzona na podłożu SH pozbawionym fitohormonów (Tab. 11).

W pierwszej kolejności, postanowiono określić wpływ cytokinin na indukcję mikropędów w kulturach *in vitro* *C. genistoides*. W tym celu, eksplantaty umieszczano na podłożach M4, M6 i M9 (Tab. 11), suplementowanych tylko jednym fitohormonem ze wspomnianej grupy (tj. 2iP, TDZ albo BAP). Powyższy eksperyment wykazał, że obecność TDZ jest kluczowa dla powstawania dużej ilości primordiów pędowych w biomacie *C. genistoides*. Spośród wymienionych modyfikacji, jedynie kultura suplementowana danym fitohormonem (M6) charakteryzowała się statystycznie wyższą, w stosunku do próby kontrolnej, ilością mikropędów/eksplantat (6,7; Tab. 11). Z drugiej strony, powstałe w omawianym przypadku mikropędy były wyraźnie krótsze (7,1 mm), w porównaniu z kulturami suplementowanymi 2iP (M6), BAP (M9), bądź pozbawionymi regulatorów wzrostu (M0) (Tab. 11). Opisane rezultaty wydają się zależeć w większym stopniu od obecności określonej substancji w medium hodowlanym, niż od zastosowanej dawki fitohormonu. Zgodnie z powyższym, podwyższenie stężenia poszczególnych cytokinin w podłożach wzrostowych nie spowodowało dalszego zwiększenia ilości powstających mikropędów (modyfikacja M7, dodatek TDZ), bądź proces ten nie był istotny statystycznie (modyfikacja M5, dodatek 2iP). W obydwu omawianych przypadkach (tj. modyfikacjach M5 i M7), zwiększona podaż fitohormonu skutkowała natomiast wzrostem średniej długości pędów w warunkach *in vitro* (Tab. 11).

Tab. 11. Wpływ regulatorów wzrostu na ilość, długość oraz morfologię powstających mikropędów w kulturach pędowych *Cyclopia genistoides*, prowadzonych na podłożu Schenka-Hildebrandta (SH).*

Kod modyfikacji	Regulatory wzrostu (μM)				Charakterystyka eksplantatu ^a			Ilość mikropędów na eksplantat ^b	Długość mikropędów (mm) ^b
	2iP	BAP	TDZ	IBA	K	O	P		
M0	-	-	-	-	-	+	-	4,8 \pm 0,8 ^a	20,6 \pm 6,5 ^h
M1	9,84	-	1,0	-	+	-	-	8,2 \pm 1,3^d	6,9 \pm 0,5^a
M2	9,84	-	2,27	-	+	-	+	5,7 \pm 1,3 ^b	10,1 \pm 1,3 ^c
M3	9,84	-	4,54	-	+	+	+	5,6 \pm 1,0 ^b	11,0 \pm 1,7 ^{cd}
M4	9,84	-	-	-	-	-	-	4,7 \pm 0,9 ^a	19,0 \pm 4,2 ^{gh}
M5	24,6	-	-	-	-	+	-	5,6 \pm 0,9 ^b	21,1 \pm 5,2 ^h
M6	-	-	1,0	-	+	-	-	6,7 \pm 1,0 ^c	7,1 \pm 0,7 ^a
M7	-	-	4,54	-	+	+	+	6,1 \pm 1,2 ^{bc}	12,4 \pm 3,0 ^d
M8	-	8,88	1,0	-	+	-	+	10,8 \pm 2,0 ^f	9,5 \pm 0,8 ^{bc}
M9	-	8,88	-	-	-	-	-	4,5 \pm 0,7 ^a	18,1 \pm 3,4 ^{fh}
M10	-	-	-	4,92	-	-	-	4,5 \pm 0,8 ^a	17,1 \pm 3,0 ^{efg}
M11	-	-	-	14,76	-	+	-	4,9 \pm 0,7 ^a	18,6 \pm 4,4 ^{eh}
M12	-	-	1,0	4,92	+	+	-	9,8 \pm 1,8 ^{ef}	10,0 \pm 1,0 ^c
M13	9,84	-	1,0	4,92	+	-	-	7,8 \pm 1,6 ^d	10,2 \pm 1,0 ^c
M14	9,84	-	1,0	14,76	+	+	-	8,8 \pm 1,8 ^{de}	10,0 \pm 1,0 ^c
M15	9,84	-	1,0	24,6	+	+	-	9,9 \pm 2,5 ^{ef}	9,1 \pm 0,6 ^b

* Pogrubionym tekstem zaznaczono modyfikację zastosowaną w opracowanej procedurze mikrorozmnażania.

^a Zastosowane symbole: **K**, powstawanie kalusa; **O**, obsychanie szczytów pędów; **P**, powstawanie liści potwornych; znaki „+” i „-” oznaczają występowanie lub brak danej cechy.

^b Dane przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 18 prób \pm SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test DMRT).

Poza odmiennym wpływem użytych cytokinin na ilość i długość powstających mikropędów, kultury prowadzone na podłożach suplementowanych powyższymi regulatorami wzrostu wykazywały wyraźne różnice w morfologii. W przeciwieństwie do biomas rosnących na pożywce 0 lub wzbogaconej pochodnymi adeniny (2iP lub BAP), posiadających wygląd zbliżony do młodych części rośliny gruntowej (wiotkie łodygi, delikatne, lancetowate listki o żywozielonej barwie), hodowla suplementowana TDZ charakteryzowała się obecnością silnie zwitryfikowanych, krótkich mikropędów o zdeformowanych liściach, a także powstawaniem tkanki przyrannej u podstawy eksplantatów. Niekorzystne zmiany w morfologii kultur, manifestujące się dodatkowo powstawaniem liści potwornych i obsychaniem wierzchołków eksplantatów, nasilały się na skutek zwiększania ilości TDZ w pożywce. Powyższe obserwacje (modyfikacja M7 – Tab. 11) są zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi na wymienione cechy

morfologiczne jako typowe dla pędów rosnących w obecności tidiazuronu (Mohamed i wsp., 1992; Neves i wsp., 2001; Zhao i wsp., 2003/4). Niepożądane efekty, w postaci obumierania szczytów pędów, obserwowano także w przypadku podwyższonego stężenia 2iP (modyfikacja M5 – Tab. 11), były one jednak słabiej zaznaczone w porównaniu do zmian indukowanych dodatkiem TDZ.

Kolejne etapy doświadczeń obejmowały określenie wpływu jednoczesnej suplementacji pożywki pochodnymi benzyloadeniny i fenylomocznika, na ilość i długość formujących się mikropędów *C. genistoides*. Dostępne dane literaturowe wskazują, że dodatek do medium wzrostowego 2 cytokinin, np. TDZ razem z BAP (Cheong i Pooler, 2003; Prakash i wsp., 2006; Husain i wsp., 2007) lub TDZ i 2iP (Łuczkiwicz i Piotrowski, 2005), wywiera niejednokrotnie synergistyczny, stymulujący wpływ na powstawanie primordiów pędowych.

Przeprowadzony eksperyment wykazał, że zastosowane 2iP łącznie z TDZ spowodowało istotny wzrost średniej ilości mikropędów *C. genistoides* na eksplantat (8,1 dla modyfikacji M1), w stosunku do kultur prowadzonych jedynie z dodatkiem TDZ (6,7, modyfikacja M6) lub 2iP (4,7, modyfikacja M4) (Tab. 11). Oznaczona, w danym wypadku, średnia długość mikropędów (6,9 mm) pozostała przy tym zbliżona do hodowli suplementowanej wyłącznie tidiazuronem (7,1 mm, modyfikacja M6). Dalsze zwiększanie stężenia pochodnej fenylomocznika, przy zachowaniu tego samego, 9,84 μ M dodatku 2iP, powodowało spadek ilości powstających mikropędów oraz jednoczesny wzrost ich długości (pożywki M2 i M3 – Tab. 11). Synergistyczny efekt, w zakresie indukcji primordiów pędowych, obserwowano także w przypadku jednoczesnej suplementacji podłoża BAP i TDZ (modyfikacja M8), skutkującej największą, w opisywanej serii doświadczeń, ilością mikropędów na eksplantat (10,8; Tab. 11).

Analiza morfologiczna kultur pędowych *C. genistoides*, prowadzonych z dodatkiem 2 cytokinin (modyfikacje: M1, M2, M3 i M8) wykazała, że posiadają one cechy zbliżone do eksplantatów rosnących jedynie w obecności TDZ (modyfikacje M6 i M7). Wspomniane biomasy charakteryzowały się występowaniem silnie zwitryfikowanych mikropędów, a także powstawaniem kalusa w miejscu kontaktu tkanki z podłożem wzrostowym. Dodatkowo dla modyfikacji M2 i M3 o zwiększonej zawartości TDZ, a także dla pożywki M8, suplementowanej obok tidiazuronu BAP, stwierdzono niekorzystną obecność liści potwornych (Tab. 11). Z uwagi na powyższe, opisywanych modyfikacji nie uwzględniono w dalszych eksperymentach.

Uzyskane dane dowodzą, że spośród badanych cytokinin, tidiazuron wywiera najsilniejszy wpływ na powstawanie oraz specyficzne cechy morfologiczne pędów *in vitro* *C. genistoides*. Aby ograniczyć omówiony powyżej, negatywny wpływ niniejszego fitohormonu na parametry wzrostowe oraz wygląd powstających mikroślinek (szklenie, obecność liści potwornych), konieczne jest przestrzeganie ilości wspomnianego regulatora wzrostu w pożywce maksymalnie do 1 μ M. W tym miejscu należy zaznaczyć, że testowane pochodne adeniny (2iP, BAP) stymulowały formowanie mikropędów jedynie w obecności TDZ, na zasadzie synergizmu działania.

Oprócz określenia wpływu cytokinin na wzrost i morfologię pędów *C. genistoides*, w ramach prowadzonych doświadczeń pożywki eksperymentalne suplementowano również kwasem indolilo-3-masłowym (IBA). Wykazano, że dodatek

powyższej auksyny, niezależnie od zastosowanego stężenia, nie zmienia w istotny sposób ilości oraz długości powstających mikropędów (modyfikacje M10 i M11 – Tab. 11), w stosunku do próby kontrolnej (modyfikacja M0). W porównaniu do kultury prowadzonej bez regulatorów wzrostu, dodatek 4,92 μM IBA poprawiał jednak wyraźnie żywotność eksplantatów, co wiązało się ze zmniejszeniem ich witrifikacji oraz ograniczeniem zasychania wierzchołków pędów. Należy przy tym zaznaczyć, że wymienionych korzystnych zmian nie obserwowano w przypadku zastosowania wyższych stężeń IBA (modyfikacja M11). Wobec powyższego, w dalszej kolejności, postanowiono określić wpływ wymienionej auksyny, stosowanej łącznie z TDZ i/lub 2iP (modyfikacje M12-M15 – Tab. 11) na ilość, długość oraz morfologię powstających mikropędów. Kierowano się przy tym danymi literaturowymi, dowodzącymi, że jednoczesna suplementacja podłoża cytokininami i auksynami, korzystnie indukuje powstawanie większej liczby primordiów pędowych (Rout, 2005). W przypadku testowanych gatunków, wspomniany zabieg umożliwił uzyskanie eksplantatów o cechach morfologicznych rośliny macierzystej już na etapie multiplikacji pędów. Tym samym, możliwe było pominięcie fazy elongacji i opracowanie wydajnego, 1-etapowego protokołu mikrorozmnażania (Rout i wsp., 2000). Korzystne efekty, związane z dodatkiem IBA do pożywki wzrostowej, uzyskano między innymi podczas mikropropagacji spokrewnionych z miodokrzewami roślin z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz i Piotrowski, 2005). Przeprowadzone w ramach niniejszego projektu doświadczenia dowiodły, że opisana powyżej strategia hodowlana nie wpłynęła na ilość powstających primordiów pędowych (modyfikacje M13 i M14) lub proces ten indukowała nieznacznie (modyfikacje M12 i M15 – Tab. 11). Mikropędy *C. genistoides* uzyskane na wspomnianych podłożach były natomiast nieznacznie dłuższe w porównaniu z kulturami prowadzonymi jedynie z dodatkiem cytokinin (modyfikacje M1 i M6 – Tab. 11). Niestety, morfologia pędów rosnących na pożywkach M12-M15 była niekorzystna, z uwagi na nasilone zamieranie wierzchołków pędowych oraz powstawanie tkanki przyrannej u podstawy eksplantatów.

Podsumowując, obecność tidiazuronu w pożywce wzrostowej okazała się kluczowa dla uzyskania dużej ilości mikropędów w kulturach *in vitro* *C. genistoides*. W przeciwieństwie do powyższego fitohormonu, cytokininy z grupy benzyloadeniny (2iP i BAP) jedynie słabo stymulowały powstawanie primordiów pędowych. Najlepsze rezultaty w tym względzie osiągnięto z wykorzystaniem pożywki M1, suplementowanej 2iP (9,84 μM) i TDZ (1,0 μM), którą wybrano jako optymalną do multiplikacji pędów badanego gatunku. Nie powiodły się jednocześnie próby opracowania jednoetapowego protokołu mikrorozmnażania *C. genistoides*, z wykorzystaniem podłoży wzbogaconych IBA. Ze względu na obserwowaną, w kulturach prowadzonych na podłożu M1, silną witrifikację i formowanie tkanki przyrannej, konieczne było zastosowanie dodatkowego etapu w procedurze mikrorozmnażania, umożliwiającego uzyskanie eksplantatów miodokrzewu o morfologii zbliżonej do rośliny gruntowej.

II.1.3.1.2. Elongacja pędów

Wybór podłoża, wykorzystywanego do elongacji eksplantatów, uwarunkowany był rezultatami opisanych powyżej doświadczeń, obejmujących określenie wpływu wybranych auksyn i cytokinin na wzrost mikropędów *C. genistoides*. Wykazały one m.in. korzystny udział kwasu indolilo-3-masłowego w formowaniu właściwych dla gatunku cech morfotycznych. W szczególności, warunkował on zachowanie dużej żywotności wierzchołków eksplantatów, co było kluczowe w planowanym etapie elongacji pędów. Z uwagi na powyższe, badane biomasy *C. genistoides* kultywowano celem wydłużania na zmodyfikowanych podłożach SH, suplementowanych 4,92 μM IBA (modyfikacja M10 – Tab. 12; rozdz. III.1.7.1.2. – Tab. 23).

Tab. 12. Wpływ czasu elongacji oraz składu pożywki Schenka-Hildebrandta (modyfikacje pod względem zawartości sacharozy oraz soli mineralnych), na długość i morfologię pędów *Cyclopia genistoides*.*

Kod modyfikacji	Czas elongacji (dni)	Modyfikacja pożywki ^a	Charakterystyka eksplantatu ^b			Długość pędów (mm) ^c
			B	O	L	
M10	30	-	-	-	-	23,9 ± 6,8 ^a
M10	60	-	+	+	+	41,7 ± 14,7 ^b
E1	30	½S	-	-	-	24,1 ± 5,2 ^a
E1	60	½S	-	-	-	51,7 ± 10,9^c
E2	30	½SN	-	+	-	24,4 ± 10,1 ^a
E2	60	½SN	-	+	-	25,3 ± 8,0 ^a

* Wszystkie podłoża stosowane na etapie wydłużania suplementowano 4.92 μM IBA. Pogrubionym tekstem zaznaczono schemat elongacji zastosowany w opracowanej procedurze mikrorozmnażania.

^a ½S, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy; ½SN, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy oraz azotanów amonu i potasu.

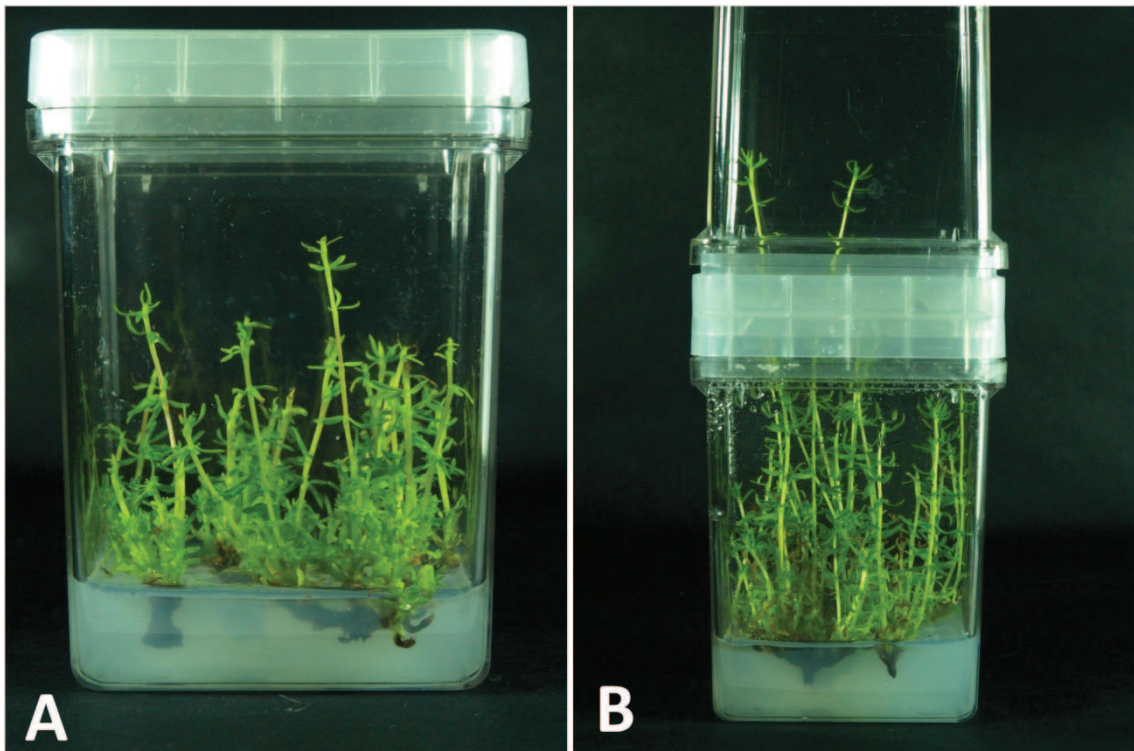
^b B, brązowienie eksplantatu; O, obsychanie szczytów pędów; L, opadanie liści; znaki „+” i „-” oznaczają występowanie lub brak danej cechy.

^c Dane przedstawione w tabeli stanowią średnie arytmetyczne z 18 prób \pm SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test DMRT).

Morfologia pędów, rosnących na pożywce M10 przez 30 dni, była zbliżona do rośliny gruntowej. W dalszym ciągu widoczna była jednak w ich przypadku witrifikacja, co najprawdopodobniej wiązało się z obecnością tidiazuronu, który nie został w pełni usunięty z tkanek roślinnych. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniejszymi doniesieniami, wskazującymi na konieczność kilkukrotnego pasażowania biomas na podłożach pozbawionych cytokinin, w celu całkowitego zniwelowania efektu wywieranego przez wspomniane fitohormony (Zhao i wsp., 2003/4; Mundhara i Rashid, 2006; Husain i wsp., 2007). Ze względu na powyższe, postanowiono przedłużyć okres elongacji pędów *C. genistoides* do 60 dni. W tym celu, eksplantaty rosnące na pożywce suplementowanej IBA, przez pełen cykl hodowlany, przenoszono na świeże podłoża o tym samym składzie na kolejne 30 dni, po czym oceniano ich morfologię oraz wyznaczano średnią długość mikropędów. Rezultatem

opisywanego doświadczenia było dalsze wydłużenie pędów oraz całkowity zanik wiotryfikacji tkanek. Niestety, odnotowano również niekorzystne zmiany w postaci zasychania wierzchołków eksplantatów oraz opadanie liści (Tab. 12). Zgodnie z danymi literaturowymi, jedną z przyczyn powyższego zjawiska mogło zbyt duże ciśnienie osmotyczne pożywki (Rout i wsp., 2000; Gou i wsp., 2006; Buendia-Gonzales i wsp., 2007; Husain i wsp., 2007; Bairu i wsp., 2009). Aby uniknąć wystąpienia opisanych procesów nekrotycznych, postanowiono przeprowadzić 2-etapową, 60-dniową procedurę elongacji pędów z wykorzystaniem pożywek o zmniejszonej zawartości sacharozy i/lub składników mineralnych (Tab. 12).

Zastosowanie, na pierwszym etapie elongacji, podłoża o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy (modyfikacja E1), nie spowodowało wyraźnych zmian w średniej długości oraz morfologii pędów, w porównaniu do kultur rosnących na pożywce M10. W tym wypadku, mikrośliski *C. genistoides* charakteryzowały się dobrą żywotnością, nie zaobserwowano ponadto symptomów mogących świadczyć o niedoborze substancji odżywczych (Fot. 12A).



Fot. 12. Pędy *Cyclopia genistoides* poddane 30- (A) i 60-dniowej (B) elongacji na stacjonarnej, zmodyfikowanej pożywce SH, suplementowanej 4,92 μ M IBA i charakteryzującej się zmniejszoną o połowę zawartością sacharozy.

Istotne różnice odnotowano natomiast w przypadku rosnących na pożywce E1 eksplantatów 60-dniowych, które były wyraźnie dłuższe, a także pozbawione zmian nekrotycznych, w porównaniu do pędów poddanych elongacji na podłożu M10, (Tab. 12, Fot. 12B).

Dodatkowe zubożenie medium wzrostowego pod względem składników mineralnych okazało się niekorzystne, powodowało bowiem zahamowanie wzrostu mikroroślinek oraz ich zasychanie (modyfikacja E2 – Tab. 12).

Z uwagi na opisane powyżej rezultaty doświadczeń, elongację pędów *C. genistoides* postanowiono prowadzić na podłożu SH o zmniejszonej zawartości sacharozy, suplementowanym 4,92 μ M IBA (modyfikacja E1). Poddane niniejszej procedurze 30- i 60-dniowe eksplantaty przeznaczono do dalszych eksperymentów, obejmujących ukorzenianie wydłużonych pędów oraz aklimatyzację zregenerowanych roślin.

II.1.3.1.3. Ukorzenianie i aklimatyzacja

Rezultaty przeprowadzonych wcześniej doświadczeń, obejmujących multiplikację i elongację pędów *C. genistoides*, wskazywały, że ukorzenianie wspomnianej rośliny w warunkach *in vitro* jest stosunkowo trudne. Na żadnym ze wspomnianych powyżej etapów mikrorozmnażania nie stwierdzono bowiem powstawania korzeni, zarówno spontanicznego, jak i indukowanego regulatorami wzrostu. Ryzogenezy nie obserwowano nawet w przypadku eksplantatów rosnących na pożywkach wzbogaconych IBA, który jest jedną z częściej stosowanych auksyn, stymulujących ukorzenianie w kulturach *in vitro* roślin z rodziny Fabaceae (Nagl i wsp., 1997; Rout i wsp., 2000; Beck i Dunlop, 2001). Z uwagi na powyższe, zdecydowano się na zastąpienie omawianego fitohormonu kwasem α -naftylooctowym (NAA), wykazującym niekiedy większą skuteczność od IBA, w zakresie indukcji ryzogenezy w kulturach *in vitro* szeregu gatunków bobowatych. Stosowano go m.in. w czasie mikrorozmnażania takich roślin jak *Clitoria ternatea* (Rout, 2005), *Sophora flavescens* (Zhao i wsp., 2003/4), *Cercis yunnanensis* (Cheong i Pooler, 2003) i *Genista* sp. (Łuczkiwicz i Piotrowski, 2005).

Podobnie jak podczas elongacji eksplantatów, w doświadczeniu postanowiono wykorzystać pożywki o składzie zubożonym pod względem zawartości sacharozy i/lub soli mineralnych (Tab. 13; rozdz. III.1.7.1.3. – Tab. 24), opisywane jako bardziej odpowiednie do pobudzania wzrostu korzeni w kulturach *in vitro* (Rout i wsp., 2000; Rathore i wsp., 2004; Rout, 2005, Faisal i wsp., 2006).

Wykazano, że skuteczność zastosowanej procedury ukorzeniania jest wyraźnie uzależniona od rodzaju eksplantatu. Ryzogenezę na pożywkach R1 (zmniejszona ilość sacharozy) oraz R2 (obniżone stężenie sacharozy oraz soli mineralnych) zaobserwowano jedynie dla pędów poddanych 60-dniowej elongacji. Niestety, udział eksplantatów tworzących korzenie był w obydwu przypadkach bardzo niski (1 %, Tab. 13). Jak wskazują dane literaturowe, jedną z przyczyn braku skuteczności procedur ukorzeniania może być utlenienie, a co za tym idzie, dezaktywacja auksyn obecnych w podłożu i/lub badanych biomasach (De Klerk i wsp., 1999; Kumar i wsp., 2005; Husain i wsp., 2007). Z uwagi na powyższe, pożywkę wzrostową zawierającą NAA suplementowano dodatkowo kwasem cytrynowym (modyfikacja R3), stosowanym często jako przeciwutleniacz w warunkach roślinnych kultur *in vitro* (Prakash i wsp., 2006). W wyniku zastosowanego zabiegu, odsetek ukorzenionych pędów na podłożu

suplementowanym NAA wzrósł do 44 % (Tab. 13), zaobserwowano jednak równoczesne formowanie się tkanki przyrannej u podstawy eksplantatów oraz wokół tworzących się korzeni (Fot. 13C). Powstawanie kalusa związane było najwyraźniej z obecnością NAA, na co wskazywały wyniki wcześniejszych prac nad mikrorozmnażaniem roślin z rodziny Fabaceae (Saafi i Borthakur, 2002; Thiem, 2003; Rout, 2005; Faisal i wsp., 2006). Zgodnie z dostępnymi informacjami, opisane zmiany w morfologii korzeni/eksplantatów wpływają negatywnie na proces aklimatyzacji zregenerowanych roślin, ze względu na zaburzenie procesów transpiracji oraz pobierania wody i składników mineralnych, a także obniżoną odporność sadzonek na atak patogenów (Chandra i wsp., 2010).

Tab. 13. Wpływ składu podłoża oraz zastosowanego schematu elongacji, na ukorzenianie pędów *Cyclopia genistoides* w warunkach *in vitro* oraz aklimatyzację zregenerowanych roślin.*

Typ eksplantatu	Kod modyfikacji	Regulatory wzrostu i inne substancje (μM)	Modyfikacja pożywki ^a	Charakterystyka eksplantatu ^b			Ilość eksplantatów tworzących korzenie (%)	Przeżywalność po 30 dniach (%) ^c
				B	K	L		
wydłużany przez 30 dni	R1	NAA (26,85)	½S	+	+	-	0	-
	R2	NAA (26,85)	½SN	-	+	-	0	-
wydłużany przez 60 dni	R1	NAA (26,85)	½S	+	+	+	1,0	0
	R2	NAA (26,85)	½SN	-	+	-	1,0	0
	R3	NAA (26,85), kwas cytrynowy (260,25)	½SN	-	+	-	44,0	19,0
	R4	IAA (28,54), kwas cytrynowy (260,25)	½SN	-	-	-	54,8	80,0
	R5	IPA (26,43), kwas cytrynowy (260,25)	½SN	-	-	-	22,0	77,0

* Pogrubionym tekstem zaznaczono modyfikację zastosowaną w opracowanej procedurze mikrorozmnażania.

^a ½S, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy; ½SN, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy oraz azotanów amonu i potasu.

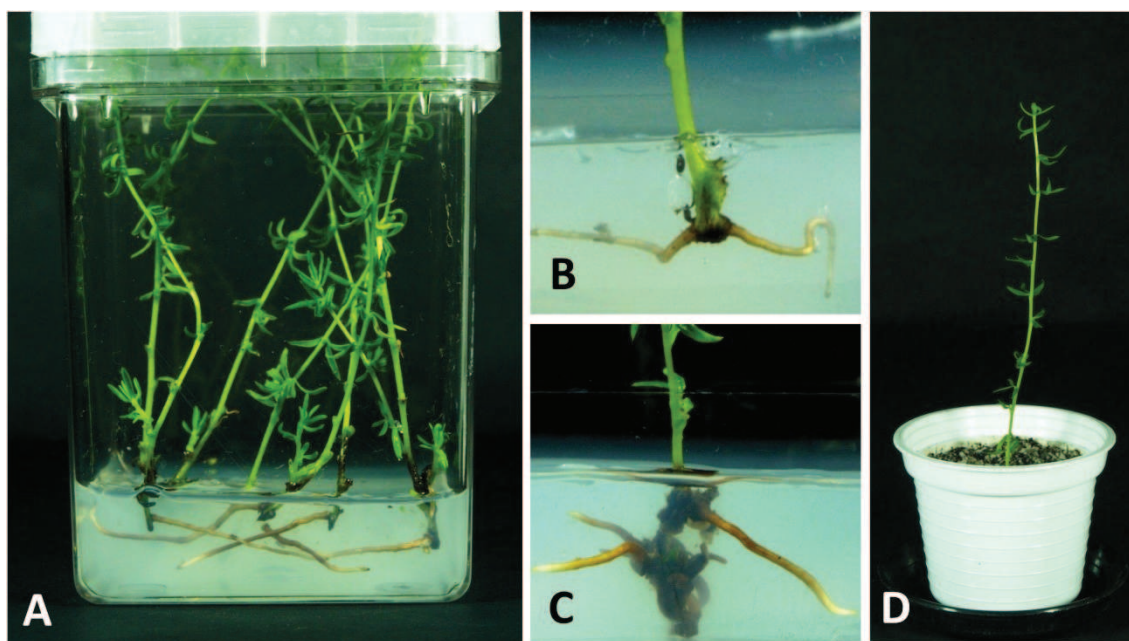
^b B, brązowienie eksplantatu i pożywki wzrostowej; C, formowanie kalusa u podstawy eksplantatu; L, opadanie liści; znaki „+” i „-” oznaczają występowanie lub brak danej cechy.

^c Aklimatyzację roślin prowadzono w warunkach szklarniowych.

W celu uzyskania korzeni pozbawionych wymienionych wyżej, niekorzystnych zmian, postanowiono zastosować, w zastępstwie NAA, wybrane regulatory z grupy auksyn takie jak: kwas indolilo-3-octowy (IAA) lub kwas indolilo-3-propionowy (IPA) (modyfikacje R4 i R5 – Tab. 13). W rezultacie, najwyższy odsetek ukorzenionych eksplantatów odnotowano na podłożu suplementowanym IAA (54,8 %), znacznie niższy natomiast dla pędów rosnących z dodatkiem IPA (22 %) (Tab. 13). Korzenie uzyskane na wymienionych wyżej pożywkach nie wykazywały ponadto tendencji do formowania tkanki przyrannej oraz były wolne od zmian nekrotycznych (Fot. 13A, B).

Stosunkowo niska wydajność ukorzeniania pędów *C. genistoides* może wynikać z braku, w warunkach *in vitro*, specyficznych bakterii symbiotycznych z rodzaju *Rhizobium*, których obecność jest często niezbędna do prawidłowego rozwoju systemu korzeniowego roślin z rodziny Fabaceae (Neves i wsp., 2001; Chandra i wsp., 2010), w tym również miodokrzewów (Spriggs i Dakora, 2007, 2009a, b). Całkowita

nieskuteczność zabiegów ukorzenia pędów wydłużanych jedynie przez 30 dni spowodowana była najprawdopodobniej obecnością egzogennych cytokinin (2iP i TDZ), pozostałych w biomasach po etapie multiplikacji. Zgodnie z danymi literaturowymi, wspomniane regulatory wzrostu mogą skutecznie zahamować proces powstawania korzeni, a ich całkowite usunięcie z tkanek roślinnych wymaga niekiedy kilkukrotnego pasażowania eksplantatów na podłożach wolnych od cytokinin (Zhao i wsp., 2003/4; Mundhara i Rashid, 2006; Husain i wsp., 2007).



Fot. 13. Ukorzenia pędów *Cyclopia genistoides* na stacjonarnych pożywkach SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy oraz azotanów potasu i amonu, suplementowanych 28,54 μM IAA (A, B) lub 26,85 μM NAA (C); aklimatyzacja zregenerowanych roślin w warunkach szklarniowych (D).

Zregenerowane rośliny poddawano aklimatyzacji w warunkach szklarniowych (Fot. 13D), kierując się ogólnymi wytycznymi postępowania dla gatunków namnażanych w kulturach *in vitro* (Chandra i wsp., 2010). Roślinki umieszczano w mieszaninie torfu, żwiru i perlitu (1:1:1 w/w/w), a następnie przykrywano folią polietylenową, zapobiegającą utracie wilgoci. Największą przeżywalnością charakteryzowały się pędy *C. genistoides* ukorzeniane w obecności IAA oraz IPA (odpowiednio 80 i 77 %). Znacznie słabiej aklimatyzowały się rośliny pozyskane na podłożu suplementowanym NAA, co wynikało najprawdopodobniej ze zmienionej morfologii korzeni (obecność kalusa), zwiększającej ich podatność na działanie patogenów.

II.1.3.1.4. Zawartość związków polifenolowych w biomasach *Cyclopia genistoides* uzyskanych na poszczególnych etapach mikrorozmnażania

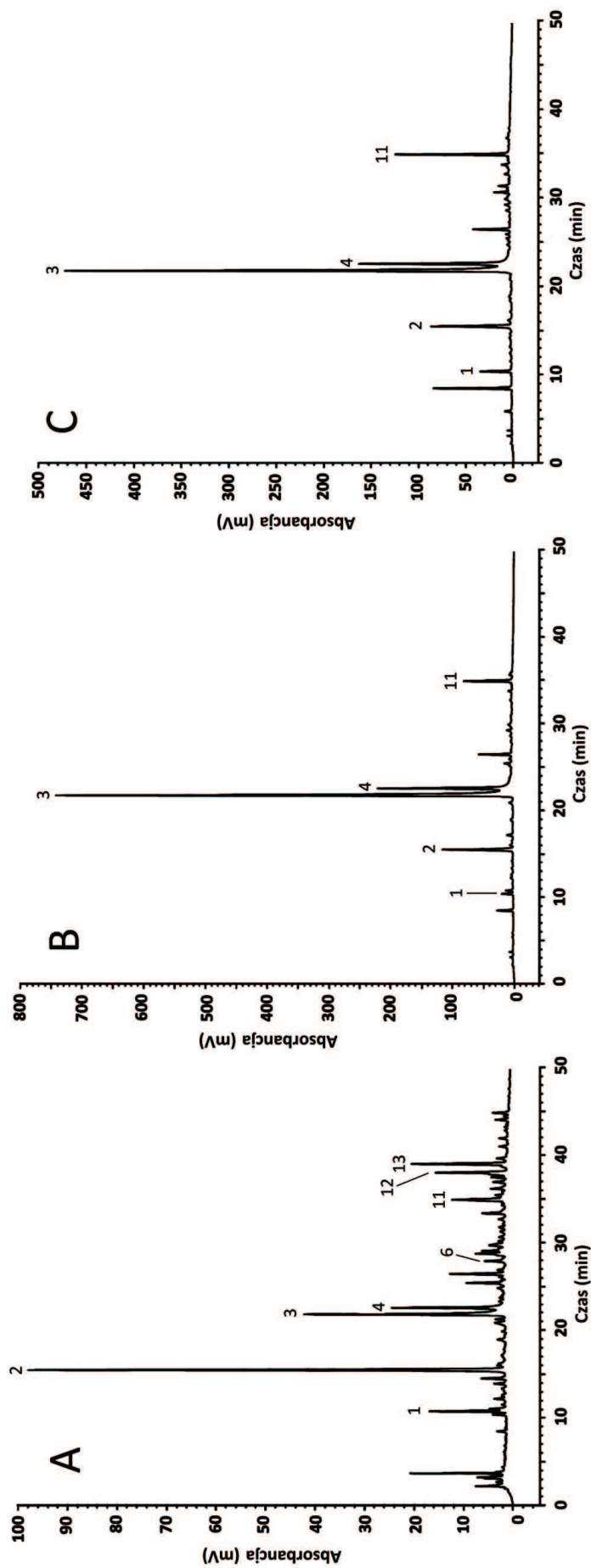
Biomasy *C. genistoides* o różnym stopniu uorganizowania, tj. mikropędy rosnące na pożywce M1, pędy poddane 30- i 60-dniowej elongacji na podłożu E1 oraz

rośliny zregenerowane i aklimatyzowane przez 1 miesiąc w warunkach szklarniowych, poddano analizie chromatograficznej HPLC z uwagi na obecność związków polifenolowych. Celem wspomnianych badań fitochemicznych było z jednej strony określenie wpływu zróżnicowania tkankowego na akumulację połączeń z grupy ksantonów, flawanonów, izoflawonów i benzofenonów w kulturach *in vitro* powyższego gatunku, z drugiej zaś sprawdzenie, czy proces mikrorozmnażenia wywiera jakościowy i/lub ilościowy wpływ na zawartość metabolitów wtórnych w badanej roślinie. Uzyskane rezultaty porównano z referencyjnym surowcem gruntowym, który stanowiły w tym przypadku niefermentowane części nadziemne *C. genistoides*.

Stwierdzono, że pędy *in vitro* *C. genistoides*, poddane multiplikacji na podłożu SH suplementowanym 9,84 μM 2iP oraz 1,0 μM TDZ, zachowały zdolność do biosyntezy związków charakterystycznych dla rośliny macierzystej, tj. mangiferyny, izomangiferyny, hesperydyny oraz 3-C- β -glukozydów makturyny i iriflofenonu. Dodatkowo, wykazano w nich obecność 3 izoflawonów (7-O- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nieobecnych w surowcu gruntowym (Ryc. 26A, C).

Poziomy akumulacji połączeń polifenolowych w kulturach mikropędowych *C. genistoides* były, z wyjątkiem 3-C- β -glukozydu iriflofenonu i wspomnianych wcześniej pochodnych izoflawonoidowych, niższe od stężeń powyższych związków w roślinie gruntowej (Tab. 14). Wyraźny wpływ na zawartość polifenoli w biomasach miała procedura elongacji uzyskanych mikroślinek. Skutkowała ona istotnym wzrostem zawartości mangiferyny oraz izomangiferyny, a także spadkiem ilości 3-C- β -glukozydu iriflofenonu, w eksplantatach rosnących na podłożu suplementowanym IBA przez 30 dni. Dalsze wydłużanie pędów na pożywce wzbogaconej we wspomnianą auksynę powodowało całkowity zanik izoflawonów w badanej biomacie oraz podwyższenie stężeń mangiferyny, izomangiferyny i hesperydyny. Skład jakościowy mikroślinek poddanych 2-miesięcznej elongacji pod względem polifenoli był tym samym identyczny jak w przypadku rośliny gruntowej, jakkolwiek zawartości poszczególnych metabolitów były w dalszym ciągu niższe w porównaniu z surowcem referencyjnym (Tab. 14). Istotny wpływ na zwiększenie poziomów akumulacji oznaczanych polifenoli miało również ukorzenie i następująca po nim aklimatyzacja roślinek (Ryc. 26B, Tab. 14). W zregenerowanych roślinach *C. genistoides* stwierdzono najwyższe, spośród badanych biomas, ilości mangiferyny (≈ 8300 mg/100 g DW), izomangiferyny (≈ 2500 mg/100 g DW) oraz 3-C- β -glukozydu iriflofenonu (≈ 1000 mg/100 g DW). Uzyskane wartości przekraczały tym samym stężenia powyższych związków w referencyjnym materiale gruntowym (Tab. 14). Zawartość hesperydyny i 3-C- β -glukozydu makturyny w roślinach zregenerowanych była stosunkowo wysoka, niższa jednak w porównaniu z próbą kontrolną (Tab. 14).

Przeprowadzone analizy chromatograficzne wskazały na istnienie wyraźnej korelacji pomiędzy stopniem zróżnicowania tkankowego badanych biomas a poziomem akumulacji poszczególnych związków polifenolowych. Powyższa zależność była szczególnie widoczna w przypadku ksantonów oraz flawanonu hesperydyny, których zawartość rosła sukcesywnie wraz ze zmianą morfologii od zwitryfikowanych mikropędów do ukorzenionych eksplantatów o cechach rośliny macierzystej (Tab. 14).



Ryc. 26. Chromatogramy HPLC ($\lambda=280$ nm) frakcji polifenolowych z mikropędów *Cyclopia genistoides* rosnących na zmodyfikowanej pożywce SH, suplementowanej 9,84 μ M 2iP i 1,0 μ M TDZ (A), roślin zregenerowanych tego samego gatunku kulturowanych przez 30 dni w warunkach szklarniowych (B) oraz referencyjnego, niefermentowanego surowca gruntowego (C). Piki: 1, 3-C- β -glukozyd mackluryny; 2, 3-C- β -glukozyd mackluryny; 3, mangiferyna; 4, izomangiferyna; 6, 7-O- β -glukozyd kalikozy; 11, hesperodyna; 12, 7-O- β -glukozyd pseudobaptygeniny; 13, 7-O- β -glukozyd formononetyny.

Tab. 14. Zawartość związków polifenolowych w kulturach *in vitro*, roślinach zregenerowanych oraz referencyjnym surowcu gruntowym *Cyclopia genistoides*. *

Material roślinny	3-C-β-glukozyd makiuryny	3-C-β-glukozyd iriflofenonu	Mangiferyna	Izomangiferyna	Hesperydyna	7-O-β-glukozyd kalikozyiny	7-O-β-glukozyd pseudobaptygeniny	7-O-β-glukozyd formononetyny
<i>pedy in vitro</i>								
mikropędy ¹	19,0 ± 3,0 ^b	896,0 ± 30,0 ^d	466,0 ± 17,0 ^a	282,0 ± 9,0 ^a	83,0 ± 4,0 ^a	29,0 ± 3,0 ^a	77,0 ± 4,0 ^c	99,0 ± 5,0 ^b
pedy wydłużane przez 30 dni ²	13,0 ± 0,0 ^a	307,0 ± 10,0 ^b	933,0 ± 32,0 ^b	371,0 ± 11,0 ^b	84,0 ± 4,0 ^a	56,0 ± 4,0 ^b	52,0 ± 4,0 ^b	90,0 ± 4,0 ^a
pedy wydłużane przez 60 dni ²	21,0 ± 3,0 ^b	280,0 ± 8,0 ^a	3250,0 ± 96,0 ^c	1062,0 ± 33,0 ^c	352,0 ± 10,0 ^b	nd	nd	nd
<i>rośliny zregenerowane</i> ³								
	148,0 ± 5,0 ^c	1061,0 ± 40,0 ^e	8296,0 ± 240,0 ^e	2506,0 ± 76,0 ^e	432,0 ± 13,0 ^c	nd	nd	nd
<i>material referencyjny</i>								
(niefermentowany surowiec gruntowy)	285,0 ± 11,0 ^d	832,0 ± 5,0 ^c	5254,0 ± 140,0 ^d	1922,0 ± 59,0 ^d	659,0 ± 22,0 ^d	nd	nd	nd

* Stężenia wyrażono jako mg/100 g suchej masy. Przedstawione dane stanowią średnią arytmetyczną z 5 prób ± SD. Wartości oznaczone odmiennymi literami różnią się statystycznie ($p < 0,05$; test DMRT); **nd**, nie stwierdzono obecności związku.

¹ Kultury mikropędowe prowadzone na podłożu Schenka-Hildebrandta (SH), suplementowanym 9,84 μM 2iP i 1,0 μM TDZ.

² Pędy poddane wydłużaniu na podłożu SH suplementowanym 4,92 μM IBA.

³ Eksplantaty ukorzeniane na podłożu SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy oraz azotanów, suplementowanym 28,54 μM IAA oraz 260,25 μM kwasu cytrynowego; zregenerowane rośliny aklimatyzowano przez 30 dni w warunkach szklarniowych.

Co ciekawe, opisanej korelacji nie zaobserwowano dla 3-*C*- β -glukozydu iriflofenonu, będącego metabolitem pośrednim w szlaku biosyntezy mangiferyny (Fujita i Inoue, 1980a, b). Obecność znacznych ilości wspomnianego benzofenonu stwierdzono zarówno w mikropędach, jak i roślinach zregenerowanych *C. genistoides* (odpowiednio ok. 900 i 1000 mg/100 g DW – Tab. 14).

Zawartość izoflawonoidów, odwrotnie niż ksantonów i flawanonu hesperydyny, malała wraz ze zmianą morfologii eksplantatów w kierunku rośliny gruntowej. Obecności 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny nie stwierdzono w pędach wydłużanych przez 60 dni, jak również w roślinach zregenerowanych (Ryc. 26B, Tab. 14).

Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowana procedura mikrorozmnażania *C. genistoides* nie spowodowała, z pominięciem efektów obserwowanych w stadiach przejściowych (etapy multiplikacji i elongacji pędów), widocznych zmian w profilu metabolicznym badanych roślin. Świadczy o tym praktycznie identyczny skład frakcji polifenolowej roślin zregenerowanych oraz referencyjnego surowca gruntowego. Tym samym, możliwe jest wykorzystanie opracowanego protokołu doświadczalnego do namnażania miodokrzewów w kulturach *in vitro*, z zachowaniem zdolności badanych roślin do akumulacji polifenoli, warunkujących ich aktywność biologiczną.

Podsumowując, w ramach przeprowadzonych badań opracowano, po raz pierwszy, protokół mikrorozmnażania endemicznego, południowoafrykańskiego krzewu *C. genistoides*. Eksperymenty prowadzono z użyciem zmodyfikowanych, zestalonych agarem pożywek Schenka-Hildebrandta, suplementowanych wybranymi regulatorami wzrostu z grupy auksyn i cytokinin. W rezultacie, stwierdzono dodatni, synergistyczny wpływ 2 cytokinin (2iP i TDZ) na powstawanie primordiów pędowych. Ukorzenie i aklimatyzację roślin poprzedzało 2-etapowe stadium elongacji eksplantatów na podłożu SH o zmniejszonej zawartości sacharozy, suplementowanym IBA. Najwyższy odsetek ukorzenionych mikroroślinek uzyskano na zubożonej pod względem zawartości azotanów i sacharozy pożywce SH z dodatkiem IAA oraz kwasu cytrynowego. Profil produkcyjny zregenerowanych roślin był jakościowo identyczny z referencyjnym surowcem gruntowym, zawartość ksantonów była jednak w tym wypadku większa niż w roślinie macierzystej.

Opracowana procedura może być wykorzystana do wydajnego namnażania *C. genistoides*, dostarczając sadzonek dla potrzeb rozwijającej się gałęzi rolnictwa, związanej z komercyjną uprawą miodokrzewów. Wspomniany protokół może być również zaadaptowany do celów mikrorozmnażania innych roślin z rodzaju *Cyclopia*, w tym zagrożonych gatunków o ograniczonym zasięgu występowania, takich jak *C. pubescens* i *C. longifolia* (Schutte-Vlok, 1998; Joubert i wsp., 2011).

Poza czysto praktycznym znaczeniem opracowanej metody namnażania *in vitro*, biomasy pędowe *C. genistoides* różniące się stopniem morfogenezy, uzyskane na poszczególnych etapach doświadczeń, stanowią odpowiedni materiał do badań nad fizjologią i metabolizmem wtórnym miodokrzewów. Z uwagi na wysoką zawartość połączeń polifenolowych, możliwe wydaje się ponadto wykorzystanie badanych kultur jako źródła wybranych ksantonów i bioflawonoidów.

II.1.3.2. Kultury pędowe *Cyclopia genistoides* ukierunkowane na akumulację wybranych związków polifenolowych

Przeprowadzone uprzednio eksperymenty, obejmujące wyprowadzenie kultur *in vitro* *Cyclopia* sp. (rozdz. II.1.1.), a także opracowanie protokołu mikrorozmnażania *C. genistoides* (rozdz. II.1.3.1.), wykazały wyraźny wpływ zróżnicowania morfologicznego tkanek na akumulację związków polifenolowych w badanych biomasach. Zwrócono m.in. uwagę na zdolność kultur mikropędowych powyższego gatunku do biosyntezy szeregu związków polifenolowych, w tym metabolitów wtórnych charakterystycznych dla rośliny macierzystej. Do wspomnianych połączeń należą przede wszystkim ksantony (mangiferyna i izomangiferyna), hesperydyna (flawanon), a także opisane po raz pierwszy w rodzaju *Cyclopia* (rozdz. II.1.1.4.) benzofenony (3-*C*- β -glukozydy makluryny i iriflofenonu). Ponadto, w biomasach pędowych *C. genistoides* stwierdzono obecność trzech związków o budowie izoflawonowej (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), produkowanych, w przeciwieństwie do rośliny gruntowej, również przez kultury zawieszinowe *C. subternata* (rozdz. II.1.1.4.). Skład chemiczny pędów *in vitro* *C. genistoides* wskazywał tym samym, że mogą one znaleźć zastosowanie jako bogate i niezależne od zasobów naturalnych źródło wybranych polifenoli. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że opisane w rozdz. II.1.2.2. płynne kultury parenchymatyczne *C. subternata* charakteryzowały się profilem metabolicznym całkowicie odmiennym od rośliny macierzystej, spośród połączeń polifenolowych akumulowały one bowiem jedynie wspomniane wcześniej pochodne izoflawonoidowe. Z tego względu, podstawowy cel projektu, którym było uzyskanie bogatego źródła ksantonów, flawanonów i izoflawonów w kulturach *in vitro* roślin z rodzaju *Cyclopia*, nie mógł być w pełni zrealizowany jedynie w oparciu o zawieszinę *C. subternata*.

Uwzględniając powyższe informacje, w zaplanowanych pracach, ukierunkowanych na opracowanie systemu do pozyskiwania wybranych polifenoli metodami biotechnologicznymi, zdecydowano się wykorzystać pędy *in vitro* *C. genistoides*. Przeprowadzone eksperymenty obejmowały, w pierwszej kolejności, zmianę typu hodowli mikropędów z agarowej na płynną, która oprócz zapewnienia lepszego kontaktu biomasy ze składnikami odżywczymi, znajdującymi się w medium, umożliwia także późniejsze zwiększenie skali kultury. Ponadto, skład pożywki SH, wykorzystywanej do prowadzenia hodowli mikropędowych *C. genistoides* (rozdz. II.1.1.3. oraz II.1.3.1.1.), zmodyfikowano poprzez zmniejszenie o połowę zawartości sacharozy (1,5 % w/v) oraz zastąpienie, obecnych w podłożu do mikropropagacji cytokinin (2iP i TDZ), kwasem indolilo-3-masłowym (IBA). Kierowano się przy tym rezultatami wcześniejszych eksperymentów, towarzyszących opracowaniu procedury mikrorozmnażania powyższego gatunku. Wykazały one, że suplementacja pożywki IBA skutkuje zarówno korzystnymi zmianami w morfologii kultury (słabiej nasilone zjawisko witrifikacji oraz mniejsza ilość powstającego kalusa), jak i znaczącym wzrostem zawartości ksantonów w tkankach (rozdz. II.1.3.1.4.). Obniżenie stężenia sacharozy w podłożu powodowało natomiast wyraźne zahamowanie zmian

nekrotycznych w badanej kulturze, takich jak brunatnienie eksplantatów i obsychanie szczytów pędów (rozdz. II.1.3.1.2. oraz II.1.3.1.3.). Z uwagi na podstawowy cel projektu, korzystne było przede wszystkim podwyższenie poziomów akumulacji mangiferyny oraz izomangiferyny w pędach rosnących na pożywce suplementowanej IBA (rozdz. II.1.3.1.4.). Przy wykorzystaniu opracowanych równolegle fitochemicznych procedur *downstream* (rozdz. II.2.3.), płynne kultury pędowe *C. genistoides*, rosnące z dodatkiem wymienionej auksyny, mogłyby być w przyszłości wykorzystane jako bogate źródło wybranych polifenoli, w szczególności trudno dostępnej izomangiferyny oraz glukozydowych pochodnych benzofenonu o dużej wartości rynkowej.

Próby inicjacji płynnych kultur pędowych *C. genistoides* przeprowadzono w sposób klasyczny, obejmujący przeniesienie eksplantatów mikropędowych, pozyskanych z pożywki agarowej, do wypełnionych medium wzrostowym kolb stożkowych, a następnie umieszczenie naczyń hodowlanych na wytrząsarce rotacyjnej (rozdz. III.1.7.2.1.). Opisaną powyżej procedurę stosowano uprzednio z powodzeniem w przypadku kultur pędowych szeregu gatunków roślin wyższych, w tym *C. roseus* (Pietrosiuk i wsp., 2007), *R. graveolens* (Ekiert i Czygan, 2005) oraz *C. erythraea* (Piątczak i wsp., 2005b). Niestety, wstępne badania wykazały, że mikropędy *C. genistoides* są całkowicie nieodporne na stres mechaniczny związany z wytrząsaniem kultur płynnych. Wprowadzone do podłoża eksplantaty wykazywały bardzo silne zmiany nekrotyczne, objawiające się ciemnieniem tkanek i medium wzrostowego, co wiązało się najprawdopodobniej z wydzielaniem i utlenianiem związków o charakterze prostych fenoli. Powyższy fenomen mógł również wynikać ze zwiększenia, w stosunku do kultur agarowych, kontaktu biomasy z pożywką wzrostową. Na opisanych wcześniej etapach badań, obejmujących inicjację i prowadzenie kultur stacjonarnych *Cyclopia* sp. (rozdz. II.1.1. obserwowano bowiem brązowienie tkanek znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie podłoża.

Z uwagi na powyższe, w eksperymentach dotyczących kultur pędowych *C. genistoides* zdecydowano się na wykorzystanie systemu LifeRaft[®], dostarczanego przez firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) i Osmotek (Rechowot, Izrael). Dzięki obecności półprzepuszczalnej membrany polipropylenowej, umożliwia on prowadzenie stacjonarnych kultur płynnych, przy jednoczesnym ograniczeniu kontaktu pomiędzy pożywką a rosnącą biomasą. Powyższy sposób hodowli zapewnia zarazem sprawną wymianę substancji odżywczych oraz produktów metabolizmu, a także odpowiedni poziom natlenienia tkanek roślinnych (Vágner i wsp., 2005). W przypadku pędów *in vitro* *C. genistoides*, opisana procedura pozwoliła na znaczące ograniczenie zmian nekrotycznych, obserwowanych w kulturze wytrząsanej.

Podobnie jak w przypadku zawiesin *C. subternata* (rozdz. II.1.2.2.), biomasy i odpowiadające im próbki pożywek zbierano w określonych odstępach czasu, ważono celem wykreślenia profilów wzrostowych kultury, a następnie przeznaczano do badań fitochemicznych pod względem zawartości związków polifenolowych. Zaplanowane eksperymenty przeprowadzono, tak jak doświadczenia związane z opracowaniem protokołu mikrorozmnażania *C. genistoides*, w warunkach ciągłego oświetlenia światłem dziennym (rozdz. III.1.7.2.2.).

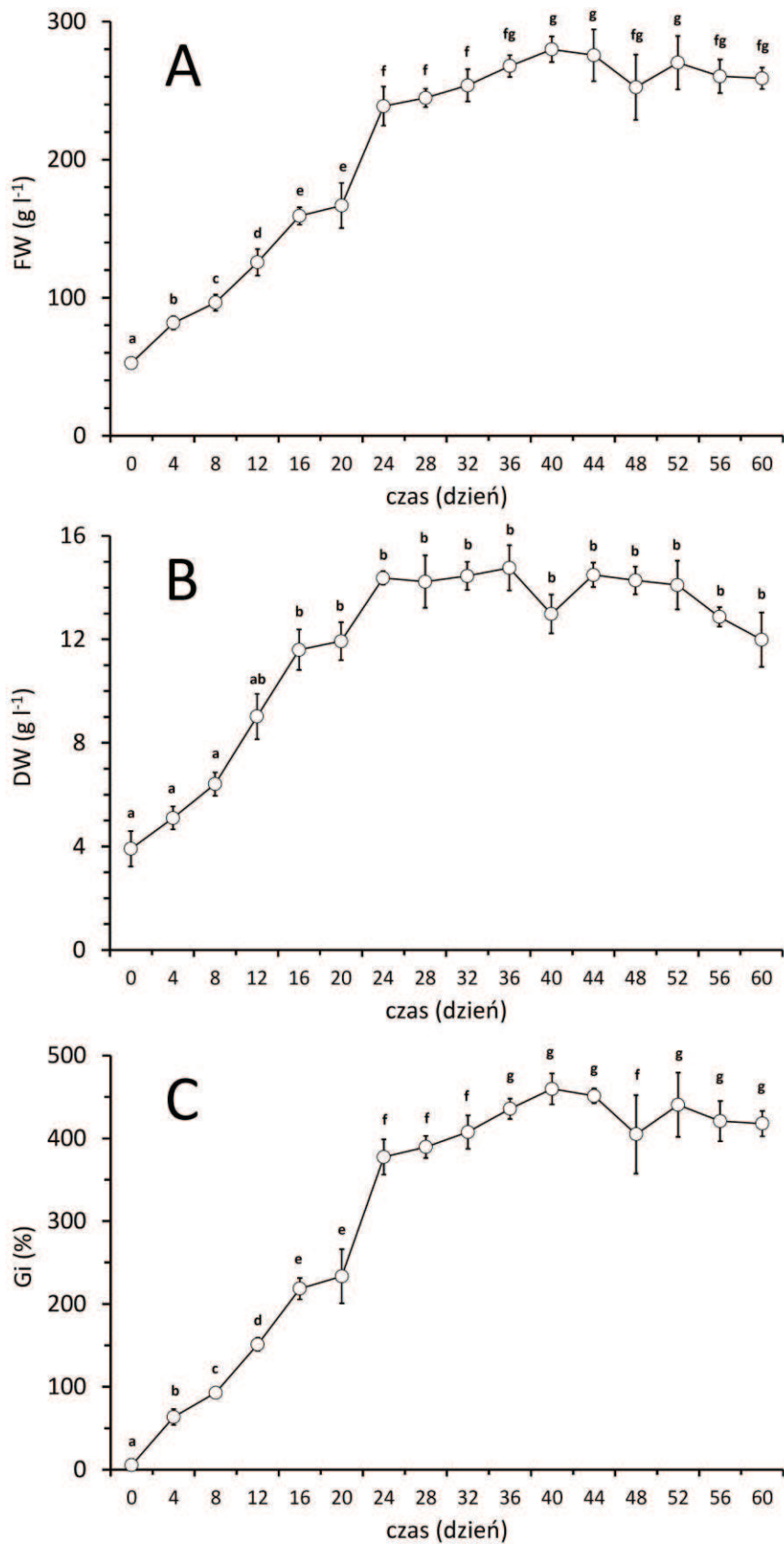
II.1.3.2.1. Płynne stacjonarne kultury pędowe *Cyclopia genistoides* prowadzone na systemie LifeRaft®

II.1.3.2.1.1. Wzrost biomasy w płynnych stacjonarnych kulturach pędowych *Cyclopia genistoides*

Materiałem biologicznym służącym do inicjacji stacjonarnych kultur płynnych były, podobnie jak w przypadku mikrorozmnażania *C. genistoides*, pędy powyższego gatunku rosnące na podłożu agarowym suplementowanym dodatkiem 2iP i TDZ (rozdz. II.1.1.3.). Biomasę inokularną pobierano w 30 dniu cyklu wzrostowego, oddzielając uprzednio od eksplantatów pędowych nadmiar tkanki przyrannej oraz fragmenty objęte nekrozą. Następnie, pędy przenoszono na membranę LifeRaft®, umieszczoną w wypełnionym pożywką pojemniku Magenta™ (rozdz. III.17.2.2.). Z uwagi na mniejszą, w porównaniu z kulturami transgenicznymi, dynamikę przyrostu niemodyfikowanych genetycznie kultur organowych (Verpoorte i wsp., 2002; Łuczkiwicz i Głód, 2005; Piątczak i wsp., 2005b.), hodowlę prowadzono w długim, 60-dniowym cyklu wzrostowym. W przeciwieństwie do zawiesiny parenchymatycznej, próbki biomas oraz odpowiadające im pożywki zbierano w 4-dniowych odstępach czasu, właśnie z uwagi na spodziewane, wolniejsze tempo przyrostu pędów oraz mniej dynamiczny profil akumulacji metabolitów wtórnych.

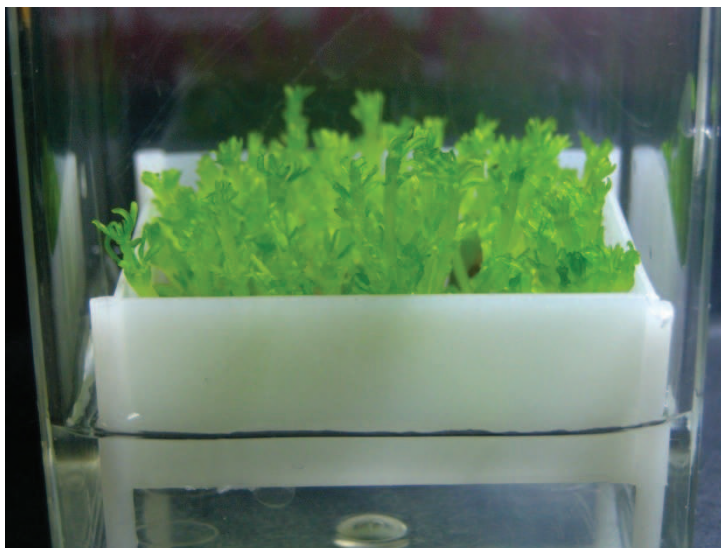
Przeprowadzony eksperyment wykazał, że badana kultura charakteryzuje się wolnym przyrostem, co jest jednak typową cechą dla większości hodowli pędowych (Ekiert i wsp., 2001; Verpoorte i wsp., 2002; Ekiert i Czygan, 2005; Łuczkiwicz i Głód, 2005; Piątczak i wsp., 2005b; Łuczkiwicz, 2008). Uzyskane ilości świeżej masy, a także wartości współczynnika przyrostu G_i (Ryc. 27A, C), były w omawianym przypadku wyraźnie niższe od opisanych uprzednio dla zawiesin *C. subternata* (rozdz. II.1.2.2.). Jednocześnie, maksymalna zawartość suchej masy, wynosząca dla pędów *C. genistoides* ok. 14 g l^{-1} (Ryc. 27B), okazała się zbliżona do najwyższej ilości DW w zawieszynie drugiego z namnażanych w warunkach *in vitro* gatunków. Opisywane zjawisko wskazuje więc, że przyrost obydwu kultur jest porównywalny, a różnicowanie w ilości świeżej masy, uzyskanej z omawianych hodowli, wynika po prostu ze znacznie niższego stopnia uwodnienia pędów, w porównaniu do komórek parenchymatycznych. W rezultacie, „pozornie” mniejsze ilości pędów *C. genistoides*, otrzymane z eksperymentu, nie przekładają się na obniżenie produktywności kultury, w rozumieniu ilości pozyskanej biomasy.

Profile wzrostowe *C. genistoides*, wykreślone na podstawie zmian ilości świeżej i suchej masy, a także współczynnika przyrostu G_i , były praktycznie identyczne (Ryc. 27A-C). Charakteryzowały się one brakiem fazy opóźnienia, po której bezpośrednio następowała faza wzrostu liniowego, trwająca aż do ok. 24 dnia doświadczenia. *Plateau*, w przeciwieństwie do kultur zawiesinowych (rozdz. II.1.2.2.), było długie i wyraźnie zaznaczone. Poprzedzało ono widoczną jedynie w profilu zmian DW, początkową fazę zamierania (Ryc. 27B). Jej dalszy przebieg byłby prawdopodobnie możliwy do rejestracji wraz z dalszym kontynuowaniem eksperymentu.



Ryc. 27. Profile wzrostowe płynnych, stacjonarnych kultur pędowych *Cyclopia genistoides*, wykreślone na podstawie zmian ilości świeżej (A) i suchej (B) masy oraz wartości współczynnika przyrostu (C). Odmiennymi literami oznaczono istotnie statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Kultury pędowe *C. genistoides*, prowadzone na systemie LifeRaft[®], charakteryzowały się dobrą żywotnością i brakiem zmian nekrotycznych aż do 36 dnia doświadczenia (Fot. 14).



Fot. 14. Kultura pędowa *Cyclopia genistoides*, prowadzona na systemie LifeRaft[®] z użyciem zmodyfikowanej, płynnej pożywki SH, suplementowanej 1,5 % (w/v) sacharozy oraz 4,92 μ M IBA.

Począwszy od dnia 40, obserwowano natomiast wyraźne zamieranie biomas, przejawiające się żółknięciem tkanek oraz nasileniem brunatnienia pożywki wzrostowej. Co ciekawe, wspomnianym wyżej niekorzystnym zmianom nie towarzyszył, aż do 52 dnia cyklu wzrostowego, spadek ilości biomas (Ryc. 27B).

W czasie trwania eksperymentu stwierdzono ponadto postępujące zmiany w morfologii badanych kultur, związane z modyfikacją składu pożywki, pod względem regulatorów wzrostu (zamiana cytokinin 2iP i TDZ na auksynę – IBA), stosowanych na etapie zakładania płynnych hodowli stacjonarnych. Obejmowały one wydłużenie pędów, zmniejszenie wiotryfikacji tkanek i zanik kalusa (obecnego u podstawy eksplantatów), w kolejnych dniach cyklu wzrostowego. Powyższe obserwacje były analogiczne do zmian morfologii pędów odnotowanych podczas prac związanych z opracowaniem protokołu mikrorozmnażania *C. genistoides* (etap elongacji – rozdz. II.1.3.1.2.). Dowodzi to, że wymienione hormony roślinne wywierały taki sam wpływ na wzrost kultur *in vitro* powyższego gatunku, niezależnie od zastosowanego modelu eksperymentalnego (pożywka agarowa lub płynna).

II.1.3.2.1.2. Akumulacja związków polifenolowych w płynnych stacjonarnych kulturach pędowych *Cyclopia genistoides*

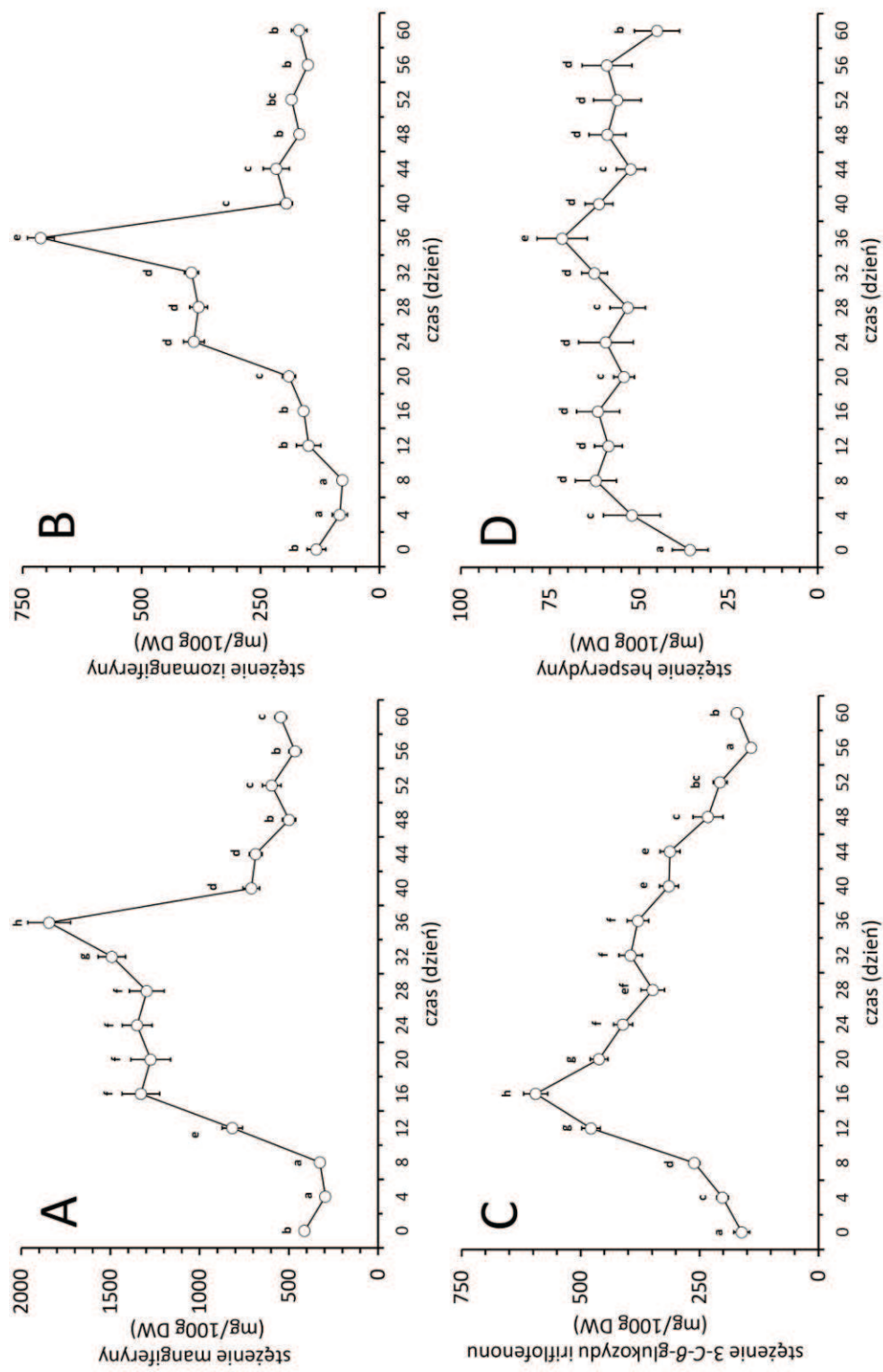
Analizy chromatograficzne wyciągów z biomas zbieranych w kolejnych dniach cyklu wzrostowego wykazały, że zmiana typu hodowli nie wywiera jakościowego wpływu na profil metaboliczny pędów *C. genistoides* pod względem obecności połączeń polifenolowych. Podobnie jak w przypadku kultur mikropędowych

prowadzonych na podłożach agarowych (rozdz. II.1.1.4.), składnikami zespołu polifenolowego były w opisywanym doświadczeniu ksantony (mangiferyna i izomangiferyna), flawanon hesperydyna, pochodna benzofenonu (3-*C-β*-glukozyd iriflofenonu) oraz 3 połączenia o budowie izoflawonowej (7-*O-β*-glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny). Wymienione metabolity magazynowane były wyłącznie wewnątrzkomórkowo, bowiem ich obecności nie stwierdzono w pożywkach zbieranych w kolejnych dniach eksperymentu.

Pomimo braku jakościowych różnic w zakresie akumulacji polifenoli pomiędzy kulturami pędowymi *C. genistoides* prowadzonymi na podłożach agarowych oraz na systemie LifeRaft[®], stężenia poszczególnych związków w hodowli płynnej wyraźnie zmieniały się w kolejnych dniach cyklu wzrostowego (Ryc. 28 i 29). Opisywane zjawisko wynikało z zastosowania, w niniejszym doświadczeniu, podłoża wzbogaconego IBA. Wobec powyższego, profil produkcyjny badanych kultur charakteryzował się wyraźnie zaznaczonym w czasie wzrostem stężenia mangiferyny oraz izomangiferyny, których maksima produkcji (odpowiednio ok. 1800 i 700 mg/100 g DW, Ryc. 28A, B) przypadają na 36 dzień cyklu wzrostowego. Począwszy od tego dnia stwierdzono gwałtowny spadek zawartości wymienionych związków, związany najprawdopodobniej z początkiem fazy zamierania pędów, trwający ok. 4 dni. Następnie, aż do końca eksperymentu, ilości obydwu ksantonów utrzymywały się w tkankach na mniej więcej stałym poziomie, zbliżonym do stężeń danych połączeń w biomacie inicjalnej (Ryc. 28A, B). Jako, że w badanych pędach nie obserwowano w tym czasie jednoczesnego pojawienia się nowych metabolitów polifenolowych, bądź wzrostu zawartości pozostałych, zidentyfikowanych związków, nie można więc wnioskować o zmianie szlaków metabolicznych w kulturze i związanym z tym włączeniem ksantonów w szlaki biosyntezy innych, bardziej złożonych struktur z tej grupy.

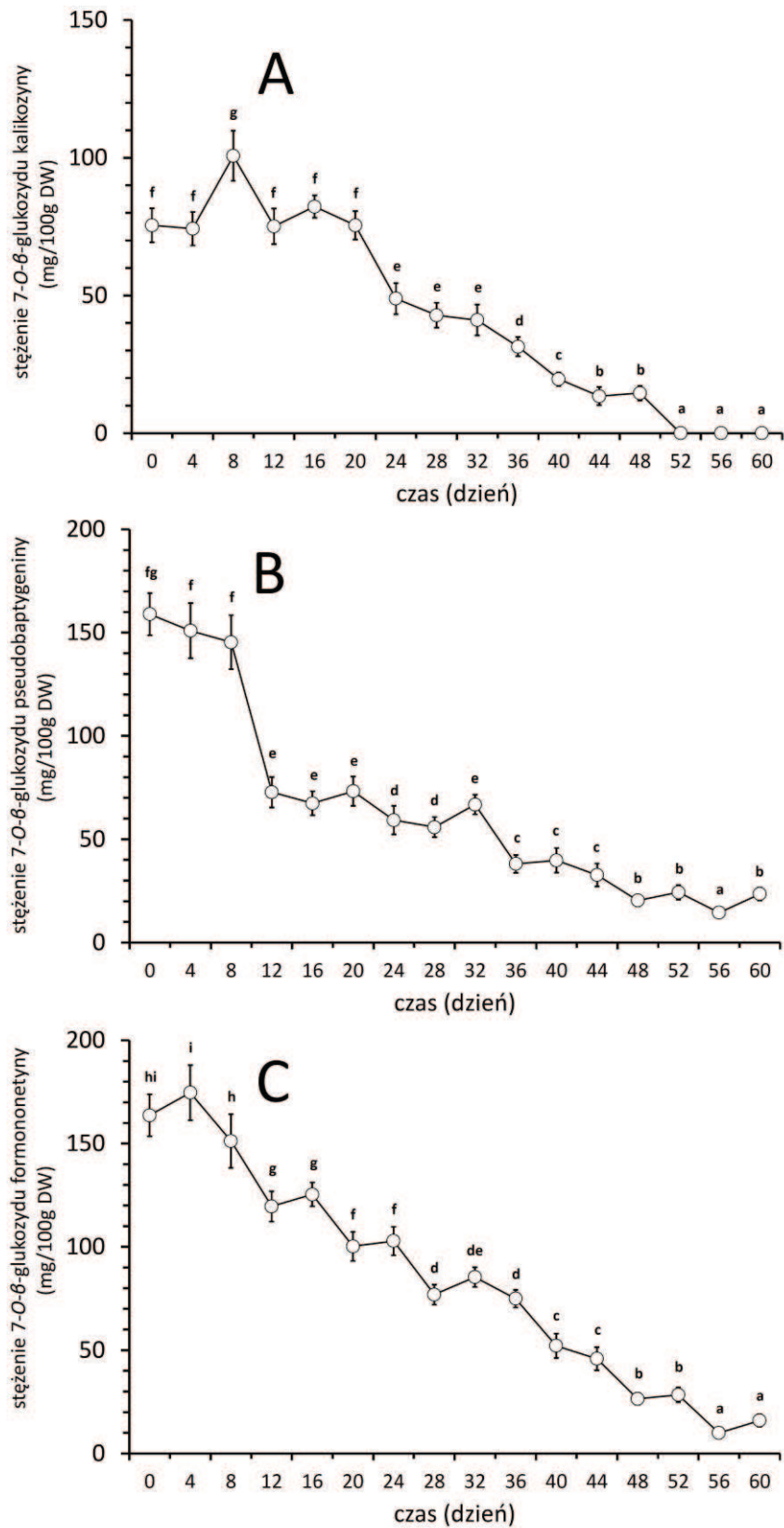
Zawartość 3-*C-β*-glukozydu iriflofenonu, po początkowym, szybkim wzroście, przypadającym na fazę przyrostu liniowego (maksimum produkcji w dniu 16, ok. 600 mg/100 g DW – Ryc. 28C), spadała następnie powoli aż do zakończenia doświadczenia, kiedy poziomy omawianego metabolitu odpowiadały pędom inicjalnym. O ile w przypadku ksantonów trudno było, w oparciu o prowadzone doświadczenia, wyjaśnić przyczynę spadku ich stężeń w badanych tkankach, o tyle dla benzofenonu można uznać, że omawiany związek, jako metabolit pośredni w szlaku biosyntezy mangiferyny, został włączony w jej strukturę (Fujita i Inoue, 1980a, b). Stwierdzenie to potwierdza wcześniejsze o 20 dni maksimum akumulacji benzofenonu, w porównaniu ze wspomnianym ksantonem (36 dzień – Ryc. 28A).

Maksima produkcji 7-*O-β*-glukozydów kalikozyny (\approx 100 mg/100 g DW), pseudobaptygeniny (\approx 160 mg/100 g DW) i formononetyny (\approx 170 mg/100 g DW), przypadają odpowiednio na 8, 0 i 4 dzień eksperymentu, tj. początek cyklu wzrostowego (Ryc. 29A-C). W kolejnych dniach hodowli stężenia wszystkich omawianych izoflawonów gwałtownie spadały aż do końca doświadczenia. Zjawisko to jest bezpośrednio związane ze zmianą w pożywce regulatorów wzrostu z 2iP i TDZ na IBA, powodującego wyraźną elongację pędów.



Ryc. 28. Zawartość mangiferyny (A), izomangiferyny (B) 3-C-β-glukozydu iriflofenonu (C) i hesperydyny (D) w pływnych, stacjonarnych kulturach pędowych *Cycloplia genistoides*.

Odmiernymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).



Ryc. 29. Zawartość 7-O-β-glukozydu kalikozyiny (A), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (B) i 7-O-β-glukozydu formononetyny (C) w płynnych, stacjonarnych kulturach pędowych *Cyclopiopsis genistoides*. Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Jak już stwierdzono na etapie mikrorozmnażania *C. genistoides* (rozdz. II.1.3.1.), postępujący stopień cytodyferencjacji pędów upodabniał ich profil metaboliczny do rośliny macierzystej, charakteryzującej się brakiem połączeń izoflawonoidowych. Stąd właśnie, w 60-dniowym cyklu wzrostowym, wraz z eliminacją cytokinin z tkanek i zmianą statusu morfotycznego kultury, odnotowano spadek zawartości izoflawonów, charakterystycznych dla parenchymatycznych biomas *in vitro*.

W przeciwieństwie do wszystkich omówionych uprzednio połączeń, wyraźnie zaznaczonych zmian zawartości nie odnotowano w przypadku flawanonu – hesperydyny, której stężenie (≈ 60 mg/100 g DW) utrzymywało się na względnie stałym poziomie przez cały okres cyklu wzrostowego (Ryc. 28D).

Obserwowane zmiany w profilu produkcyjnym pędów *in vitro* badanego gatunku, pod względem związków polifenolowych, były wyraźnie skorelowane ze zwiększającym się, w kolejnych dniach cyklu wzrostowego, stopniem zróżnicowania morfogenicznego kultury. Powyższe obserwacje były zarazem analogiczne do zmian poziomów akumulacji wybranych polifenoli odnotowanych w czasie elongacji pędów, stanowiącej jeden z etapów mikrorozmnażania omawianego gatunku (rozdz. II.1.3.1.4.). Tym samym, wykonany eksperyment wraz z wynikami doświadczeń nad kulturami zawieszinowymi *Cyclopia* sp. (rozdz. II.1.2.2.) potwierdza, że zróżnicowanie tkankowe jest niezbędne dla biosyntezy benzofenonów i ksantonów w kulturach *in vitro* *C. genistoides*.

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenie wykazało, że możliwe jest prowadzenie kultur pędowych *C. genistoides* w warunkach ciągłych, z zastosowaniem pożywki płynnej. Wymaga ono jednak posłużenia się systemem immobilizacyjnym w postaci membrany półprzepuszczalnej, oddzielającej rosnącą biomasę od podłoża wzrostowego. Stwierdzono jednocześnie, że z uwagi na dużą wrażliwość mikropędów powyższego gatunku na stres mechaniczny, niemożliwy jest ich wzrost w warunkach kultur wytrząsanych. Analizy fitochemiczne wykazały, że badane biomasy pędowe charakteryzują się dynamicznym wtórnym metabolizmem, o czym świadczyła obecność w nich połączeń z grupy ksantonów, flawanonów, benzofenonów i izoflawonów.

Z uwagi na pozyskiwanie metabolitów wtórnych metodami biotechnologicznymi, otrzymane kultury pędowe można rozpatrywać przede wszystkim jako źródło mangiferyny, izomangiferyny oraz 3-C- β -glukozydu iriflofenonu. Jakkolwiek maksymalne stężenia ksantonów w pędach nie dorównywały zawartości wspomnianych połączeń w roślinie gruntowej (rozdz. II.1.1.4.), to zaletą opracowanego systemu jest możliwość pozyskiwania wybranych związków niezależnie od warunków środowiskowych i dostępności materiału gruntowego. Fakt ten ma duże znaczenie szczególnie wobec rosnących problemów z dostępnością surowca, wynikających z jednej strony z coraz większego zapotrzebowania na herbatę honeybush (Joubert i wsp., 2011), z drugiej zaś ze strat materiału roślinnego na skutek rozległych pożarów fynbosu (Thomas, 2011).

Ze względu na bogaty skład frakcji polifenolowej, obejmującej ksantony, flawanon (hesperydyna), pochodną benzofenonu oraz izoflawony, pędy *C. genistoides* namnożone w warunkach *in vitro* nie mogą być rozpatrywane jako wybiórcze źródło

określonych połączeń, jak to miało miejsce w przypadku zawiesiny *C. subternata*, produkującej jedynie ostatnie z wymienionych związków (rozdz. II.1.2.2.). Najbardziej optymalne wydaje się wykorzystanie opisywanej biomasy do pozyskiwania izomangiferyny, poprzez zbiór surowca w dniu 36, odpowiadającym jej maksymalnej produkcji. Oddzielenie wspomnianego ksantonu od towarzyszących mu, wymienionych wyżej polifenoli, mogłoby być następnie przeprowadzone z użyciem opracowanej równolegle procedury *downstream*, opisaną szczegółowo w rozdz. II.2.3.

II.1.3.2.2. Kultury pędowe *Cyclopia genistoides* prowadzone w bioreaktorze okresowo-zalewowym

Opracowanie systemu do biotechnologicznego pozyskiwania wybranych związków polifenolowych, w oparciu o kultury pędowe *C. genistoides*, wiązało się, podobnie jak to miało miejsce w przypadku zawiesiny *C. subternata* (rozdz. II.1.2.2.), z koniecznością zwiększenia skali hodowli, czyli z adaptacją biomas *in vitro* do wzrostu w bioreaktorach. O ile prowadzenie kultur zawiesinowych możliwe jest z wykorzystaniem klasycznych konstrukcji typu *stirred-tank* (Su, 1995; Kieran i wsp., 1997; Zhong, 2001), o tyle hodowle organowe wymagają przeważnie, z uwagi na zróżnicowanie tkankowe, zastosowania instalacji dostosowanych do specyficznych wymogów badanej biomasy (Curtis, 1993; Hilton i wsp., 1995; Liu i wsp., 2003; Uozumi, 2004; Mishra i Ranjan, 2008).

Wobec dużej wrażliwości pędów *in vitro* *C. genistoides* na stres mechaniczny, w omawianym przypadku, nie było celowe zastosowanie klasycznego bioreaktora mieszająco-napowietrzającego, wykorzystanego uprzednio do prowadzenia hodowli zawiesinowej *C. subternata* (II.1.2.2.3.). Dodatkowy problem stanowiło niekorzystne zjawisko brunatnienia mikropędów *C. genistoides* pod wpływem kontaktu z pożywką, ograniczające możliwość użycia reaktorów typu *air-lift* i *bubble column*, których konstrukcja wymusza najczęściej całkowite zanurzenie kultywowanych biomas (Curtis, 1993; Mishra i Ranjan, 2008; Baque i wsp., 2012).

W celu zmniejszenia stresu mechanicznego, a także ograniczenia powierzchni kontaktu pędów z medium wzrostowym, zdecydowano się na opracowanie instalacji technicznej, umożliwiającej immobilizację pędów w koszu stalowym, umieszczonym w zbiorniku hodowlanym na wysokości zapewniającej zanurzenie w podłożu jedynie dolnej części eksplantatów (rozdz. III.1.7.3.1. – Ryc. 44). Umieszczone poniżej kosza mieszadło magnetyczne zapewniało łagodne mieszanie pożywki, nie generując przy tym dużych sił ścinających. Opisany sposób prowadzenia kultur organowych w bioreaktorach, obejmujący unieruchomienie biomasy przy użyciu siatki lub kosza stalowego, wykorzystany został m.in. dla kultur korzeni włośnikowatych *Atropa belladonna* (Lee i wsp., 1999), *Datura Stramonium* (Hilton i Rhodes, 1990) oraz *Panax ginseng* (Jeong i wsp., 2002). Pokrewne systemy immobilizacji stosowano z powodzeniem także w przypadku biomas *in vitro* roślin z rodziny Fabaceae, w tym kultur pędowych i korzeniowych *Genista tinctoria* (Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2005a, b) oraz pędów *Pueraria tuberosa* (Sharma i wsp., 2011). W celu dodatkowego

ograniczenia kontaktu tkanek z podłożem wzrostowym, pożywkę wpompowywano cyklicznie do zbiornika hodowlanego jedynie na określony okres czasu, po którym była ona z powrotem zwracana do dodatkowego rezerwuaru (rozdz. III.1.7.3.1. – Ryc. 44). W rezultacie, w 90-minutowym cyklu eksperymentalnym biomasa jedynie przez ok. 45 min pozostawała zanurzona w medium wzrostowym. Opisana powyżej prototypowa instalacja stanowiła tym samym połączenie bioreaktora mieszająco-napowietrzającego (*stirred-tank*), wyposażonego w system immobilizacji biomasy, z systemem okresowo-zalewowym (TIB, *temporary immersion bioreactor*). W przeciwieństwie do klasycznych konstrukcji typu *stirred-tank*, znajdujących zastosowanie przede wszystkim w przypadku zawieszin komórkowych (Su, 1995; Kieran i wsp., 1997) bądź biomas korzeniowych (Curtis, 1993; Mishra i Ranjan, 2008), bioreaktory TIB wykorzystywano z powodzeniem do prowadzenia kultur pędowych ukierunkowanych na produkcję metabolitów wtórnych, m.in. takich gatunków jak *Scutellaria baicalensis* (Zobayed i wsp., 2004) oraz *Digitalis purpurea* (Pérez-Alonso i wsp., 2009).

Celem dodatkowego ograniczenia stresu mechanicznego, w opracowanym w toku eksperymentów systemie, napowietrzano bezpośrednio tylko medium wzrostowe znajdujące się w zasobniku, w zbiorniku hodowlanym wymieniano zaś jedynie fazę gazową poprzez przepuszczanie nawilżonego powietrza nad kultywowaną biomasą *C. genistoides* (rozdz. III.1.7.3.1. – Ryc. 44).

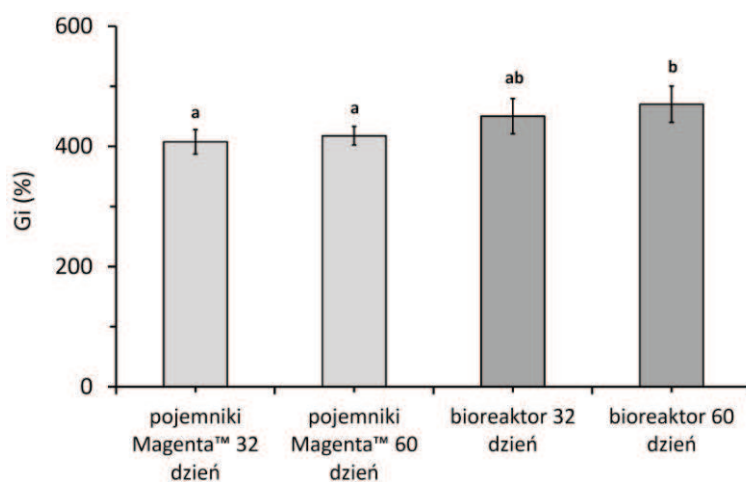
Ze względu na długi cykl wzrostowy badanych kultur, a także dostępność tylko jednej, prototypowej instalacji okresowo zalewowej, zaplanowane doświadczenia obejmowały prowadzenie hodowli jedynie w dwóch cyklach, tj. przez 32 i 60 dni, w warunkach pełnego oświetlenia. Zachowano przy tym taki sam stosunek ilościowy *inoculum* pędowego do objętości pożywki jak w przypadku opisanych uprzednio kultur prowadzonych na tratwach LifeRaft[®], a także identyczny skład pożywki wzrostowej. Po wspomnianych okresach czasu, biomasy zbierano, ważono, wyznaczano dla nich współczynniki przyrostu G_i , a następnie przeznaczano do badań fitochemicznych. Uzyskane wyniki, w zakresie wzrostu biomas i akumulacji związków polifenolowych, porównano następnie z rośliną gruntową oraz pędami rosnącymi na tratwach przez 32 i 60 dni.

II.1.3.2.2.1. Wzrost kultur pędowych *Cyclopia genistoides* namnażanych w systemie okresowo-zalewowym

Obliczone wartości G_i dla kultur pędowych *C. genistoides*, rosnących w bioreaktorze okresowo-zalewowym, były jedynie nieznacznie wyższe od odpowiadających im współczynników przyrostu w hodowlach prowadzonych w pojemnikach Magenta[™] (Ryc. 30).

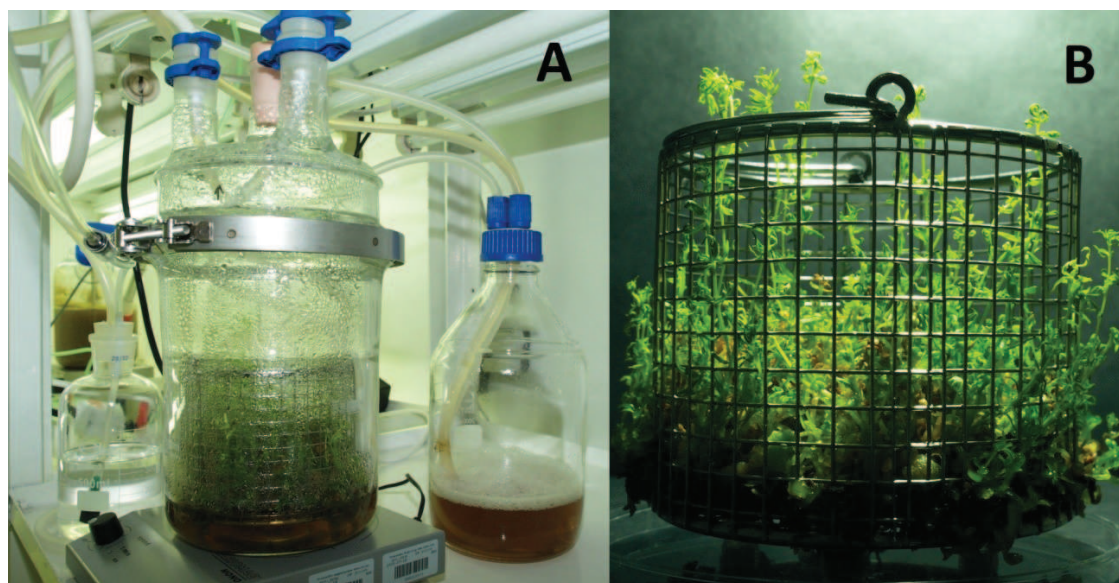
Uzyskane wyniki wykazują więc, że zmiana warunków prowadzenia eksperymentu nie wywarła istotnego wpływu na wzrost kultywowanych biomas. Stosunkowo niskie wartości G_i , uzyskane w pojemnikach Magenta[™] oraz w bioreaktorze, stanowią z jednej strony cechę charakterystyczną długorosnących kultur pędowych miodokrzewu, z drugiej zaś mogą wynikać z ograniczonego kontaktu

biomasy z pożywką wzrostową, a także ze słabego wykorzystania przez rosnące pędy objętości naczynia hodowlanego. W tym miejscu należy podkreślić, że jakkolwiek hodowla pędów *C. genistoides* w warunkach płynnych kultur stacjonarnych umożliwiła, w opisywanym przypadku, zwiększenie skali eksperymentu, to zastosowane rozwiązanie technologiczne stanowi pewnego rodzaju kompromis, wynikający z wrażliwości badanej biomasy na stres mechaniczny.



Ryc. 30. Wartości współczynników przyrostu dla płynnych kultur pędowych *Cyclopa genistoides* rosnących w pojemnikach Magenta™ (system LifeRaft®) oraz bioreaktorze okresowo-zalewowym. Odmiennymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 (pojemniki Magenta) lub 2 (bioreaktor) prób \pm SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Morfologia biomasy rosnącej w bioreaktorze (Fot. 15A, B) była zbliżona do kultur pędowych prowadzonych w pojemnikach Magenta™. W cyklu wzrostowym obserwowano wydłużanie pędów oraz zmniejszenie ich wiotryfikacji, poza częściami tkanek znajdującymi się w bezpośrednim kontakcie z medium wzrostowym.



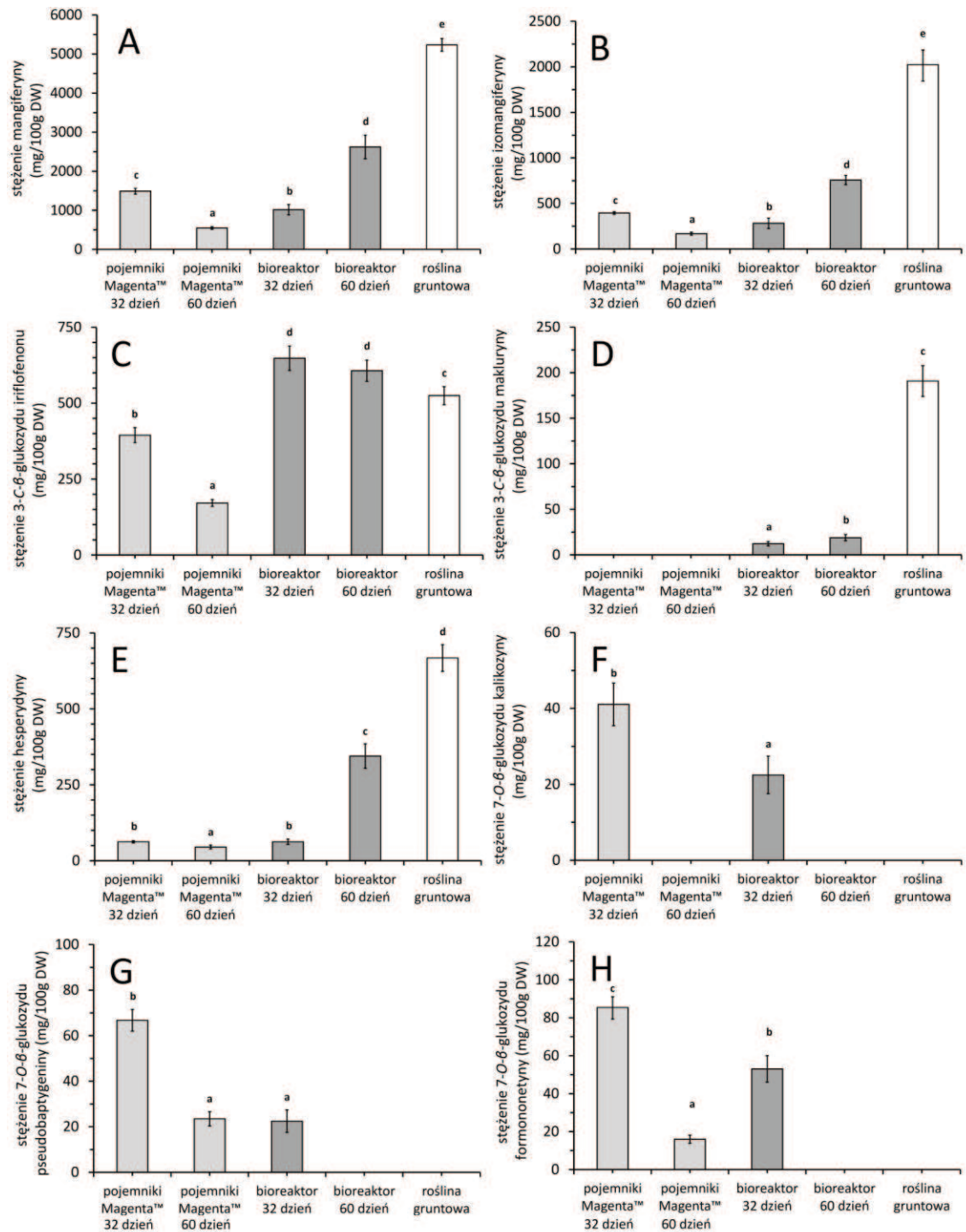
Fot. 15. Kultury pędowe *Cyclopa genistoides* prowadzone w bioreaktorze okresowo-zalewowym przez okres 32 dni. A – widok ogólny instalacji, B – biomasa pędowa immobilizowana w koszu ze stali nierdzewnej.

Podobnie jak w przypadku kultur małoskalowych, wzrostowi pędów w bioreaktorze towarzyszyło brązowienie podstawy eksplantatów oraz medium hodowlanego, co było najprawdopodobniej związane z produkcją związków o charakterze prostych fenoli. Opisane zjawisko było wyraźnie zaznaczone już w 32 dniu eksperymentu, a następnie nasilało się aż do końca cyklu doświadczalnego. Można więc wnioskować, że zastosowanie systemu okresowo-zalewowego nie przyniosło oczekiwanych efektów w postaci ograniczenia zmian nekrotycznych badanych kultur. Wobec powyższego, duża wrażliwość pędów *in vitro* *C. genistoides* wydaje się stanowić specyficzną cechę gatunkową, której nasilenie zależy tylko w ograniczonym stopniu od opracowanych warunków eksperymentalnych.

II.1.3.2.2.2. Akumulacja związków polifenolowych w kulturach pędowych *Cyclopia genistoides* namnażanych w systemie okresowo-zalewowym

Przeprowadzone analizy chromatograficzne wykazały, że przeniesienie kultury pędowej *C. genistoides* do instalacji okresowo-zalewowej nie spowodowało wyraźnych zmian jakościowych w obrębie badanej frakcji polifenolowej (Ryc. 31A-H). Jediną różnicę stanowiła w tym względzie obecność w pędach rosnących w bioreaktorze niewielkich ilości 3-*C*- β -glukozydu makułuryny (Ryc. 31D). Wymieniony związek, występujący w znacznych ilościach także w ziele rośliny gruntowej należy, podobnie jak 3-*C*- β -glukozyd iriflofenonu, do pochodnych benzofenonu stanowiących metabolity pośrednie w szlaku biosyntezy ksantonów (Fujita i Inoue, 1980a, b; Ehling i wsp., 2006). Wielkoskalowe warunki prowadzenia eksperymentu nie spowodowały również zmian w sposobie magazynowania analizowanych połączeń, bowiem wszystkie metabolity zlokalizowane były wewnątrzkomórkowo.

Kultury pędowe *C. genistoides*, prowadzone w bioreaktorze, charakteryzowały się odmienną dynamiką produkcji związków polifenolowych w stosunku do hodowli w pojemnikach Magenta™. Stwierdzenie to dotyczy przede wszystkim ksantonów oraz flawanonu hesperydyny. W związku z tym, wyższe stężenia niniejszych połączeń oznaczono w biomasach kultywowanych w instalacji okresowo-zalewowej przez 60 dni, niż w tkankach 32-dniowych. W przypadku zastosowania niskoskalowego systemu LifeRaft®, zarówno mangiferyna jak również izomangiferyna i hesperydina, akumulowane były w większych ilościach w dniu 32 (Ryc. 31A, B, E). Opisywane zjawisko jest szczególnie widoczne w przypadku flawanonu. Dla niniejszego metabolitu uzyskano 5-krotny wzrost jego stężenia w 60 dniu eksperymentu (ok. 300 mg/100 g DW), w porównaniu z kulturą pędową namnażaną w systemie okresowo-zalewowym przez 32 dni oraz w odniesieniu do biomas kultywowanych w pojemnikach Magenta™. Uzyskane wyniki dowodzą tym samym, że zmiana sposobu prowadzenia kultury pędowej spowodowała przesunięcie maksimum produkcji wymienionych związków o około 30 dni.



Ryc. 31. Zawartość mangiferyny (A), izomangiferyny (B), 3-C-β-glukozydu iriflofenonu (C), 3-C-β-glukozydu makluryny (D), hesperydyny (E), 7-O-β-glukozydu kalikozyiny (F), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (G) i 7-O-β-glukozydu formononetyny (H) w kulturach pędowych *Cyclopia genistoides* prowadzonych w pojemnikach Magenta™ (system LifeRaft®), w bioreaktorze okresowo-zalewowym oraz w roślinie gruntowej.

Odmiennymi literami oznaczono istotnie statystycznie różnice pomiędzy poszczególnymi wartościami, stanowiącymi średnie arytmetyczne z 3 (pojemniki Magenta™) lub 2 (bioreaktor) prób ± SD ($p < 0,05$; test RIR Tukeya).

Spośród pochodnych benzofenonu, wyższy poziom akumulacji, w 60 dniu cyklu wzrostowego, stwierdzono jedynie dla 3-C- β -glukozydu makturyiny (Ryc. 31D). Powyższej prawidłowości nie zaobserwowano w przypadku 3-C- β -glukozydu iriflofenonu. Stężenie wspomnianego metabolitu utrzymywało się jednak w pędach na zbliżonym i jednocześnie stosunkowo wysokim poziomie (600-650 mg/100 g DW) w obydwu rejestrowanych dniach cyklu wzrostowego (Ryc. 31C).

Dynamika produkcji połączeń izoflawonoidowych w bioreaktorze była zbliżona do stwierdzonej uprzednio dla kultur prowadzonych w pojemnikach Magenta™, charakteryzujących się wyższymi zawartościami niniejszych połączeń w 32 dniu kultywacji, niż w końcowym etapie cyklu wzrostowego. W przypadku systemu okresowo-zalewowego, zjawisko to uległo pogłębieniu. 7-O- β -glukozydy kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny były tu obecne jedynie w biomacie 32-dniowej, a poszczególne ich zawartości spadły od 30 do 70 % w porównaniu z pędami rosnącymi na tratwach LifeRaft® (Ryc. 31F-H). Jak już wcześniej wspomniano, opisywany fenomen powiązано ze zmianą statusu morfotycznego pędów, wydłużających się w kulturze pod wpływem IBA.

W rezultacie, pędy *in vitro* *C. genistoides*, rosnące w systemie okresowo-zalewowym przez 60 dni, można uznać, z uwagi na całkowity brak izoflawonów, za wybiórcze źródło pochodnych benzofenonu, ksantonów oraz flawanonu hesperydyny (Ryc. 31).

Opracowany, w ramach niniejszej pracy, system okresowo-zalewowy wydaje się być odpowiedni do prowadzenia kultur pędowych *C. genistoides*. Napotkane w toku badań trudności, związane m.in. z dużą wrażliwością pędów *in vitro* na stres mechaniczny, wynikają najprawdopodobniej ze specyficznych cech gatunkowych badanej rośliny. Uzyskane kultury wielkoskalowe zachowały zdolność do produkcji połączeń polifenolowych z grupy ksantonów, flawanonów i benzofenonów, osiągnęte poziomy akumulacji wymienionych związków były jednak w większości przypadków niższe w porównaniu z częściami nadziemnymi rośliny gruntowej (Ryc. 31A-H).

Zestawienie produktywności uzyskanych kultur *in vitro* dla poszczególnych metabolitów wtórnych (Tab. 15) wskazuje, że pędy rosnące w pojemnikach Magenta™ (system LifeRaft®) stanowią znacznie bogatsze, w porównaniu z biomasą kultywowaną w bioreaktorze okresowo-zalewowym, źródło wybranych polifenoli. Uwagę zwraca zwłaszcza, uzyskana w tym wypadku, wysoka produktywność dla mangiferyny i 3-C- β -glukozydu iriflofenonu (w dniu 16 – odpowiednio 9,64 i 4,31 mg l⁻¹ d⁻¹) oraz izomangiferyny (w dniu 36 – 2,92 mg l⁻¹ d⁻¹). Z uwagi na obecność bogatego zespołu związków polifenolowych obejmującego, oprócz wymienionych wyżej połączeń, również pochodne izoflawonoidowe, wspomniane kultury nie mogą być jednak uznane za wybiórcze źródło określonych metabolitów. Izolacja poszczególnych związków, w postaci czystej, ze wspomnianej matrycy roślinnej, wymagałaby najprawdopodobniej zastosowania skomplikowanych procedur *downstream*, zmniejszając tym samym opłacalność prowadzonej hodowli.

Tab. 15. Produktivność płynnych kultur pędowych *Cyclopia genistoides*, prowadzonych w pojemnikach Magenta™ (membrana LifeRaft®) oraz w bioreaktorze okresowo-zalewowym, pod względem połączeń polifenolowych.*

Warunki eksperymentu	Czas wzrostu biomasy (dni)	Produktivność (mg l ⁻¹ d ⁻¹)									
		mangiferyna	izomangiferyna	hesperydyna	3-C-β-glukozyd makułuryny	3-C-β-glukozyd iriflofonu	3-C-β-glukozyd	7-O-β-glukozyd kalikozydu	7-O-β-glukozyd pseudobaptygeniny	7-O-β-glukozyd	7-O-β-glukozyd formononetyny
pojemniki Magenta™ (membrana LifeRaft®)	4	3,77	1,06	0,66	0,00	2,57	0,95	1,92	2,23		13,16
	16	9,64	1,15	0,45	0,00	4,31	0,60	0,49	0,91		17,54
	36	7,56	2,92	0,29	0,00	1,55	0,13	0,16	0,31		12,92
bioreaktor okresowo-zalewowy	32	4,76	1,33	0,29	0,06	3,04	0,10	0,11	0,25		9,93
	60	5,48	1,58	0,72	0,04	1,27	0,00	0,00	0,00		9,09

* Pogrubioną czcionką zaznaczono najwyższe produktivności (wyrażone jako ilość mg związku wytwarzana w 1 litrze kultury w ciągu 1 dnia) dla poszczególnych połączeń polifenolowych, oraz ich sumy, uzyskane odpowiednio w pojemnikach Magenta™ oraz w bioreaktorze okresowo-zalewowym.

Znacznie korzystniejsze, z uwagi na pozyskiwanie połączeń polifenolowych, wydaje się prowadzenie kultury pędowej *C. genistoides* w systemie okresowo-zalewowym. Jak już wcześniej wspomniano, tkanki rosnące w skonstruowanym bioreaktorze przez 60 dni nie zawierały w ogóle pochodnych izoflawonoidowych (Ryc. 31), wykazując tym samym profil produkcyjny zbliżony do rośliny macierzystej. Z tego względu, powyższy system hodowlany umożliwia, pomimo teoretycznie niższej produktywności, wydajniejszą izolację poszczególnych polifenoli. W opisywanym przypadku, zastosowanie mógłby znaleźć zwłaszcza protokół *downstream*, opracowany w niniejszej pracy, dla niefermentowanych części nadziemnych *C. genistoides*, obejmujący preparatywne rozdzielenie mieszaniny polifenoli złożonej z mangiferyny, izomangiferyny, hesperydyny oraz 3-C- β -glukozydów makułuryny i iriflofenonu (rozdz. II.2.3.).

Istotną zaletą opracowanego systemu hodowlanego jest zapewnienie produkcji polifenoli o dużej wartości rynkowej, niezależnie od warunków środowiskowych i dostępności materiału gruntowego. W przeciwieństwie do kultur pędowych prowadzonych w pojemnikach Magenta™ z użyciem systemu LifeRaft®, których namnażanie jest zarówno czasochłonne jak i mało wydajne pod względem uzyskanych ilości biomasy, instalacja o charakterze bioreaktora umożliwia ponadto zwiększenie skali eksperymentu oraz automatyzację procesu (Paek i wsp., 2001, 2005).

Podsumowując, przeprowadzone w ramach niniejszego projektu badania biotechnologiczne umożliwiły opracowanie, w oparciu o zawiesinę parenchymatyczną *C. subternata* oraz mikropędy *C. genistoides*, dwóch systemów *in vitro* o wysokiej zawartości polifenoli. Kultura zawiesinowa *C. subternata*, prowadzona w 2 l bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, w pożywce MS suplementowanej 3 % w/v sacharozy, 20,19 μ M 4-CPPU i 1,96 μ M 2,4,5-T, stanowiła wybiórcze źródło trzech izoflawonów nieobecnych w roślinie macierzystej, tj. 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny. Modyfikacja warunków hodowlanych, obejmująca wzrost biomasy bez dostępu światła oraz dokarmianie komórek wodą kokosową, spowodowała wzrost poziomów akumulacji wspomnianych związków w kulturze zawiesinowej. Produktywności dla wymienionych wyżej połączeń wyniosły, w opisywanym przypadku, odpowiednio 0,96, 0,44 i 0,22 mg l⁻¹ d⁻¹.

Drugi z opracowanych systemów do biotechnologicznej produkcji połączeń polifenolowych, obejmował prowadzenie kultur pędowych *C. genistoides* w 1 l instalacji okresowo-zalewowej, z użyciem podłoża SH suplementowanego 1,5 % w/v sacharozy oraz 4,92 μ M IBA. Pędy *in vitro* wymienionego gatunku, rosnące w powyższych warunkach przez 60 dni, stanowiły bogate, wybiórcze źródło ksantonów, hesperydyny, oraz pochodnych benzofenonu. Produktywności opisywanej kultury względem mangiferyny, izomangiferyny, hesperydyny oraz 3-C- β -glukozydu iriflofenonu, wyniosły odpowiednio 5,48, 1,58, 0,72 i 1,27 mg l⁻¹ d⁻¹.

Biorąc pod uwagę uzyskane rezultaty można uznać, że kultury *in vitro* *C. subternata* i *C. genistoides* mogą być wykorzystane do pozyskiwania wybranych połączeń polifenolowych z grupy ksantonów, flawanonów, beznofenonów oraz izoflawonów. Istotny jest przy tym fakt, że dla obydwu systemów produkcyjnych

opracowano równolegle procedury *downstream* (rozdz. II.2.3.), umożliwiające pozyskanie poszczególnych metabolitów w postaci czystej. Uzyskane tą drogą polifenole mogą być w przyszłości wykorzystane w szeroko rozumianych badaniach biomedycznych, mających na celu ustalenie kierunków działań fizjologicznych biosyntezywanych połączeń.

II.2. Badania fitochemiczne

Równolegle do doświadczeń biotechnologicznych, w ramach realizowanego projektu prowadzono prace fitochemiczne zmierzające do określenia profilu metabolicznego zarówno biomas *in vitro*, jak i roślin macierzystych, w zakresie związków polifenolowych. W pierwszej kolejności, obejmowały one opracowanie procedury przygotowania ekstraktów (dobór rozpuszczalnika, sposób ekstrakcji i oczyszczanie surowych wyciągów) z badanych matryc roślinnych, z przeznaczeniem do zasadniczych analiz fitochemicznych. Jednocześnie, w ramach wstępnych eksperymentów, dokonano wyboru odpowiedniej metody instrumentalnej do prowadzenia oznaczeń jakościowych oraz ilościowych poszczególnych składników zespołu związków polifenolowych obecnych w miodokrzewach. W oparciu o dane literaturowe dotyczące oznaczeń pochodnych fenylopropanu (De Rijke i wsp., 2006; Marston i Hostettmann, 2006; Stalikas, 2007; Corradini i wsp., 2011) oraz doświadczenie własne Promotora pracy (Łuczkiwicz i Głód, 2003, 2005; Łuczkiwicz i wsp., 2004; Łuczkiwicz i Kokotkiwicz, 2005a, b), metodą z wyboru stosowaną w analizach fitochemicznych była wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). W ramach prac eksperymentalnych, zoptymalizowano warunki rozdzielania powyższą metodą zespołu badanych wtórnych metabolitów, poddając optymalną procedurę walidacji, obejmującej m.in. wyznaczenie dokładności, precyzji wewnątrz- i międzygrupowej, liniowości oraz limitów detekcji i oznaczalności, dla poszczególnych połączeń. Opracowany protokół eksperymentalny wykorzystywano następnie do prowadzenia badań skryningowych biomas *in vitro* pozyskanych na wszystkich etapach doświadczeń biotechnologicznych, jak również do analiz referencyjnych próbek roślin gruntowych, w zakresie wybranych polifenoli. Uzyskane wyniki pozwoliły na ocenę skuteczności poszczególnych strategii eksperymentalnych, stosowanych w celu zwiększenia poziomu akumulacji metabolitów wtórnych w kulturach tkankowych miodokrzewów. Tym samym, analizy fitochemiczne stanowiły integralną i niezbędną część całościowego procesu biotechnologicznego otrzymywania wybranych związków.

Obok skryningowych analiz jakościowych i ilościowych, zaplanowane eksperymenty fitochemiczne obejmowały izolację oraz określenie tożsamości niezidentyfikowanych do tej pory składników zespołu polifenolowego, obecnego w badanych biomasach *in vitro* i roślinach macierzystych *Cyclopia* sp. Opracowanie metody izolacji wybranych związków z materiału *in vitro* wpasowuje się więc w realizację podstawowego celu projektu i stanowi integralną część procedury *downstream* protokołu otrzymywania związków polifenolowych.

Kierując się wynikami przeprowadzonych analiz skryningowych, wstępne badania izolacyjne obejmowały wyselekcjonowanie biomas zawierających największe ilości polifenoli o nieustalonej strukturze. Otrzymane, według opracowanej dla miodokrzewów metody ekstrakcji, wyciągi wzbogacono w poszukiwane połączenia polifenolowe wykorzystując standardowe techniki, obejmujące m.in. frakcjonowaną ekstrakcję ciecz-ciecz oraz precypitację. Ostatnim etapem prac preparatywnych było dokonanie wyboru sposobu separacji wybranych metabolitów wtórnych metodami chromatograficznymi, co stanowiło jednocześnie finalny etap oczyszczania poszczególnych związków polifenolowych.

Tożsamość wyizolowanych połączeń określano metodami chromatograficznymi (LC-DAD oraz LC-ESI-MS), a także przy użyciu jedno- i dwukierunkowych technik NMR. Zidentyfikowane związki wykorzystano następnie jako substancje wzorcowe w toku jakościowych oraz ilościowych analiz skryningowych zespołów polifenoli, obecnych w biomasach *in vitro*, oraz w roślinach gruntowych.

Identyfikacja nieznanymi dotychczas związków w roślinach macierzystych przyczyniła się ponadto do pełniejszego rozpoznania „potencjału biologicznego” miodokrzewów.

II.2.1. Przygotowanie frakcji polifenolowych z materiału gruntowego oraz biomas *in vitro* roślin z rodzaju *Cyclopia*

Ekstrakty z części nadziemnych roślin z rodzaju *Cyclopia*, a także odpowiadających im biomas *in vitro*, przeznaczone do skryningowych analiz HPLC, przygotowywano wg protokołu zamieszczonego w rozdz. III.2.3.1. (Ryc. 45). Opisaną procedurę sporządzania wyciągów stanowi modyfikację metod ekstrakcji wykorzystywanych wcześniej, w czasie badań frakcji polifenolowych występujących w kulturach tkankowych *Genista* sp. (Łuczkiwicz i Głód, 2003, 2005, Łuczkiwicz i Kokotkiewicz, 2005a, b) oraz w częściach nadziemnych miodokrzewów (Joubert i wsp., 2003). Sposób przygotowania materiału roślinnego (liofilizacja lub suszenie, odpowiednio dla biomas *in vitro* i roślin gruntowych), wybór rozpuszczalnika (metanol) oraz warunków ekstrakcji (trzykrotne ogrzewanie surowca z rozpuszczalnikiem w temp. 50 °C, połączone z mieszaniem) związane były z względnie słabą rozpuszczalnością podstawowych wtórnych metabolitów występujących w rodzaju *Cyclopia*, tj. ksantonu mangiferyny (De Souza i wsp., 2009) oraz flawanonu hesperydyny (Grohmann i wsp., 2000), a także z ich dużą odpornością na hydrolizę (Grohmann i wsp., 2000; Bock i wsp., 2008). Z uwagi na semipolarny charakter użytego ekstrahenta (metanol), przygotowane wg powyższej procedury wyciągi zawierały znaczną ilość balastów o charakterze niepolarnym, w tym przede wszystkim chlorofil. Poprzez impregnację kolumn chromatograficznych, stosowanych w pracach analitycznych, mogły one powodować szybką utratę ich zdolności rozdzielczych (Łuczkiwicz, 2006). Z uwagi na powyższe, a także ze względu na przewidywane setki analitów roślinnych, przeznaczonych do badań skryningowych, w opisywanym projekcie postanowiono oczyszczać pierwotne wyciągi polifenolowe metodą frakcjonowanej ekstrakcji ciecz-

ciecz z użyciem chloroformu. Frakcje chloroformowe, po uprzednim stwierdzeniu w nich braku związków polifenolowych, odrzucono, zaś pozostałe wyciągi wodne („pierwotne wyciągi H₂O”) przeznaczono do dalszych prac fitochemicznych. W przypadku analiz skryningowych biomas roślinnych, ekstrakty wodne odparowywano do sucha według opisanej w części eksperymentalnej procedury, rozpuszczano ponownie w metanolu i po odwirowaniu kierowano do badań chromatograficznych (rozdz. III.2.3.1. – Ryc. 45).

Podczas zaplanowanych prac izolacyjnych zastosowano rozszerzoną procedurę przygotowania wyciągów roślinnych, obejmującą uzyskanie frakcji wzbogaconych w wybrane związki polifenolowe, metodą ekstrakcji ciecz-ciecz rozpuszczalnikami o zmiennej polarności (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 46-48). Po wyselekcjonowaniu biomas *in vitro* oraz *in vivo*, odpowiednich do przeprowadzenia izolacji niezidentyfikowanych, bądź pożądaných ze względu na ograniczoną dostępność rynkową polifenoli, 100-200 g porcje surowców roślinnych ekstrahowano w sposób analogiczny do próbek przeznaczonych do badań skryningowych, uzyskując w rezultacie „pierwotne wyciągi H₂O”. Natępnie, roztwory wodne frakcjonowano przy użyciu octanu etylu, celem dodatkowego oczyszczenia zespołu polifenoli od polarnych składników balastowych występujących w wyciągach pierwotnych. Jednocześnie w ten sposób zamierzano otrzymać frakcje o zwiększonej zawartości badanych metabolitów wtórnych. Wybrane frakcje octanowe, charakteryzujące się znaczną zawartością pożądaných polifenoli, poddawano dalszym zabiegom oczyszczania/separacji wg schematów zamieszczonych i omówionych szczegółowo w części eksperymentalnej (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 46-48). Procedury wzbogacania wyciągów w związki polifenolowe metodą frakcjonowanej bądź sekwencyjnej ekstrakcji należą do często stosowanych w pracach preparatywnych z użyciem materiału roślinnego (De Rijke i wsp., 2006; Marston i Hostettmann, 2006; Stalikas, 2007). Co istotne, wykorzystywano je także podczas izolacji polifenoli z części nadziemnych miodokrzewów: *C. intermedia* (Ferreira i wsp., 1998; Kamara i wsp., 2003) oraz *C. subternata* (Kamara i wsp., 2004; De Beer i wsp., 2009).

Wybrane, bogate w polifenole frakcje, stanowiące roztwory bądź osady, uzyskane w toku zaplanowanych prac preparatywnych, przeznaczono do dalszych etapów izolacji z wykorzystaniem technik chromatograficznych (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 46-48; rozdz. III.2.4.3.).

II.2.2. Oznaczenia jakościowe i ilościowe związków polifenolowych w biomasach *in vitro* i roślinach gruntowych *Cyclopia* sp.

II.2.2.1. Wybór metody analitycznej

Uzyskane z biomas *Cyclopia* sp., oczyszczone frakcje polifenolowe, analizowano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Wspomniana technika należy do najczęściej stosowanych w przypadku analiz związków fenolowych pochodzenia naturalnego, będąc tym samym „metodą z wyboru” dla znacznej ilości surowców roślinnych. Biorąc pod uwagę analitykę polifenoli, do

podstawowych zalet HPLC należą: możliwość sprawnej separacji złożonych mieszanin związków, a także duży wybór dostępnych rodzajów detekcji (De Rijke i wsp., 2006; Marston i Hostettmann, 2006; Stalikas, 2007; Corradini i wsp., 2011). Dla celów bieżących analiz, istotna była ponadto przydatność powyższej metody do oceny zawartości ksantonów (Bo i Liu, 2004), stanowiących, obok flawonoidów, podstawowe wtórne metabolity w roślinach z rodzaju *Cyclopia* (Joubert i wsp., 2008a).

W badaniach wchodzących w zakres niniejszej pracy zdecydowano się na rozdzielanie frakcji polifenolowych w warunkach typowych dla wspomnianej grupy związków, tj. w układzie faz odwróconych (kolumna oktadecylowa, faza ruchoma złożona z acetonitrylu, wody i modyfikatora kwasowego), z wykorzystaniem elucji gradientowej (De Rijke i wsp., 2006; Marston i Hostettmann, 2006; Stalikas, 2007; Corradini i wsp., 2011). Ze względu na budowę chemiczną analizowanych połączeń, warunkującą ich zdolność do absorpcji promieniowania ultrafioletowego (obecność pierścieni fenolowych i wiązań podwójnych), w jakościowych oraz ilościowych analizach chromatograficznych wykorzystano w pierwszej kolejności detekcję DAD (*diode array detector*). Do zalet detektora diodowego należą między innymi: bardzo dobra czułość, stabilność pracy, niezawodność oraz prostota obsługi sprawiające, że jest on doskonałym narzędziem do prowadzenia seryjnych analiz skryningowych. Widmo DAD dostarcza ponadto podstawowych informacji dotyczących struktury oznaczanych połączeń, ze względu na obserwowane różnice w położeniu maksimów absorpcji poszczególnych grup związków (ksantony, flawony, flawanony, izoflawony itd.). Z uwagi na fakt, że zaplanowane, w ramach niniejszej pracy, badania fitochemiczne obejmowały określenie tożsamości nierozpoznanych do tej pory składników polifenolowych w roślinach gruntowych oraz biomasach *in vitro* miodokrzewów, uzyskane pierwotne wyciągi (a także frakcje otrzymane w toku prac preparatywnych – rozdz. II.2.3. i III.2.4.) analizowano dodatkowo z użyciem detektora ESI-MS (*electrospray ionization/mass spectrometry*, jonizacja przez elektrorozproszenie w trybie jonów ujemnych – NI-ESI), pozwalającego m.in. na określenie masy cząsteczkowej związku, rodzaju połączenia (aglikon, glikozyd lub diglikozyd), typu glikozydacji (*O*- lub *C*-glikozyd) i masy aglikonu (Cuyckens i Clays, 2004; De Rijke i wsp., 2006; Fossen i Andersen, 2006; Corradini i wsp., 2011).

Ostatecznie, o wyborze wysokosprawnej chromatografii cieczowej, jako podstawowej techniki analitycznej, zadecydował fakt, że została ona uprzednio z powodzeniem zoptymalizowana do prowadzenia oznaczeń ilościowych ksantonów i flawonoidów występujących w surowcach *Cyclopia* sp., pochodzących z upraw gruntowych (Joubert i wsp., 2003). W cytowanej pracy, analizy chromatograficzne wykonano w układzie faz odwróconych z użyciem elucji gradientowej, wykorzystując detekcję DAD. Oznaczenia ilościowe prowadzono przy długości fali $\lambda = 280$ nm, co pozwoliło na uzyskanie dobrej czułości względem hesperydyny, jak również innych połączeń polifenolowych o zbliżonych maksimach absorpcji (flawanony, dihydrochalkony, pochodne benzofenonu). Jakkolwiek wymieniona długość fali była mniej odpowiednia do prowadzenia oznaczeń ksantonów, obecność znacznych ilości tych połączeń w większości badanych próbek sprawiała, że nie było konieczności dodatkowego zwiększania czułości metody poprzez zastosowanie detekcji przy $\lambda = 258$

nm (maksimum absorpcji dla mangiferyny i izomangiferyny) (Joubert i wsp., 2003). Z uwagi na powyższe, również w ramach opisywanych analiz chromatograficznych, zdecydowano się na prowadzenie oznaczeń jakościowych i ilościowych przy długości fali 280 nm.

Tożsamość związków polifenolowych obecnych w ekstraktach określano w oparciu o analizę widm LC-DAD oraz ESI-MS, porównanie czasów retencji z substancjami referencyjnymi (w przypadku ich dostępności) a także, dla połączeń izolowanych, poprzez porównanie ich danych spektroskopowych (NMR) z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. Analizy prowadzono w trybie jonów ujemnych, zapewniającym w większości przypadków wysoką czułość oraz niski poziom szumów, pozwalając tym samym na identyfikację połączeń występujących nawet w niewielkich stężeniach (Cuyckens i Clays, 2004; De Rijke i wsp., 2006; Corradini i wsp., 2011). Negatywny tryb pracy detektora ESI-MS zastosowano także podczas wcześniejszych analiz LC-MS wyciągów z *Cyclopia* sp., ukierunkowanych na określenie składu jakościowego surowców fermentowanych i nie poddanych fermentacji (Joubert i wsp., 2008c).

Powtórzenie warunków analizy HPLC stosowanych dla miodokrzewów przez Joubert i wsp. (2003), nie doprowadziło do całkowitej separacji mieszaniny polifenoli występujących w kulturach *in vitro* *Cyclopia* sp. (obecność niezidentyfikowanych w roślinach gruntowych połączeń izoflawonoidowych – rozdz. II.1.1.4.). Z uwagi na powyższe, frakcje polifenolowe występujące w badanych matrycach roślinnych rozdzielano w warunkach zoptymalizowanych w toku projektu. W eksperymentach stosowano kolumnę Supelcosil RP-18 oraz elucję gradientową w układzie rozpuszczalników złożonym z wody, acetonitrylu, i kwasu mrówkowego. Całkowitą separację badanych wtórnych metabolitów (ogółem 16 połączeń z klasy flawonów, flawanonów, dihydrochalkonów, izoflawonów, ksantonów oraz benzofenonów) uzyskano w wyniku zastosowania w fazie ruchomej 0,1 % dodatku modyfikatora kwasowego (HCOOH), elucji gradientowej oraz długiego czasu pojedynczej analizy (czas potrzebny do rozdzielania zespołu polifenoli wynosił, w zależności od surowca, około 40-60 min). W tym miejscu należy podkreślić, że w zoptymalizowanych warunkach możliwe było nie tylko rozdzielenie mieszaniny 3 izoflawonów występujących w kulturach *in vitro*, ale również benzofenonów zidentyfikowanych po raz pierwszy w miodokrzewach, w ramach niniejszej pracy (II.2.3. i III.2.4.).

II.2.2.2. Analizy jakościowe

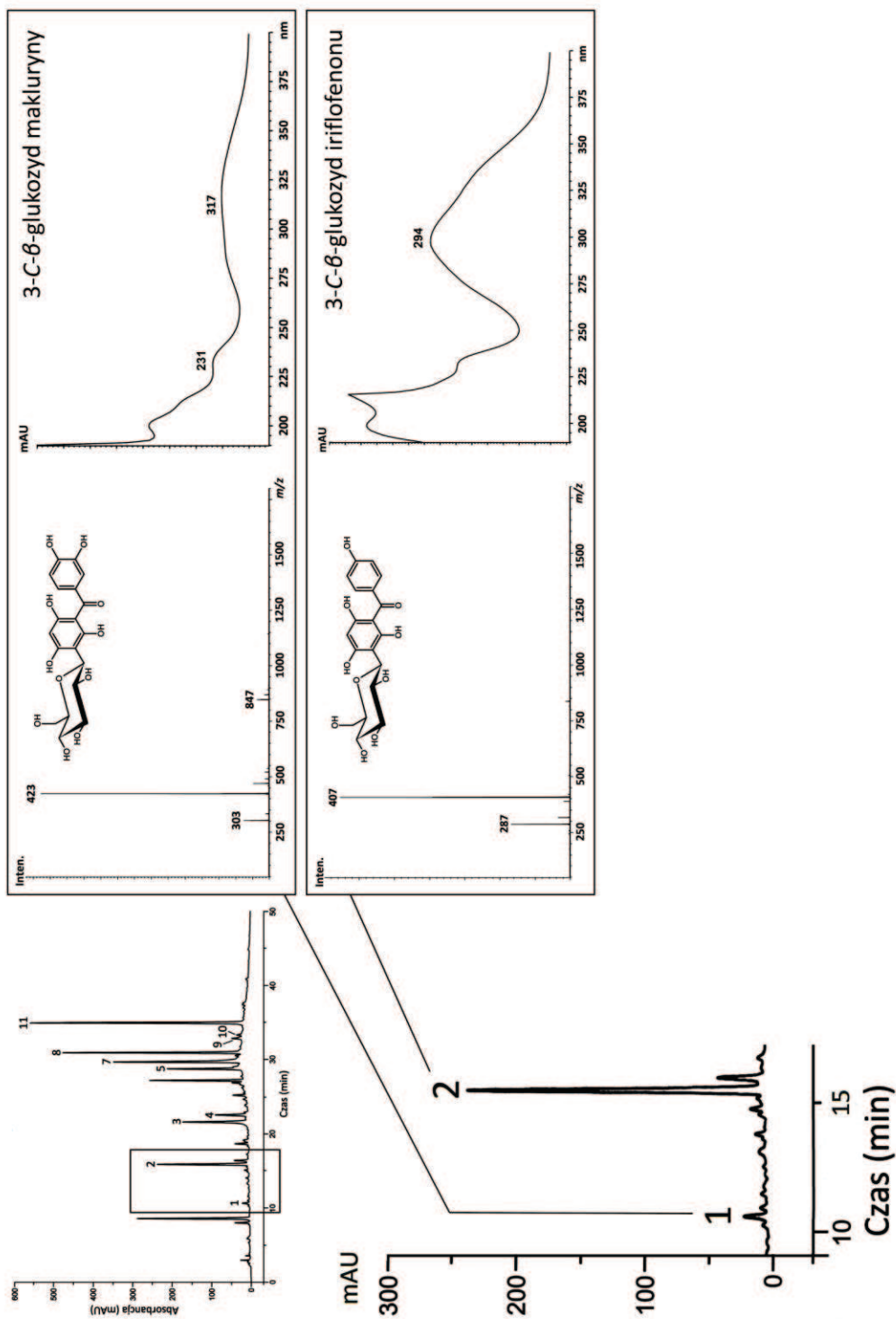
Przedstawiona w rozdz. II.2.2.1. i III.2.3.3., zoptymalizowana metoda chromatograficznego rozdzielania związków polifenolowych, została wykorzystana do prowadzenia analiz skryningowych frakcji polifenolowych uzyskanych z części nadziemnych roślin gruntowych (zarówno w postaci niefermentowanej, jak i poddanych fermentacji) oraz z kultur *in vitro* miodokrzewów. W pierwszej kolejności, opracowany sposób separacji posłużył do oceny składu jakościowego poszczególnych matryc roślinnych w zakresie badanych związków. Uzyskane informacje pozwoliły m.in. na wyselekcjonowanie biomas *Cyclopia* sp. (z uwzględnieniem kultur *in vitro* oraz

materiału gruntowego), zawierających niezidentyfikowane do tej pory składniki polifenolowe. Związki te zostały wyizolowane w toku prac preparatywnych opisanych w rozdz. II.2.3. i III.2.4., zaś ich tożsamość określono jednoznacznie przy użyciu jedno- i dwukierunkowych technik NMR (rozd. II.2.4. i III.2.5.). Pozyskane połączenia wykorzystano następnie jako substancje wzorcowe w czasie analiz jakościowych i ilościowych zespołu związków polifenolowych występujących w niefermentowanym i poddanym fermentacji materiale z roślin gruntowych (rozd. II.2.2.3.), oraz w biomasach *in vitro* pozyskanych w toku prac biotechnologicznych (rozd. II.1.).

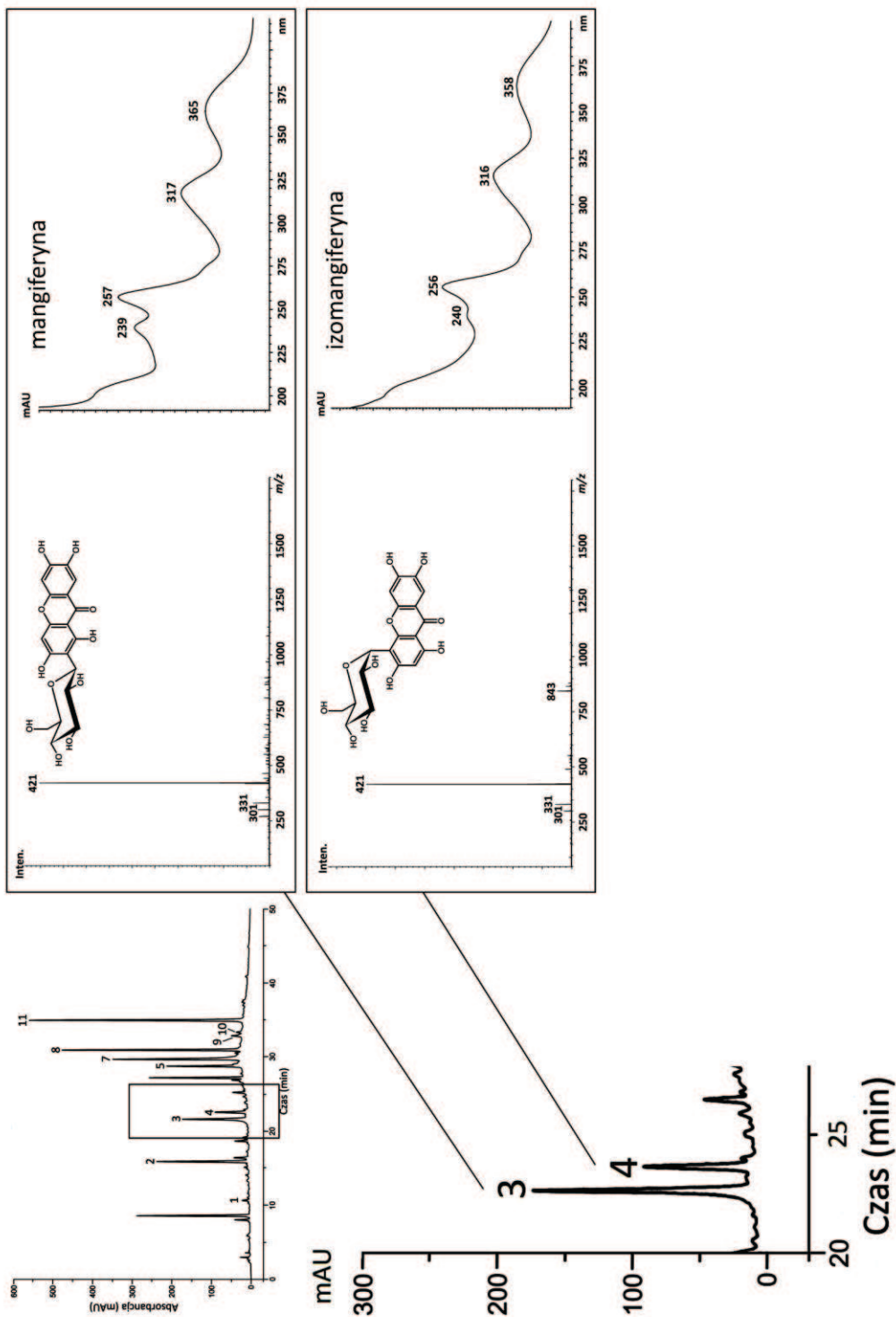
Spośród roślin macierzystych, obecnością największej ilości związków polifenolowych charakteryzowały się nie poddane fermentacji części nadziemne gatunków *C. subternata* oraz *C. intermedia* (tzw. „zielona” herbata honeybush). Z tego względu, skład frakcji fenolowych miodokrzewów omówiono na przykładzie wyżej wymienionych gatunków. Chromatogramy dotyczące rozdziału zespołu związków polifenolowych występujących w *C. subternata*, wraz z widmami LC-DAD i LC-ESI-MS poszczególnych połączeń, przedstawiono na rycinach 32-35.

Analizy HPLC wykazały, w częściach nadziemnych *C. subternata*, obecność połączeń z grupy ksantonów i flawanonów, zidentyfikowanych wcześniej przy pomocy technik NMR i LC-MS w ziele szeregu gatunków z rodzaju *Cyclopia* (Joubert i wsp., 2008a, c; De Beer i Joubert, 2010). Należą do nich: mangiferyna (**3**) – Rt = 22,5 min, UV λ_{\max} : 239, 257, 317, 365 nm, m/z : 421 [M-H]⁻, 331 [M-H-90]⁻, 301 [M-H-120]⁻, izomangiferyna (**4**) – Rt = 23,0 min, UV λ_{\max} : 240, 256, 316, 358 nm, m/z : 421 [M-H]⁻, 843 [2M-H]⁻, 331 [M-H-90]⁻, 301 [M-H-120]⁻, eriocytryna (**5**) – Rt = 28,7 min, UV λ_{\max} : 282, 325 nm, m/z : 595 [M-H]⁻, 287 [M-rutynoza-H]⁻, narirutyna (**9**) – Rt = 33,0 min, UV λ_{\max} : 282, 327 nm, m/z : 579 [M-H]⁻, 271 [M-rutynoza-H]⁻ oraz hesperydyna (**11**) – Rt = 35,2 min, UV λ_{\max} : 283, 324 nm, m/z : 609 [M-H]⁻, 300 [M-rutynoza-H]⁻ (Ryc. 33-35). Związek **7** (Rt = 30,3 min, UV λ_{\max} : 253, 265, 347 nm, m/z : 593 [M-H]⁻, 285 [M-308-H]⁻), charakteryzujący się widmem UV typowym dla flawonów (Mabry i wsp., 1970; Ryc. 34), oznaczony został uprzednio jako 7-*O*-rutynozyd luteoliny (skolimozyd) (De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010). Z uwagi na brak odpowiedniego wzorca oraz fragmentaryczne analizy NMR (Kamara i wsp., 2004), nie udało się jednak jednoznacznie potwierdzić struktury niniejszego metabolitu (De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010).

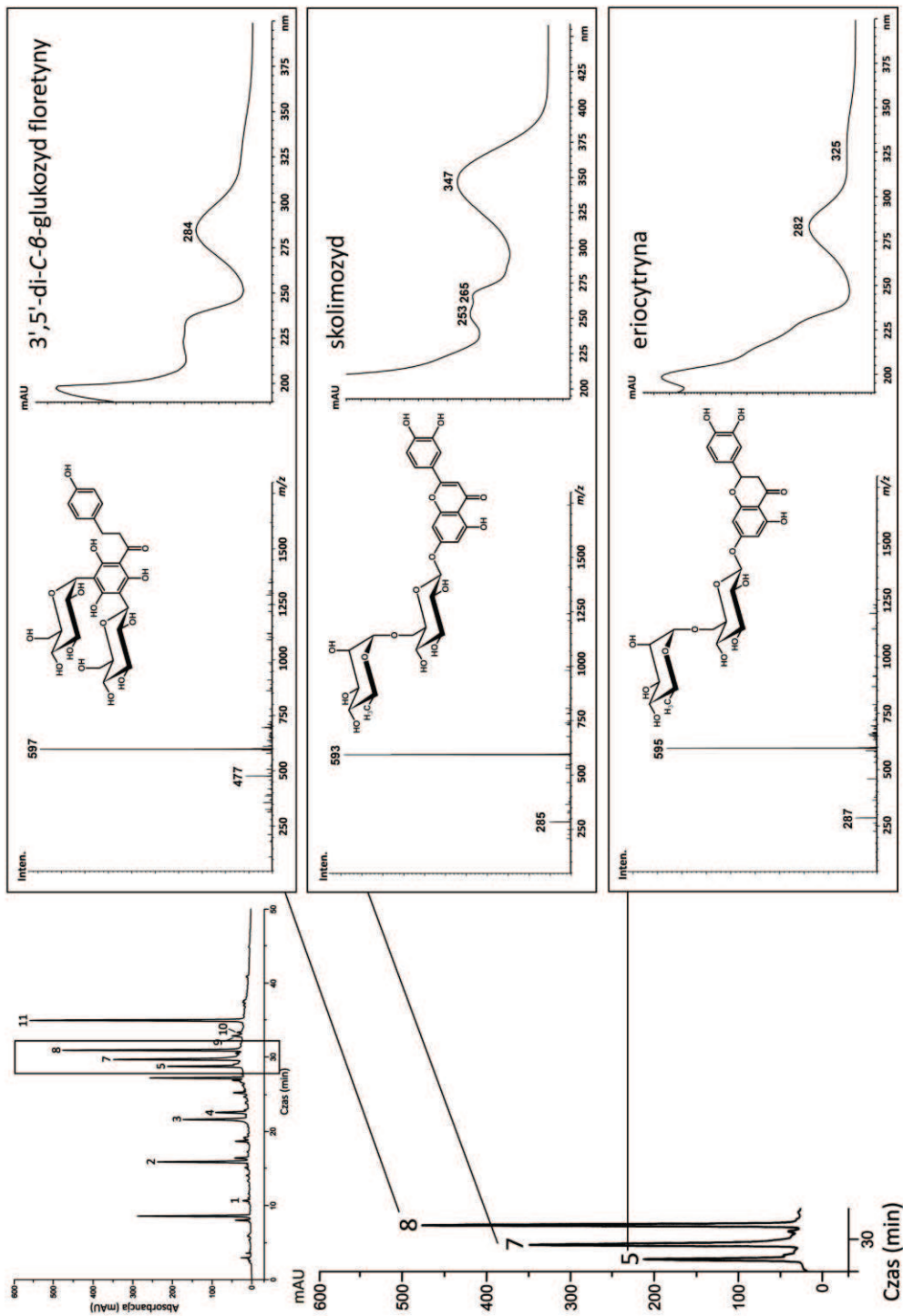
Widmo LC-ESI-MS związku **7**, uzyskane w toku opisywanego projektu (Ryc. 34), jak również dostępne dane literaturowe (De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010) wskazywały, że omawiane połączenie ma najprawdopodobniej charakter rutynozydu (obecność jonu fragmentacyjnego [M-308-H]⁻, charakterystycznego również dla widm ESI-MS związków **5**, **9** i **11** – Ryc. 34 i 35). Należy jednak zauważyć, że otrzymane dla związku **7** dane spektralne nie określały ostatecznie, czy ma on strukturę opisaną dla rutynozydu, neohesperydozydu (Mučaji i wsp., 2009) lub innych połączeń charakteryzujących się, obok identycznej masy cząsteczkowej, inną niż w luteolinie konfiguracją grup hydroksylowych. Z uwagi na powyższe, związek **7** poddano procedurze izolacji (rozd. II.2.3. i III.2.4.) a następnie identyfikacji przy użyciu technik NMR (rozd. II.2.4. i III.2.5.), co umożliwiło jednoznaczne określenie jego tożsamości jako skolimozydu.



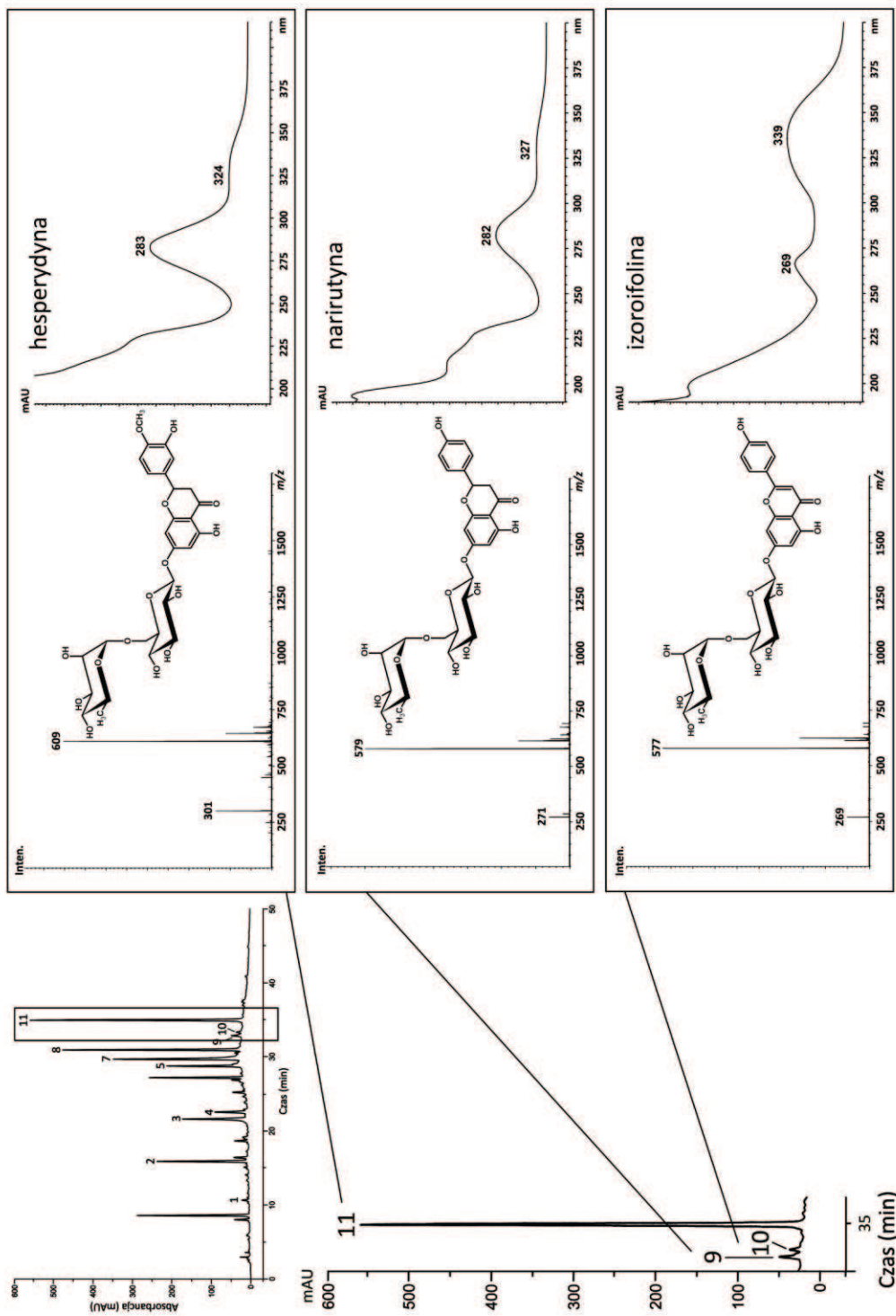
Ryc. 32. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji polifenolowej z niefermentowanego materiału gruntowego *Cyclopia subternata*. Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd maktury; **2**, 3-C- β -glukozyd iriflofenonu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytryna; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny; **9**, narirutyna; **10**, izoroifolina; **11**, hesperydyna. Widma LC-ESI-MS i LC-DAD 3-C- β -glukozydu maktury (**1**) i 3-C- β -glukozydu iriflofenonu (**2**).



Ryc. 33. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji polifenolowej z niefermentowanego materiału gruntowego *Cyclopia subternata*. Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd makturyny; **2**, 3-C- β -glukozyd iriflironu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytryna; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny; **9**, narirutyna; **10**, izoroifolina; **11**, hesperydyna. Widma LC-ESI-MS i LC-DAD mangiferyny (**3**) i izomangiferyny (**4**).



Ryc. 34. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280$ nm) frakcji polifenolowej z niefermentowanego materiału gruntowego *Cyclopia subternata*. Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd makiuryny; **2**, 3-C- β -glukozyd iriflironu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, erioctryna; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny; **9**, nairitryna; **10**, izoroifolina; **11**, hesperydyna. Widma LC-ESI-MS i LC-DAD 3',5'-di-C- β -glukozylu floretyny (**8**), skolimozylu (**7**) i erioctryny (**5**).



Ryc. 35. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280$ nm) frakcji polifenolowej z niefermentowanego materiału gruntowego *Cyclopia subternata*. Piki: **1**, 3-*C*- β -glukozyd makluryny; **2**, 3-*C*- β -glukozyd iriflenu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytyna; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny; **9**, narirutyna; **10**, izoroifolina; **11**, hesperidyna. Widma LC-ESI-MS i LC-DAD hesperidyny (**11**), narirutyny (**9**) i izoroifoliny (**10**).

Podobnie jak związek **7**, połączenie **10** ($R_t = 34,0$ min, UV λ_{\max} : 269, 339 nm, m/z : 577 [M-H]⁻, 269 [M-308-H]⁻) charakteryzowało się widmem UV typowym dla flawonów (Mabry i wsp., 1970; Ryc. 35). Zwrócono przy tym uwagę na obecność w widmie masowym omawianego wtórnego metabolitu jonów (pseudomolekularnego oraz fragmentacyjnego), lżejszych o 2 Da w stosunku do odpowiednich jonów występujących w przypadku widma ESI-MS połączenia **9**, tj. 7-O-rutynozydu naryngeniny (narirutyna – Ryc. 35). Można więc wnioskować, że związek **10** jest utlenioną formą powyższego flawanonu. Uzyskane dane oraz kochromatografia niniejszego połączenia z substancją referencyjną, a także analiza danych literaturowych (Pernice i wsp., 2009) pozwoliły na ostateczne określenie związku **10** jako 7-O-rutynozydu apigeniny (izoroifolina). Strukturę omawianego wtórnego metabolitu potwierdzono dodatkowo, po uprzedniej izolacji z surowca gruntowego *C. subternata*, za pomocą eksperymentów NMR (rozdz. II.2.4. i III.2.5.).

W czasie wcześniejszych analiz LC-DAD-MS wskazano na występowanie w ziele *C. subternata* niezidentyfikowanego połączenia o widmie UV charakterystycznym dla flawanonów i masie cząsteczkowej równej 598 Da (Mfenyana i wsp., 2008; De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010; Joubert i wsp., 2010). Analizując widma LC-ESI-MS uzyskane w ramach omawianego projektu stwierdzono, że opisywany w literaturze związek odpowiada połączeniu **8** ($R_t = 31,3$ min, UV λ_{\max} : 285 nm, m/z : 597 [M-H]⁻, 477 [M-120-H]⁻, Ryc. 34). Zwrócono ponadto uwagę na schemat fragmentacji, obserwowany w widmie masowym wspomnianego metabolitu, wykazujący cechy typowe dla C-glukozydów, tj. obecność jonu fragmentacyjnego [M-120-H]⁻, powstającego na skutek rozerwania wiązania C-C w części cukrowej (Rath i wsp., 1995; Ferrari i wsp., 2000; Roowi i Crozier, 2011). Z uwagi na niemożność określenia struktury związku **8** jedynie na podstawie przeprowadzonych analiz chromatograficznych, powyższe połączenie zostało wyizolowane w ramach prac preparatywnych (rozdz. II.2.3. i III.2.4.). Przeprowadzone w dalszej kolejności eksperymenty NMR pozwoliły na zidentyfikowanie związku **8** jako 3',5'-di-C- β -glukozydu floretyny (dihydrochalkon) (rozdz. II.2.4. i III.2.5.). Wcześniejsze, błędne określenie struktury powyższego metabolitu jako flawanonu (Mfenyana i wsp., 2008; De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010; Joubert i wsp., 2010) związane było najprawdopodobniej z dużym podobieństwem widm UV związków o charakterze dihydrochalkonów oraz właśnie flawanonów (Ogawa i wsp., 2001).

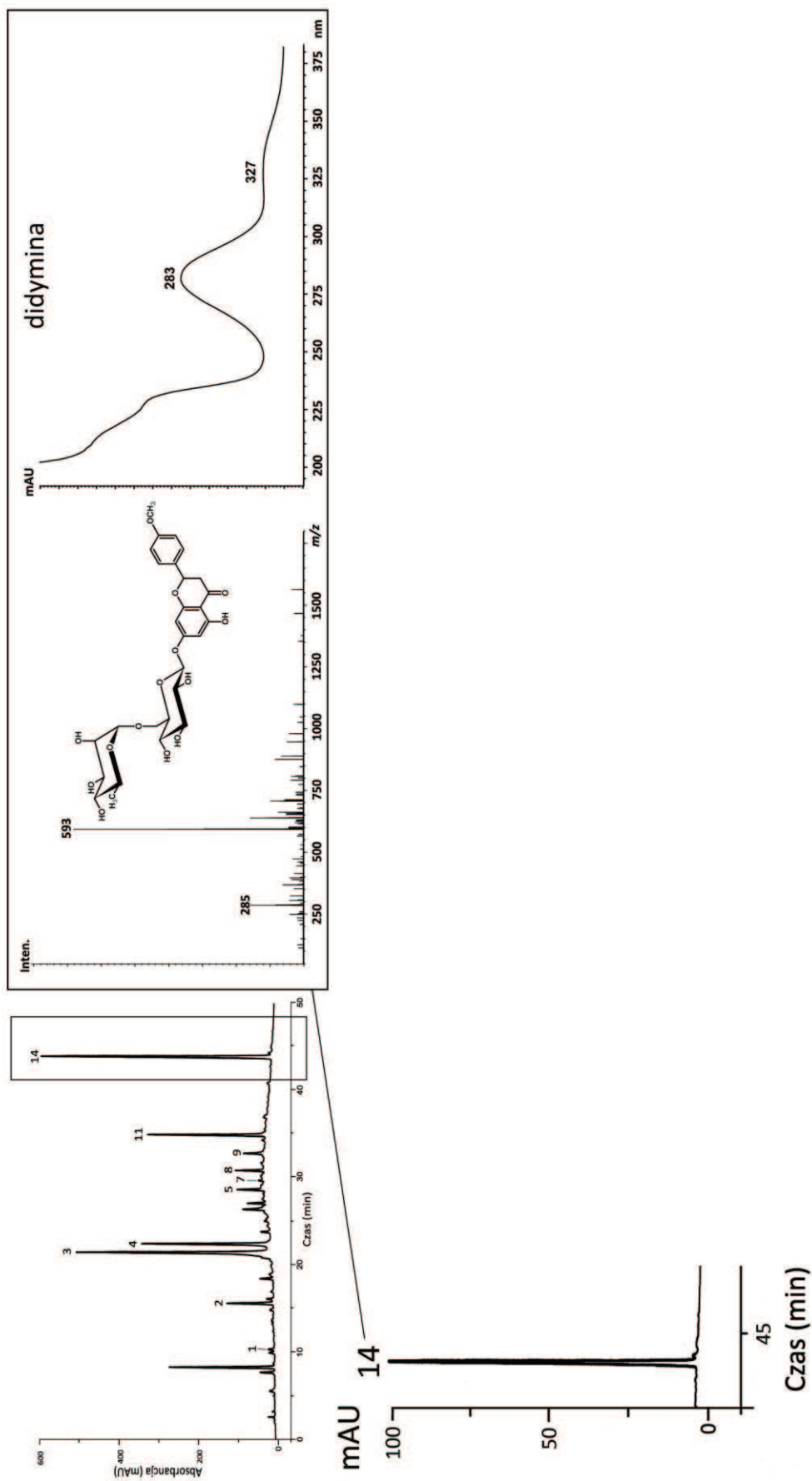
Poza opisanymi składnikami polifenolowymi, niefermentowany materiał gruntowy *C. subternata* zawierał niezidentyfikowane do tej pory połączenia **1** ($R_t = 10,3$ min, UV λ_{\max} : 231, 317 nm, m/z : 423 [M-H]⁻, 303 [M-120-H]⁻) i **2** ($R_t = 15,3$ min, UV λ_{\max} : 294 nm, m/z : 407 [M-H]⁻, 287 [M-120-H]⁻). Jakkolwiek obecność związku odpowiadającego składnikowi **2** pod względem danych spektralnych (widma LC-MS i LC-DAD) stwierdzono w czasie wcześniejszych analiz chromatograficznych ekstraktów z miodokrzewów (Joubert i wsp., 2008c, 2010; Mfenyana i wsp., 2008; De Beer i Joubert, 2010), to nie został on jak dotąd nawet zaklasyfikowany do określonej grupy połączeń naturalnych.

Widma LC-DAD metabolitów **1** i **2** uzyskanych w trakcie realizacji opisywanego projektu były do siebie zbliżone, co wskazywało na podobną budowę

chemiczną analizowanych związków (Ryc. 32). Sugerowały one jednocześnie, że wymienione połączenia nie należą do żadnej z opisanych do tej pory grup metabolitów wtórnych obecnych w miodokrzewach, tzn. ksantonów, flawanonów, flawonów i izoflawonów (Joubert i wsp., 2008a).

Podobnie jak w przypadku połączenia **8** (3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny), schemat fragmentacji obserwowany w widmach LC-MS związków **1** i **2** był typowy dla *C*-glukozydów (Rath i wsp., 1995; Ferrari i wsp., 2000). Dane spektralne wykazywały zarazem dobrą zgodność z pochodnymi benzofenonu, stanowiącymi metabolity pośrednie w szlaku biosyntezy ksantonów i obecnymi, obok mangiferyny i izomangiferyny, w takich gatunkach jak *Mangifera indica* (Tanaka i wsp., 1984; Barreto i wsp., 2008), *Iris florentina* (Arisawa i wsp., 1973) i *Anemarrhena asphodeloides* (Fujita i Inoue, 1981). W dalszej części zaplanowanych prac fitochemicznych, powyższe substancje zostały więc wyizolowane z niefermentowanego surowca gruntowego *C. subternata* (zw. **2**) oraz *C. genistoides* (zw. **1** i **2**) (rozdz. II.2.3. i III.2.4.), a następnie zidentyfikowane jednoznacznie jako 3-*C*- β -glukozydy makluryny (**1**) i iriflofenonu (**2**), w oparciu o dane uzyskane z jedno- i dwuwymiarowych eksperymentów NMR (rozdz. II.2.4. i III.2.5.). W rezultacie w niefermentowanym surowcu z części nadziemnych *C. subternata* zidentyfikowano bogaty, 10-składnikowy zespół polifenoli złożony z ksantonów (mangiferyna – **3** i izomangiferyna – **4**), flawanonów (ericytryna – **5**, narirutyna – **9** i hesperydyna – **11**), flawonów (skolimozyd – **7** i izoroifolina – **10**), benzofenonów (3-*C*- β -glukozydy makluryny – **1** i iriflofenonu – **2**) oraz dihydrochalkonu (3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny – **8**). Tak duża różnorodność występujących w powyższym materiale roślinnym polifenoli może tłumaczyć wiele aspektów związanych aktywnością biologiczną omawianego gatunku (Joubert i wsp., 2008a).

Skład chemiczny niefermentowanych części nadziemnych *C. intermedia*, w zakresie frakcji polifenolowej, jakkolwiek zbliżony do odpowiedniego surowca z *C. subternata* (obecność związków **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **7**, **8**, **9**, **11**, brak związku **10**), charakteryzował się występowaniem dodatkowego połączenia, niespotykanego w żadnym z trzech badanych gatunków miodokrzewów (zw. **14**). Niniejszy polifenol ($R_t = 43.5$ min, UV λ_{max} : 283 nm, m/z : 593 [M-H]⁻, 285 [M-308-H]⁻ – Ryc. 36) charakteryzowało widmo LC-DAD wskazujące na związek należący do grupy flawanonów (maksimum absorpcji zbliżone do 280 nm). Schemat fragmentacji LC-ESI-MS omawianego metabolitu był zarazem typowy dla rutynozydów (obecność jonu fragmentacyjnego [M-308-H]⁻, obserwowanego również w przypadku związków **5**, **7**, **9**, **10** i **11**, występujących w *C. subternata* i *C. intermedia* – Ryc. 34 i 35). Z uwagi na powyższe oraz ze względu na fakt, że rutynozę stanowi część cukrową szeregu związków polifenolowych spotykanych w miodokrzewach (Joubert i wsp., 2008a), tożsamość związku **14** postanowiono ustalić na podstawie kochromatografii z substancjami wzorcowymi o charakterze rutynozydów oraz masie cząsteczkowej odpowiadającej wspomnianemu metabolitowi (594 Da). W efekcie, wykazano bardzo dobrą zgodność połączenia **14**, w zakresie czasu retencji oraz widm LC-ESI-MS i LC-DAD, z 7-*O*-rutynozdem izosakuranetyny (didyminą) (Lin i Harnly, 2007).



Ryc. 36. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji polifenolowej z niefermentowanego materiału gruntowego *Cyclopia intermedia*. Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd makluryny; **2**, 3-C- β -glukozyd irifloneonu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytryna; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny; **9**, narirutyna; **11**, hesperydyna; **14**, didymina. Widma LC-ESI-MS i LC-DAD didyminy (**14**).

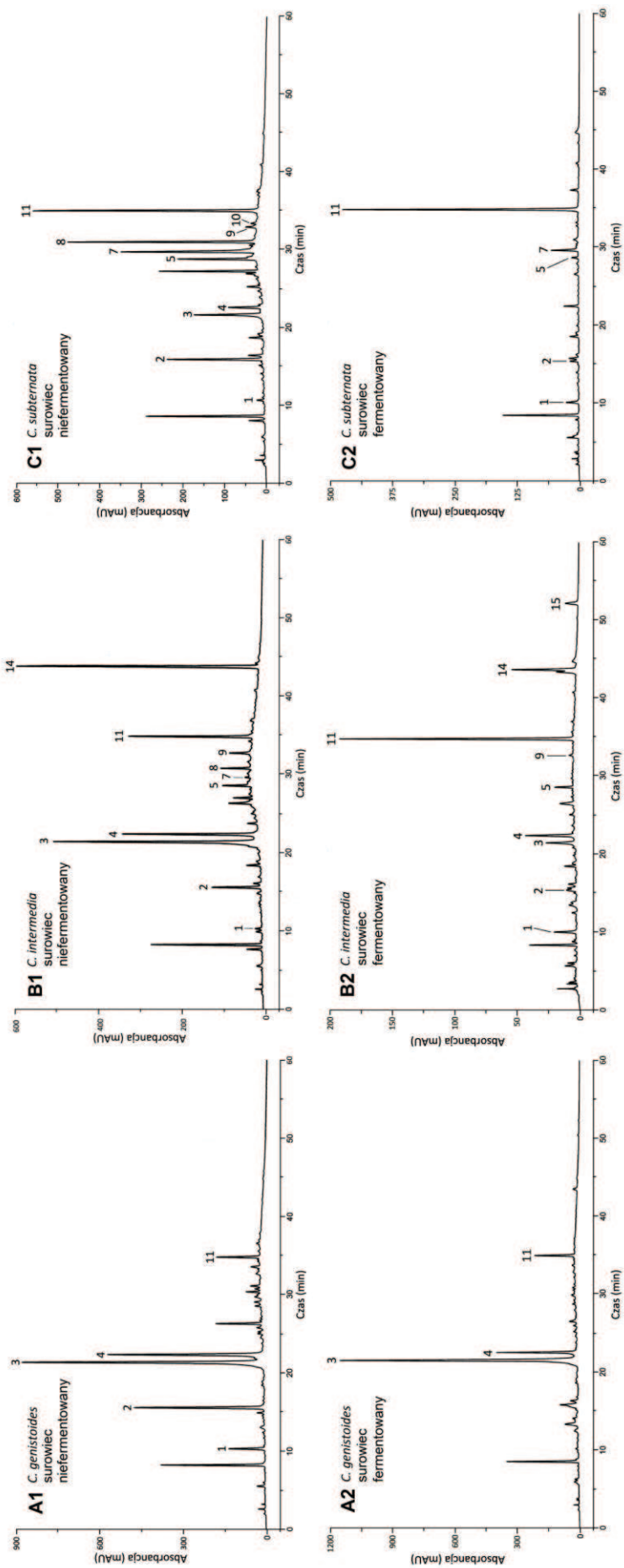
Obecność izosakuranetyny bądź jej pochodnych, aczkolwiek oczekiwana w rodzaju *Cyclopia* (De Nysschen i wsp., 1996), nigdy nie została przyporządkowana dla *C. intermedia* (Joubert i wsp., 2008c; De Beer i Joubert, 2010). Tym samym, wymieniony związek został chromatograficznie zidentyfikowany w niniejszej roślinie po raz pierwszy.

W porównaniu do omówionych wyżej gatunków, skład nie poddanych oksydacji części nadziemnych *C. genistoides* (Ryc. 37A1) był pod względem jakościowym wyraźnie uboższy (5 związków – 1, 2, 3, 4 i 11). W uzyskanych z nich frakcjach polifenolowych nie stwierdzono obecności eriocytryny (5), skolimozydu (7), 3',5'-di-C- β -glukozydu floretyny (8), narirutyny (9) oraz izoroifoliny (10).

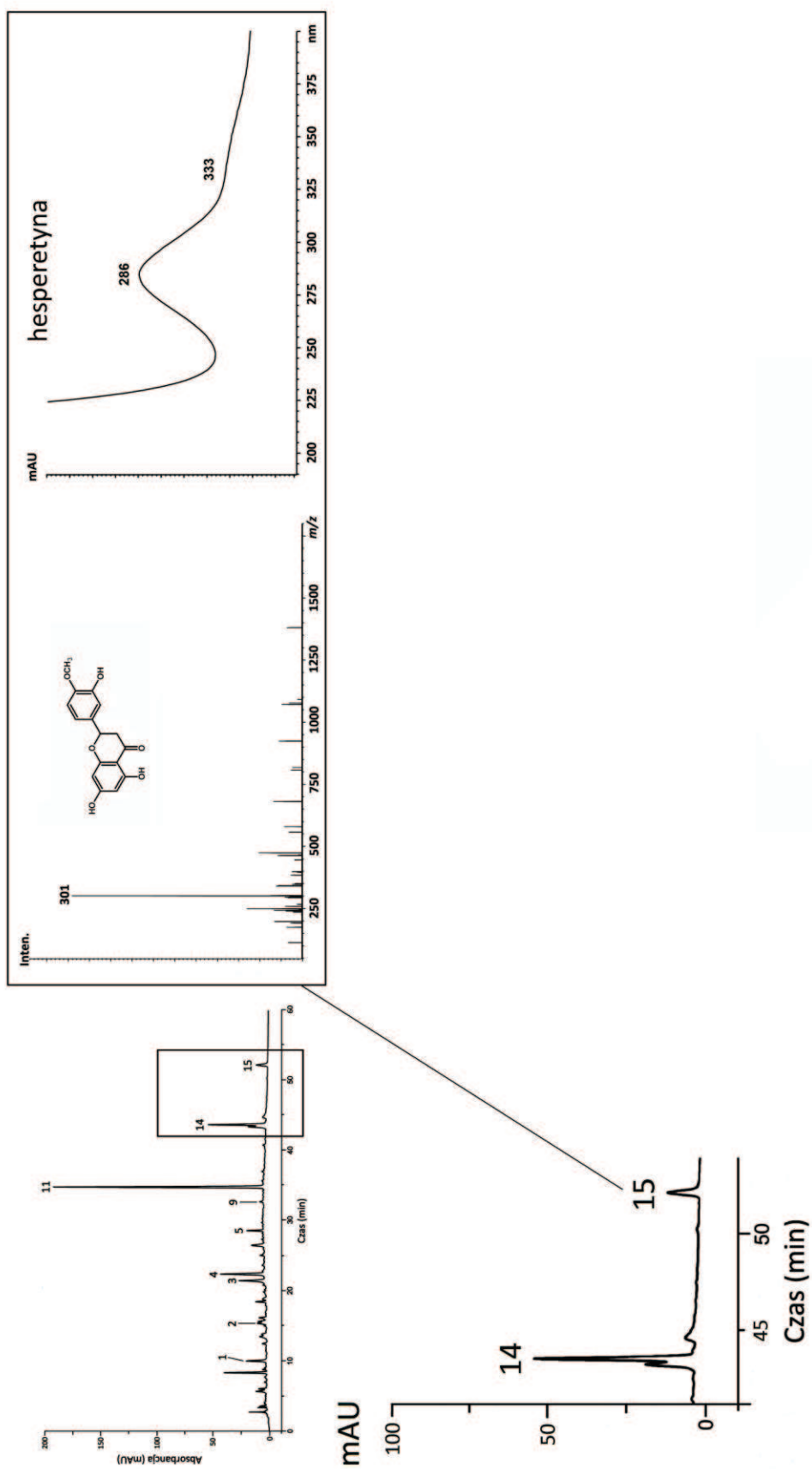
Skład badanych surowców, w zakresie frakcji polifenolowych, został znacznie zubożony w wyniku fermentacji stosowanej w przypadku przygotowywania komercyjnych produktów z miodokrzewów, przeznaczonych do sporządzania naparów do stosowania w codziennej diecie (Joubert i wsp., 2008a). Zjawisko to jest szczególnie widoczne w przypadku *C. subternata* oraz *C. intermedia*. Proces oksydacji skutkuje częściowym bądź całkowitym zanikiem we frakcji polifenolowej eriocytryny (5), skolimozydu (7), 3',5'-di-C- β -glukozydu floretyny (8), narirutyny (9) oraz izoroifoliny (10), a także ksantonów: mangiferyny (3) i izomangiferyny (4) (Ryc. 37B2, C2). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami (Joubert i wsp., 2008a, c), najmniej niekorzystne skutki fermentacji odnotowano w przypadku surowca *C. genistoides*, którego skład jakościowy po oksydacji pozostał w znacznym stopniu niezmienny – spośród rozpoznanych składników stwierdzono w nim jedynie brak 3-C- β -glukozydów iriflofenonu (2) i makluryny (1) (Ryc. 37A2). Należy jednak zaznaczyć, że brak różnic jakościowych pomiędzy surowcem niefermentowanym i fermentowanym powyższego gatunku może być częściowo związany z ogólnie uboższym składem *C. genistoides* w porównaniu do pozostałych miodokrzewów (Ryc. 37).

Uzyskane wyniki stanowią jednocześnie potwierdzenie danych literaturowych, wskazujących na negatywny wpływ fermentacji na zawartość polifenoli i potencjał antyoksydacyjny herbaty honeybush (Joubert i wsp., 2008a, c).

Analiza frakcji polifenolowej w fermentowanym ziele *C. intermedia* (Ryc. 37B2) wskazała na obecność nowego, nie występującego w surowcu nie poddanym oksydacji połączenia o maksimum absorpcji typowym dla flawanonów oraz widmie LC-ESI-MS wskazującym na połączenie o charakterze aglikonu (związek 15, Rt = 52,0 min, UV λ_{\max} : 286 nm, m/z : 301 [M-H]⁻ – Ryc. 38). Masa cząsteczkowa powyższego składnika (302 Da) odpowiadała jednocześnie aglikonowej części hesperydyny (Ryc. 35), tj. hesperetynie. Kochromatografia z substancją wzorcową oraz porównanie uzyskanych widm LC-DAD i LC-ESI-MS umożliwiło jednoznaczną identyfikację wspomnianego połączenia. Jak już wspomniano, podobnie jak w przypadku badań cytowanych w doniesieniach literaturowych (Joubert i wsp., 2008c), obecność hesperetyny stwierdzono tylko w fermentowanym materiale *C. intermedia*. Ze względu na fakt, że hesperydyna należy do związków o znacznej odporności na hydrolizę chemiczną (Grohmann i wsp., 2000), można przypuszczać, że hesperetyna powstaje z niej na drodze rozpadu enzymatycznego w procesie fermentacji części nadziemnych *C. intermedia*.



Ryc. 37. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji polifenolowej z niefermentowanego i fermentowanego materiału gruntowego *Cyclopaia genistoides* (A1 i A2), *Cyclopaia intermedia* (B1 i B2) oraz *Cyclopaia subternata* (C1 i C2). Piki: 1, 3-C- β -glukozyd iriflofenonu; 2, 3-C- β -glukozyd makluryny; 3, 3-C- β -glukozyd iriflofenonu; 4, izomangiferyna; 5, eriocytyryna; 7, skolimozyd; 8, 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny; 9, narirutyna; 10, izoroifolina; 11, hesperetydyna; 14, didymina; 15, hesperetyna.



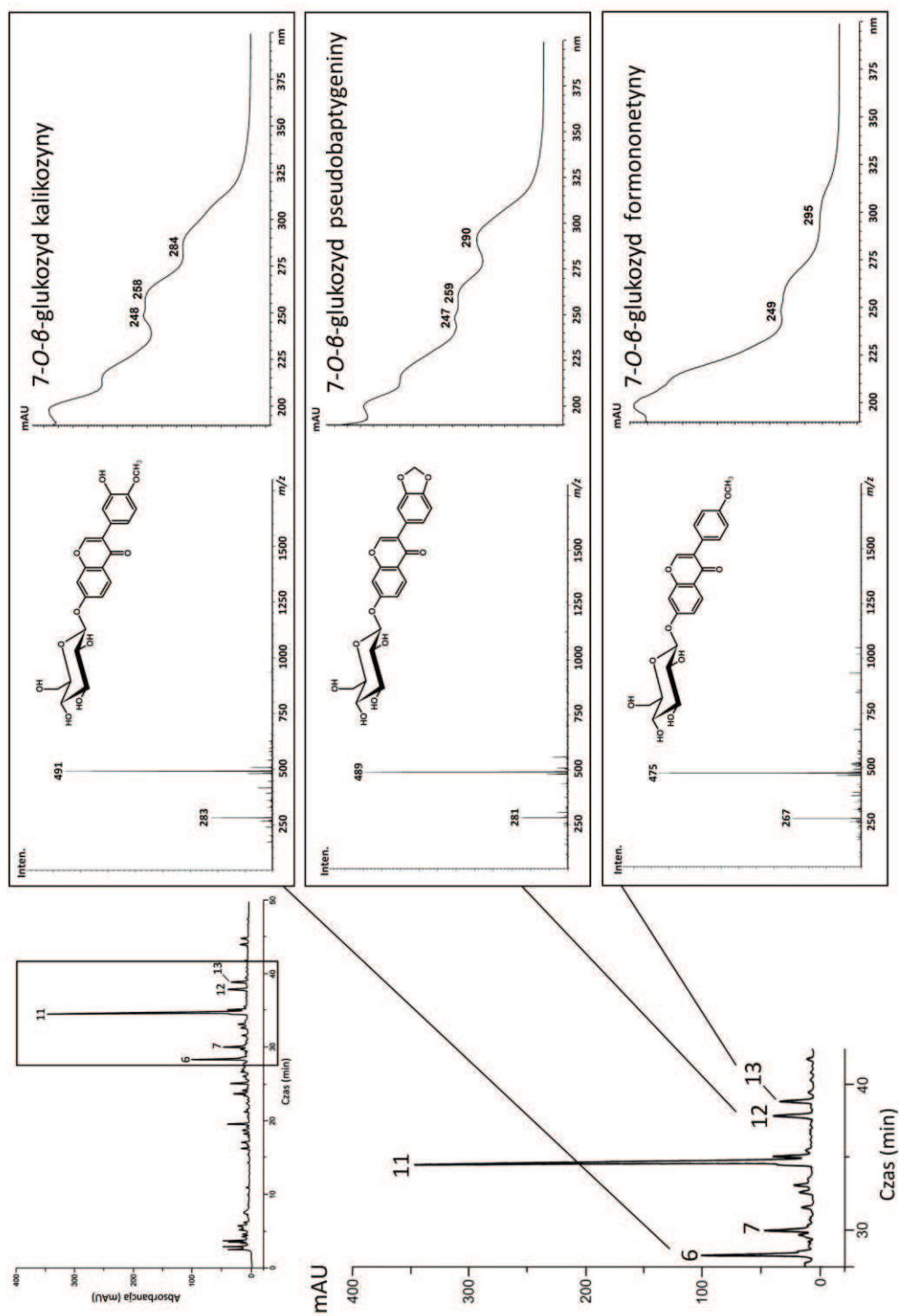
Ryc. 38. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280 \text{ nm}$) frakcji polifenolowej z fermentowanego materiału grunтового *Cyclopia intermedia*. Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd makturyny; **2**, 3-C- β -glukozyd iriflofonu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytryna; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny; **9**, nairutyryna; **11**, hesperetyna; **14**, didymina; **15**, hesperetyna. Widma LC-ESI-MS i LC-DAD hesperetyny (**15**).

Brak obecności hesperetyny w surowcu niefermentowanym sugeruje jednocześnie, że wspomniany związek syntezowany *de novo* nie podlega akumulacji, lecz jest glikozydowany do odpowiedniego rutynozydu – hesperydyny, magazynowanej we właściwych organellach komórkowych. Jednocześnie należy zaznaczyć, że hesperetyna jest jedynym metabolitem wtórnym o charakterze aglikonu, zidentyfikowanym w miodokrzewach w toku prac analitycznych prowadzonych za pomocą techniki LC-ESI-MS. Metodami chromatograficznymi nie stwierdzono natomiast obecności luteoliny (**14a**), stanowiącej część aglikonową skolimozynu (**7**), w żadnym z badanych surowców. Było to najprawdopodobniej spowodowane zbyt niską zawartością wspomnianego połączenia, zidentyfikowano je bowiem jedynie we wzbogaconych wyciągach *C. genistoides* przeznaczonych do celów preparatywnych (rozdz. II.2.3. i III.2.4.). Niewielkie ilości luteoliny wykryto również w powyższym gatunku w czasie wcześniejszych analiz LC-MS miodokrzewów (Joubert i wsp., 2008c, Mfenyana i wsp., 2008).

Jak już wspomniano w rozdz. II.1.1.4., skład frakcji polifenolowych obecnych w biomasach *in vitro* *Cyclopia* sp. wyraźnie różnił się od odpowiednich roślin macierzystych. Jak pokazano na przykładzie kalusa *C. subternata* (Ryc. 39), kultury tkankowe miodokrzewów charakteryzowały się obecnością połączeń **6** (Rt = 29,0 min, UV λ_{\max} : 248, 258, 284sh nm, *m/z*: 491 [M+HCOO]⁻, 283 [M-glukoza-H]⁺), **12** (Rt = 38,2 min, UV λ_{\max} : 247, 259, 290 nm, *m/z*: 489 [M+HCOO]⁻, 281 [M-glukoza-H]⁺) i **13** (Rt = 39,2 min, UV λ_{\max} : 249, 295sh nm, *m/z*: 475 [M+HCOO]⁻, 267 [M-glukoza-H]⁺), których nie stwierdzono uprzednio w ziele roślin gruntowych. Uzyskane dla powyższych metabolitów widma LC-DAD (Ryc. 39) były typowe dla połączeń o budowie izoflawonoidowej (Mabry i wsp., 1970). Schemat fragmentacji ESI-MS wymienionych związków obejmował powstawanie adduktów mrówczanowych (jony [M+HCOO]⁻), odpowiadając zarazem połączeniom o charakterze glikozydów (jony fragmentacyjne [M-163-H]⁺). Obserwowane jony fragmentacyjne były identyczne w przypadku wszystkich trzech związków, co wskazywało na obecność tej samej części glikonowej. Informacja ta była zgodna z danymi dotyczącymi szlaków biosyntezy izoflawonoidów, zgodnie z którymi zdecydowaną większość glikozydowanych połączeń z powyższej grupy stanowią 7-*O*- β -glukozydy (Dixon, 1999).

Poprzez analizę porównawczą stwierdzono bardzo dobrą zgodność widm LC-DAD i LC-ESI-MS związków **6**, **12** i **13** odpowiednio z 7-*O*- β -glukozydami kalikozyny, pseudobaptygeniny oraz formononetyny (Gu i Gu, 2001; Xu i wsp., 2006; Polasek i wsp., 2007; Qi i wsp., 2009). Tożsamość połączeń **6** i **13** potwierdzono dodatkowo na drodze kochromatografii z substancjami wzorcowymi.

W celu ostatecznego ustalenia struktury, związki **6**, **12** i **13** wyizolowano z kalusa *C. subternata*, w ramach zaplanowanych prac preparatywnych, a następnie zidentyfikowano za pomocą jedno- i dwuwymiarowych eksperymentów NMR (rozdz. II.2.4. i III.2.5.). Różnice jakościowe i ilościowe pomiędzy biomasami *in vitro* poszczególnych gatunków miodokrzewów, w zakresie powyższych połączeń, omówiono szczegółowo w biotechnologicznej części projektu (rozdz. II.1.1.4.).



Ryc. 39. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280$ nm) frakcji polifenolowej z kalusa *Cycloptia subternata*. Piki: **6**, 7-O-β-glukozyd kalikozyzny; **7**, 7-O-β-glukozyd pseudobaptygeniny; **11**, hesperydyna; **12**, 7-O-β-glukozyd pseudobaptygeniny; **13**, 7-O-β-glukozyd formononetyny. Widma LC-ESI-MS i LC-DAD 7-O-β-glukozydu kalikozyzny (**6**), 7-O-β-glukozydu pseudobaptygeniny (**12**) i 7-O-β-glukozydu formononetyny (**13**).

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań rozdzielono bogaty zespół połączeń polifenolowych (ksantony, flawanony, flawony, izoflawony, chalkony oraz benzofenony), występujący w roślinach z rodzaju *Cyclopia*. Zoptymalizowane warunki chromatografowania okazały się odpowiednie zarówno do analiz roślin macierzystych (surowiec fermentowany i niefermentowany – „zielony”), jak i biomas *in vitro*. Pozwoliły one, wraz z badaniami identyfikacyjnymi (kochromatografia z wzorcami, analiza widm LC-DAD, LC-ESI-MS oraz NMR), na pełniejsze poznanie składu chemicznego miodokrzewów (identyfikacja nowych połączeń z grupy flawonów, chalkonów oraz przede wszystkim benzofenonów), co może znaleźć przełożenie w późniejszych eksperymentach biomedycznych. Ponadto, prowadzenie skryningowych analiz porównawczych biomas roślinnych na wszystkich etapach badań biotechnologicznych (rozdz. II.1.) umożliwiło systematyczną selekcję tkanek o charakterze „superproducentów” oraz wybór optymalnych procedur doświadczalnych niezbędnych do zaproponowania roślinnych systemów *in vitro* z przeznaczeniem do biosyntezy wybranych polifenoli.

II.2.2.3. Analizy ilościowe

Zoptymalizowane warunki chromatografowania (kolumna LC-18; faza ruchoma złożona z: A – H₂O:HCOOH 100:0,1 v/v, B – H₂O:AcCN:HCOOH 50:50:0,1 v/v/v; elucja gradientowa wg programu: 0-15 min, 12-25 % B, 15-75 min, 25-100 % B, 75-77 min, 100 % B, 77-80 min, 100-12 % B, 82 min, stop – rozdz. III.2.3.3.1.) stosowane do rozpoznania składu jakościowego badanych biomas roślinnych postanowiono wykorzystać, na wszystkich etapach prac biotechnologicznych, do prowadzenia analiz skryningowych namnażanych tkanek oraz referencyjnych roślin gruntowych, w zakresie polifenoli. Zaplanowane badania poprzedziło przeprowadzenie walidacji wybranej metody analitycznej. Obejmowała ona wyznaczenie dokładności, precyzji wewnątrz- i międzygrupowej, zakresu liniowości dla poszczególnych grup metabolitów wtórnych (tj. pochodnych benzofenonu, ksantonów, flawanonów, flawonów, izoflawonów i dihydrochalkonów), a także limitów detekcji i oznaczalności. Przeprowadzając walidację metody kierowano się ogólnymi wskazaniem dotyczącymi analiz w surowcach pochodzenia roślinnego połączeń o charakterze fenolowym (Thompson i wsp., 2002; Fecka i Turek, 2008; Gao i wsp., 2008). Pod uwagę brano również rezultaty wcześniejszych badań fitochemicznych nad miodokrzewami (De Beer i Joubert, 2010), a także pokrewnymi roślinami z rodzaju *Genista* (Łuczkiwicz i wsp., 2004; Łuczkiwicz, 2006). Szczegółowy opis przeprowadzenia walidacji zawarto w części doświadczalnej pracy (rozdz. III.2.3.3.4.), zaś uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 16. Jak już wcześniej wspomniano (rozdz. II.2.2.2.), oznaczenia ilościowe HPLC prowadzono z wykorzystaniem detekcji UV przy długości fali 280 nm. Zawartość poszczególnych składników zespołu polifenolowego w matrycach roślinnych wyznaczano na podstawie krzywych wzorcowych związków reprezentujących różne grupy chemiczne: mangiferyny (**3**) (ksantony), 3-C-β-glukozydu iriflofenonu (**2**) (pochodne benzofenonu), skolimozylu (**7**) (flawony), hesperydyny (**11**) (flawanony), florydzyliny (dihydrochalkon) oraz 7-O-β-glukozydu kalikozyny (**6**) (izoflawony).

Tab. 16. Parametry walidacyjne dla metody HPLC, wykorzystywanej do prowadzenia oznaczeń ilościowych związków polifenolowych w roślinach gruntowych i biomasach *in vitro* *Cyclopia* sp.

Związek	Równanie regresji ^a	Współczynnik determinacji R ²	Zakres liniowości (µg ml ⁻¹)	Limit detekcji [LOD] (ng/nastrzyk)	Limit oznaczalności [LOQ] (ng/nastrzyk)	Precyzja wewnątrzgrupowa (% RSD) ^b	Precyzja międzygrupowa (% RSD) ^b	Dokładność (% odzysku) ^c
3-C-β-glukozyd iriflifenonu (2)	y = 7298,8x + 644,32	1,000	0,5-525,0	0,15	0,45	0,15	0,11	101,70
Mangiferyna (3)	y = 7018,1x - 28316,0	0,9999	1,0-2000,0	0,75	2,25	0,54	0,40	92,65
Skolimozyd (7)	y = 2551x - 65,175	0,9999	2,0-225,0	1,35	4,00	1,12	0,27	nu
Hesperydyna (11)	y = 8343,2x + 9111,5	1,000	0,1-2000,0	0,04	0,11	0,15	0,09	107,07
7-O-β-glukozyd kalikozyny (6)	y = 10556x + 143,25	1,000	0,5-525,0	0,15	0,45	0,13	0,18	106,34
Florydzyna	y = 11454x + 16275,0	1,000	0,1-2000,0	0,08	0,23	0,12	0,15	103,75

^a y, pole powierzchni piktu; x, stężenie (µg ml⁻¹).

^b n = 6

^c n = 5; nu, związku nie uwzględniono przy wyznaczaniu odzysku metody ze względu na ograniczoną dostępność wzorca.

Oznaczenia ilościowe 3',5'-di-*C*- β -glukozydu floretyny – chalkon (**8**), ze względu ograniczoną dostępność wzorca (rozd. III.2.4.), prowadzono z wykorzystaniem krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla łatwiej dostępnego 2'-*O*-glukozydu floretyny (tj. florydżyny), związku o podobnych własnościach fizykochemicznych. Niniejszą substancję, nie występującą w rodzaju *Cyclopia*, stosowano również jako wzorzec wewnętrzny na wszystkich etapach analiz skryningowych.

Dokładność metody wyznaczono poprzez określenie odzysku, suplementując przed ekstrakcją próbkę surowca, o znanej zawartości metabolitów wtórnych, mieszaniną substancji wzorcowych. Ze względu na ograniczoną dostępność skolimozynu (**7**) oraz 3',5'-di-*C*- β -glukozydu floretyny (**8**), pierwszego z wymienionych związków nie uwzględniono przy określaniu odzysku metody, drugi zaś zastąpiono, podobnie jak w przypadku wyznaczania krzywej kalibracyjnej, florydżyną.

Uzyskane parametry walidacyjne (Tab. 16) wskazują, że zoptymalizowana metoda rozdzielania jest odpowiednia do prowadzenia ilościowych analiz skryningowych polifenoli w ekstraktach uzyskanych z biomas *in vitro* i roślin gruntowych *Cyclopia* sp. Charakteryzuje się ona bardzo dobrą dokładnością, a także wysoką precyzją, co umożliwia jej zastosowanie do oceny skuteczności strategii hodowlanych ukierunkowanych na zwiększenie poziomu biosyntezy związków polifenolowych w kulturach tkankowych miodokrzewów (rozd. II.1.). Wspomniane parametry (tzn. dokładność oraz precyzja wewnątrz- i międzygrupowa) były zadowalające w przypadku połączeń reprezentujących różne grupy metabolitów wtórnych, tj. ksantonów, flawanonów, izoflawonów, dihydrochalkonów oraz pochodnych benzofenonu. Uwagę zwraca również szeroki zakres prostoliniowości oznaczeń, pozwalający na prowadzenie analiz ilościowych polifenoli w wyciągach z biomas znacznie różniących się poziomem akumulacji powyższych połączeń, przy zachowaniu tej samej procedury przygotowywania ekstraktu (w rozumieniu wzajemnych proporcji naważki i użytego rozpuszczalnika). Wysoki poziom precyzji międzygrupowej (międzydniowej) wskazuje na możliwość zastosowania opisanej metody do badań skryningowych zawartości metabolitów wtórnych w biomasach *in vitro*, pozyskiwanych w toku eksperymentów biotechnologicznych o dużej rozpiętości czasowej.

Zwalidowana metoda analityczna została wykorzystana do określenia składu ilościowego niefermentowanych (tzw. „zielona” herbata honeybush) i fermentowanych części nadziemnych badanych gatunków miodokrzewów oraz odpowiednich biomas *in vitro*, pod względem połączeń polifenolowych. Porównanie, między analizowanymi matrycami roślinnymi nie poddany fermentacji oraz kulturami *in vitro* omówiono szczegółowo w części biotechnologicznej (rozd. II.1.1.4.), skupiając się na przydatności poszczególnych gatunków do prowadzenia kultur tkankowych. Aby uniknąć dublowania informacji, w niniejszym rozdziale skoncentrowano się jedynie na aspektach związanych z różnicami w zawartości polifenoli pomiędzy materiałem roślinnym niefermentowanym oraz poddanym oksydacji, co znajduje odzwierciedlenie w różnej aktywności biologicznej badanych surowców. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 17.

Tab. 17. Zawartość związków polifenolowych w niefermentowanych i poddanych fermentacji częściach nadziemnych roślin gruntowych *Cyclopia* sp.*

Związek	<i>C. subternata</i>		<i>C. genistoides</i>		<i>C. intermedia</i>	
	surowiec niefermentowany	surowiec fermentowany	surowiec niefermentowany	surowiec fermentowany	surowiec niefermentowany	surowiec fermentowany
<i>Benzojenony</i>						
3-C- β -glukozyd maklury (1)	32,60 \pm 10,32	184,10 \pm 20,74	285,00 \pm 11,20	nd	30,05 \pm 10,00	76,05 \pm 8,20
3-C- β -glukozyd iriflofonu (2)	448,20 \pm 32,10	135,60 \pm 20,50	832,50 \pm 5,20	nd	272,50 \pm 60,20	21,70 \pm 3,50
<i>Ksantony</i>						
Mangiferyna (3)	1312,50 \pm 50,20	nd	5254,00 \pm 100,34	7005,40 \pm 160,30	2320,30 \pm 0,19	329,00 \pm 15,60
Izomangiferyna (4)	485,60 \pm 30,11	nd	1922,34 \pm 60,40	1441,70 \pm 50,34	857,60 \pm 50,30	515,40 \pm 16,60
<i>Flawanony</i>						
Eriocytryna (5)	471,40 \pm 30,10	82,70 \pm 30,20	nd	nd	206,50 \pm 20,80	98,60 \pm 8,50
Narirutyna (9)	12,75 \pm 5,00	nd	nd	nd	78,70 \pm 7,80	36,50 \pm 4,40
Hesperydyna (11)	1949,56 \pm 180,05	1771,40 \pm 190,25	659,76 \pm 20,05	1050,60 \pm 50,25	1638,60 \pm 150,20	1118,30 \pm 15,80
Didymina (14)	nd	nd	nd	nd	801,40 \pm 60,50	377,45 \pm 14,30
Hesperetyna (15)	nd	nd	nd	nd	nd	101,70 \pm 10,35
<i>Flawony</i>						
Skolimozyd (7)	516,04 \pm 50,50	88,05 \pm 4,05	nd	nd	18,75 \pm 7,50	nd
Izoroifolina (10)	19,00 \pm 6,00	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Dihydrochalkony</i>						
3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny (8)	510,60 \pm 60,75	nd	nd	nd	83,47 \pm 20,89	nd
<i>Suma polifenoli</i>	5758,35	2261,85	8953,60	9497,70	6,307,87	2674,70

* Zawartość związków wyrażona jako mg/100 g suchej masy; **nd**, nie stwierdzono obecności związku. Wartości stanowią średnie arytmetyczne z 5 prób \pm SD. Pogrubionym tekstem zaznaczono najwyższe stężenia metabolitów w badanych biomasach.

Przeprowadzone analizy ilościowe potwierdziły, podobnie jak wykonane uprzednio badania jakościowe (rozdz. II.2.2.2.), wyraźnie zaznaczony wpływ procesu fermentacji na zawartość związków polifenolowych w roślinach z rodzaju *Cyclopia*. Obserwowane w tym wypadku zmiany w profilu metabolicznym badanych gatunków zależały w znacznej mierze od analizowanej rośliny oraz charakteru chemicznego oznaczanego połączenia.

Jak już wcześniej wspomniano, fermentacja surowca powoduje istotne zmiany jakościowe w obrębie badanego zespołu metabolitów wtórnych, przejawiające się, w większości przypadków, całkowitym zanikiem przeważającej liczby analizowanych polifenoli. Wyjątek stanowiła hesperetyna, obecna jedynie w fermentowanym materiale *C. intermedia* – Tab. 17, Ryc. 38). Analizy ilościowe wykazały ponadto, że zawartości polifenoli, pozostałych w surowcu poddanym oksydacji, były przeważnie niższe od stężeń związków oznaczonych w materiale „zielonym” (Tab. 17). Uzyskane wyniki są w tym względzie zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na negatywny wpływ fermentacji na zawartość pochodnych fenylopropanu w herbacie honeybush (Joubert i wsp., 2008a, c). Wyjątek od wspomnianej reguły stanowi gatunek *C. genistoides*, w przypadku którego stężenia mangiferyny (**3**) i hesperydiny (**11**) w materiale fermentowanym (odpowiednio ok. 7000 i 1000 mg/100 g DW), były wyższe od surowca niefermentowanego (odpowiednio ok. 5300 i 700 mg/100 g DW – Tab. 17). Co ciekawe, jedynie w tym wypadku, w fermentowanym ziele nie stwierdzono w ogóle obecności pochodnych benzofenonu, tj. 3-*C*- β -glukozydów makluryny (**1**) i iriflofenonu (**2**), co jednak nie wpłynęło znacząco na sumaryczną zawartość oznaczanych związków polifenolowych. W rezultacie, paradoksalnie, fermentowane części nadziemne *C. genistoides* były najbogatszym (w sensie ilościowym – ok. 9500 mg/100 g DW, Tab. 17) źródłem związków polifenolowych spośród wszystkich analizowanych surowców. O ile różnice w stężeniach badanych związków pomiędzy niefermentowanym i fermentowanym materiałem roślinnym mogą być wypadkową szeregu czynników, takich jak czas i miejsce zbioru surowca, o tyle specyficzna odporność na spadek zawartości ksantonów (tzn. mangiferyny i izomangiferyny), wywołany fermentacją, wydaje się być jednak cechą gatunkową *C. genistoides*. W przypadku pozostałych badanych roślin, w materiale fermentowanym odnotowano bowiem wyraźnie niższe stężenia (odpowiednio 86 i 40 % spadek zawartości mangiferyny i izomangiferyny w *C. intermedia*), bądź całkowity zanik (*C. subternata*) wspomnianych metabolitów (Tab. 17, Ryc. 37). Powyższe obserwacje są zgodne z wynikami wcześniejszych badań, wskazujących na słabszy, w porównaniu z innymi miodokrzewami, wpływ fermentacji na potencjał antyoksydacyjny surowca *C. genistoides* (Joubert i wsp., 2008c).

W przeciwieństwie do ksantonów, proces fermentacji w mniejszym stopniu obniża, w badanych matrycach, zawartość hesperydiny stanowiącej, obok mangiferyny i izomangiferyny, podstawowy składnik polifenolowy roślin z rodzaju *Cyclopia*. Jak już wspomniano, spadku stężenia powyższego związku na skutek oksydacji nie odnotowano w przypadku *C. genistoides*. Fermentowane części nadziemne pozostałych roślin charakteryzowały się umiarkowanym, w porównaniu do surowca „zielonego”, obniżeniem zawartości hesperydiny (ok. 9 i 30 % spadek stężenia metabolitu

odpowiednio dla *C. subternata* i *C. intermedia* – Tab. 17). Na podstawie uzyskanych wyników można więc przypuszczać, że obecność znacznych ilości hesperydyny w materiale *Cyclopia* sp. poddanym fermentacji jest związana m.in. z ogólnie dużą odpornością wspomnianego metabolitu na hydrolizę (Grohmann i wsp., 2000). W przypadku fermentowanego ziela *C. intermedia*, stwierdzono bowiem dodatkowo niewielką ilość (ok. 100 mg/100 g DW) hesperetyny, powstałej najprawdopodobniej na skutek rozpadu hydrolitycznego hesperydyny.

Rezultaty przeprowadzonych analiz ilościowych wykazują, że oksydacja części nadziemnych miodokrzewów wywołuje wyraźnie zaznaczone zmiany ilościowe w zakresie połączeń polifenolowych z grupy flawonów, dihydrochalkonów, benzofenonów oraz wszystkich z wyjątkiem hesperydyny flawanonów. Efekt ten był szczególnie widoczny w przypadku ziela *C. subternata*, które jako jedyne zawierało, w formie niefermentowanej, znaczne ilości eriocytryny (**5**), skolimozydu (**7**) oraz 3',5'-di-*C-β*-glukozydu floretyny (**8**) (ok. 500 mg/100 g DW każdego z wymienionych związków), a także niewielką ilość narirutyny (**9**) (ok. 10 mg/100 g DW) i izoroifoliny (**10**) (ok. 20 mg/100 g DW). W wyniku fermentacji, związki **8**, **9** i **10** zanikły całkowicie, zaś stężenia połączeń **5** i **7** spadły ponad 5-krotnie (Tab. 17). Podobne obserwacje poczyniono w trakcie analiz ilościowych ekstraktów z *C. intermedia*, charakteryzujących się obecnością największych ilości narirutyny (**9**) oraz didyminy (**14**). Stwierdzono, że zawartości powyższych metabolitów w surowcu niefermentowanym (odpowiednio ok 80 i 800 mg/100 g DW) były ponad 2-krotnie wyższe w porównaniu z materiałem fermentowanym (odpowiednio ok. 40 i 370 mg/100g DW).

Spośród połączeń o charakterze benzofenonów, dominującym składnikiem surowców niefermentowanych był 3-*C-β*-glukozyd iriflofenonu, występujący w ilości ok. 270 (*C. intermedia*), 450 (*C. subternata*) i 830 mg/100 g DW (*C. genistoides*). Podobnie jak w przypadku pozostałych grup związków, surowce fermentowane charakteryzowały się niższą zawartością powyższego metabolitu lub jego całkowitym brakiem (*C. genistoides*) (Tab. 17).

Podsumowując, zoptymalizowana metoda chromatograficzna (HPLC) pozwoliła na przeprowadzenie bardzo precyzyjnych jakościowych oraz ilościowych analiz porównawczych niefermentowanych oraz poddanych fermentacji części nadziemnych miodokrzewów, w zakresie połączeń polifenolowych. Potwierdziła ona lub wykazała wpływ oksydacji, na zawartość poszczególnych metabolitów w surowcach, z uwzględnieniem struktury związku oraz badanego gatunku. Uzyskane rezultaty wyraźnie wskazują, że ze względu na bogatszy pod względem jakościowym skład frakcji polifenolowej, właśnie surowce „zielone“ powinny być polecane do codziennego stosowania w ramach zrównoważonej diety. Ponadto, zoptymalizowany sposób chromatografowania można zaproponować do wykorzystania w seryjnej ocenie jakości produktów komercyjnych, sporządzonych na bazie miodokrzewów oraz komplementarnych, szeroko rozumianych badaniach biomedycznych.

II.2.3. Izolacja związków polifenolowych z biomas *in vitro* i roślin gruntowych *Cyclopia* sp.

II.2.3.1. Wybór materiału roślinnego

O wyborze biomas *Cyclopia* sp., przeznaczonych do izolacji związków polifenolowych, zadecydowały wyniki chromatograficznych analiz skryningowych materiału roślinnego, opisane szczegółowo w rozdz. II.1.1.4., II.2.2.2 oraz II.2.2.3. Jak już wspomniano, wykazały one w badanych surowcach obecność szeregu połączeń o charakterze fenolowym, których tożsamości nie zidentyfikowano lub określono częściowo w toku wcześniejszych badań nad miodokrzewami (Joubert i wsp., 2008c; Mfenyana i wsp., 2008; De Beer i wsp., 2009; De Beer i Joubert, 2010). Należały do nich w pierwszej kolejności związki **2**, **7** oraz **8**, występujące w znacznych ilościach w niefermentowanych częściach nadziemnych *C. subternata*. Jako, że uzyskane dla danego surowca widma LC-DAD i LC-ESI-MS (rozdz. II.2.2.2. – Ryc. 32 i 34) nie dostarczyły informacji wystarczających do pełnej identyfikacji wymienionych połączeń, a także wobec braku właściwych substancji referencyjnych, konieczne było wyizolowanie związków **2**, **7** i **8** oraz określenie ich struktury przy użyciu jedno- i dwukierunkowych technik NMR (rozdz. II.2.4. i III.2.5.).

Spośród roślin gruntowych, do prac izolacyjnych przeznaczono również niefermentowane ziele *C. genistoides*. O wyborze powyższego surowca zadecydowała obecność w nim znacznej ilości niezidentyfikowanych połączeń **1** oraz **2** (rozdz. II.2.2.2. – Ryc. 37), jak również wysoka, sięgająca 2000 mg/100 g DW, zawartość izomangiferyny (**4**), (rozdz. II.2.2.3. – Tab. 17). Z uwagi na powyższe, części nadziemne *C. genistoides* wydają się być dogodnym źródłem do pozyskiwania wspomnianych metabolitów, mogących znaleźć zastosowanie w szeroko rozumianych badaniach biomedycznych. W tym miejscu należy zaznaczyć, że jakkolwiek mangiferyna (**3**), jest jednym z najintensywniej badanych naturalnych połączeń polifenolowych, wykazującym m.in. aktywność antyoksydacyjną, przeciwzapalną i przeciwcukrzycową (Masibo i He, 2008; Joubert i wsp., 2008a, 2009; Vyas i wsp., 2012), własności biologiczne jej strukturalnego izomeru (**4**) pozostają w dużej mierze nierozpoznane. Przyczyny takiego stanu rzeczy należy upatrywać przede wszystkim w ograniczonej dostępności izomangiferyny. Mango indyjskie (*Mangifera indica*), stanowiące podstawowe źródło mangiferyny, w zależności od części morfologicznej surowca nie zawiera wcale, bądź jedynie niewielkie ilości jej izomeru (0-13 mg/100 g DW w skórce owocu, 50-80 mg/100 g DW w przypadku kory) (Barreto i wsp., 2008; Masibo i He, 2008). Z tego względu, uznano za celowe opracowanie również metody izolacji izomangiferyny (obok związków **1** i **2**) z niefermentowanych części nadziemnych *C. genistoides*, stanowiących jej bogate źródło. Dodatkowy atut stanowiła w tym przypadku niewielka, w porównaniu z pozostałymi gatunkami miodokrzewów (*C. subternata* i *C. intermedia*), ilość składników zespołu polifenolowego w omawianej roślinie (rozdz. II.2.2.2. – Ryc. 37). Umożliwiło to łatwiejsze rozfrakcjonowanie wyciągu w toku prac preparatywnych.

Oprócz surowców gruntowych *C. genistoides* i *C. subternata*, do prac izolacyjnych wybrano kalus *C. subternata*, charakteryzujący się obecnością, połączeń **6**, **12** i **13** (rozdz. II.1.1.4. – Ryc. 2; rozdz. II.2.2.2. – Ryc. 39), nie stwierdzonych uprzednio w żadnej z badanych roślin macierzystych. Przeprowadzone analizy skryningowe LC-DAD i LC-ESI-MS biomas *in vitro* wykazały, że powyższe związki mają najprawdopodobniej budowę glukozydów izoflawonoidowych (II.2.2.2. – Ryc. 39). Postanowiono dodatkowo wyizolować niniejsze połączenia aby jednoznacznie określić ich tożsamość z wykorzystaniem technik NMR. Opracowanie metody izolacji wspomnianych metabolitów było istotne również z punktu widzenia podstawowego celu projektu, którym było otrzymanie roślinnego systemu *in vitro* do produkcji izoflawonów. Izolacja syntezowanych związków stanowi bowiem etap *downstream* kompletnego procesu uzyskiwania wybranych połączeń polifenolowych, w oparciu o metody biotechnologiczne. Wybór kalusa *C. subternata* do zaplanowanych prac preparatywnych był w tym względzie podyktowany wcześniejszym wyselekcjonowaniem powyższej biomasy jako „superproducenta” do prowadzenia eksperymentów ukierunkowanych na zwiększenie produkcji akumulowanych izoflawonów w oparciu o podejście retrobiosyntetyczne (rozdz. II.1.1.4.). Należy przy tym zaznaczyć, że związki **6**, **12** i **13** były obecne również w kulturach mikropędowych badanych gatunków miodokrzewów (tj. *C. genistoides*, *C. subternata* i *C. intermedia*). Wymienione biomasy nie zostały jednak wykorzystane do celów preparatywnych ze względu na obecność w nich dodatkowych połączeń fenolowych (przede wszystkim ksantonów mangiferyny i izomangiferyny – rozdz. II.1.1.4., Ryc. 2 i 3), a także substancji balastowych (chlorofil), mogących znacząco utrudnić proces izolacji wybranych metabolitów. W zaplanowanych pracach nie użyto również biomas parenchymatycznych *C. genistoides* i *C. intermedia*, zawierających jedynie śladowe ilości związków polifenolowych (rozdz. II.1.1.4. – Tab. 8).

II.2.3.2. Izolacja związków polifenolowych

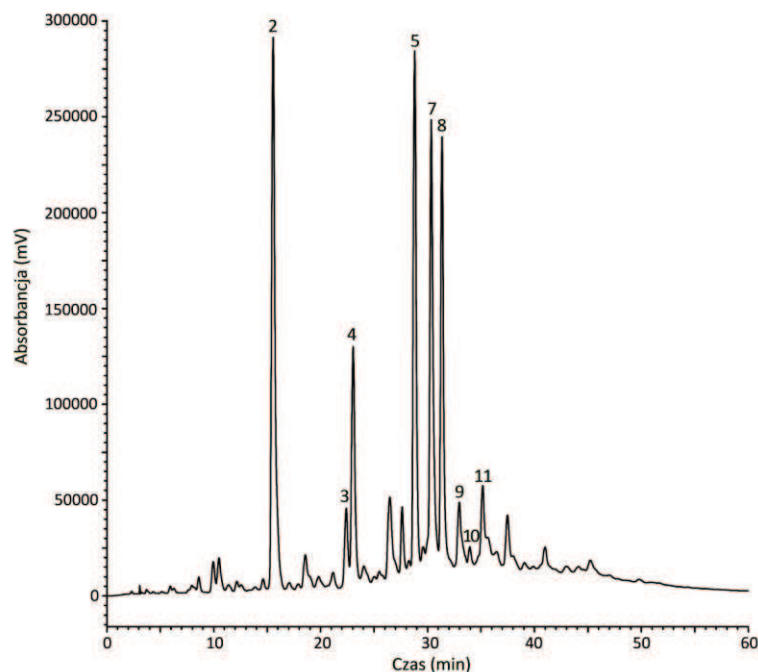
Do izolacji związków polifenolowych z biomas *Cyclopia* sp. posłużyły wzbogacone frakcje octanowe z poszczególnych surowców, których przygotowanie opisano szczegółowo w rozdz. II.2.1. i III.2.4.1. Wybrane połączenia (bądź ich mieszaniny) zebrano ponadto jako osady wytrącające się w toku prowadzonych prac preparatywnych. Właściwą separację poszczególnych składników wzbogaconych frakcji fenolowych prowadzono z wykorzystaniem semipreparatywnych technik chromatograficznych, po wcześniejszym wykonaniu pilotażowych analiz skryningowych HPLC badanych mieszanin. Zebrane w toku prac izolacyjnych eluaty, zawierające poszczególne związki polifenolowe lub ich mieszaniny, liofilizowano, a następnie przeznaczano bezpośrednio do celów identyfikacji bądź też dalszego oczyszczania. Poniżej omówiono szczegółowo proces izolacji wybranych polifenoli z poszczególnych surowców, odwołując się przy tym do opisów procedur eksperymentalnych oraz schematów zawartych w części doświadczalnej projektu (rozdz. III.2.4.)

A) *C. subternata* (roślina gruntowa)

Otrzymane z badanego surowca „pierwotne wyciągi H₂O“ poddano procedurze frakcjonowanej ekstrakcji ciecz-ciecz (wytrząsanie z kolejnymi porcjami octanu etylu) celem uzyskania „wyciągów do izolacji“ charakteryzujących się wzbogaconym składem polifenoli o nieokreślonej do tej pory strukturze (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 46). Opisowanemu procesowi towarzyszyło wytrącanie osadu (A1) w warstwie wodnej. Analiza HPLC wykazała, że składał się on z dwóch połączeń: **11** (hesperydyny) oraz **7** (najprawdopodobniej skolimozydu). Opisane zjawisko związane było ze słabą rozpuszczalnością wymienionych związków (Grohmann i wsp., 2000; De Beer i wsp., 2009), obniżoną dodatkowo poprzez zmieszanie pierwotnego ekstraktu wodnego z niepolarnym rozpuszczalnikiem. Współwytrącanie powyższych połączeń odnotowano także w czasie wcześniejszych prac preparatywnych, obejmujących izolację polifenoli z materiału gruntowego *C. subternata* metodą wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej (HSCCC) (De Beer i wsp., 2009). Obserwowany fenomen był korzystny z uwagi na pozyskiwanie związku **7**, którego izolacja wymagała w tym przypadku jedynie oddzielenia go od hesperydyny (**11**). Z uwagi na powyższe, osad (A1) zachowano do dalszych prac preparatywnych.

Fracje octanowe, odpowiadające kolejnym porcjom użytego do ekstrakcji rozpuszczalnika, poddano skryningowym analizom HPLC, które nie wykazały między nimi wyraźnych różnic jakościowych i ilościowych w zakresie izolowanych połączeń polifenolowych. Wobec powyższego, uzyskane roztwory octanowe połączono, odparowano do syropowatej pozostałości i rozpuszczono w metanolu (frakcja A2). W czasie przechowywania uzyskanego roztworu w niskiej temperaturze (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 46) zaobserwowano wytrącanie się jasnożółtego osadu (A3), który następnie poddano analizie HPLC. Wykazała ona obecność we wspomnianej frakcji jednego połączenia tj. mangiferyny (**3**). Zjawisko wytrącania wspomnianego związku wynika z jego dużej zawartości w analizowanym materiale roślinnym (rozdz. II.2.2.3. – Tab. 17), a także względnie słabej rozpuszczalności w rozpuszczalnikach polarnych i semipolarnych (De Souza i wsp., 2009). Po oddzieleniu osadu mangiferyny, pozostały roztwór octanowy (A2) przeznaczono do dalszych prac preparatywnych, przeprowadzając uprzednio skryningową analizę HPLC wspomnianej frakcji. Wykazała ona w niej obecność znacznych ilości znanych związków (**3, 4, 5, 9, 11**), jak również poszukiwanych połączeń o nieokreślonej do tej pory strukturze (zw. **2, 7, 8** oraz **10** – Ryc. 40).

Właściwy etap izolacji niezidentyfikowanych związków polifenolowych z frakcji octanowej przeprowadzono z wykorzystaniem semipreparatywnej chromatografii cieczowej. Ze względu na złożony charakter zespołu metabolitów wtórnych, obecnego w niefermentowanym materiale gruntowym *C. subternata*, wiążący się z obecnością szeregu połączeń o zbliżonej masie cząsteczkowej (< 1000 Da), strukturze (związki o budowie rutynozydów) oraz czasach retencji (rozdz. II.2.2.2. – Ryc. 33-35), konieczne było zastosowanie systemu chromatograficznego o sprawności porównywalnej z kolumnami analitycznymi.



Ryc. 40. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280$ nm, kolumna Supelcosil LC-18 15 cm \times 4,6 mm) frakcji octanowej z wyciągu metanolowego otrzymanego z niefermentowanego materiału gruntowego *Cyclopia subternata*. Piki: **2**, 3-*C*- β -glukozyd iriflofenonu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **5**, eriocytryna; **7**, skolimozyd; **8**, 3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny; **9**, narirutyna; **10**, izoroifolina; **11**, hesperydyna.

Warunki te spełniają kolumny pakowane z ziarnem o średnicy 3 μ m, a także kolumny monolityczne wypełnione porowatym rdzeniem. W przypadku kolumn pakowanych długości 100 mm i średnicy 4 mm, ciśnienia robocze wynoszą z reguły 50-100 bar (Unger i wsp., 2008). Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy analizy pilotażowe wykazały zarazem, że kolumna RP-18 o parametrach zbliżonych do wymienionych powyżej (75 mm długości, 4,6 mm średnicy, średnica ziarna 3 μ m, ciśnienie robocze ok. 100 bar) nie zapewniała zadowalających rozdzieleń badanego zespołu związków, przy uwzględnieniu zwiększonej ilości wyciągu (prace izolacyjne), podawanego w jednorazowym nastrzyku. Z drugiej strony, wydłużenie kolumny do 200 mm w celu poprawy sprawności układu wiązałoby się, przy uwzględnieniu 2,5-krotnego zwiększenia prędkości przepływu fazy ruchomej, w celu zachowania tego samego czasu analizy, ze wzrostem ciśnienia do ponad 600 bar. Jakkolwiek utrzymanie powyższej wartości ciśnienia roboczego przekracza możliwości większości preparatywnych systemów HPLC, to uzyskanie znacznie niższych oporów przepływu jest możliwe w przypadku zastosowania kolumn monolitycznych. Charakteryzują się one m.in. wysoką sprawnością rozdzieleń przy dużych prędkościach przepływu fazy ruchomej, a co za tym idzie, krótszymi czasami analizy (Apers i wsp., 2004; Guiochon i wsp., 2007; Unger i wsp., 2008). Niskie opory przepływu umożliwiają również seryjne łączenie dwóch bądź większej ilości kolumn monolitycznych, co skutkuje odpowiednim zwiększeniem sprawności układu (w rozumieniu ilości półek teoretycznych) przy

zachowaniu dopuszczalnych wartości ciśnienia roboczego (Dear i wsp., 2002; Maruška i Kornyšova, 2006). Doniesienia literaturowe pokazują, że powyższe podejście zapewnia efektywną separację wieloskładnikowych mieszanin polifenoli, w tym izoflawonów (Apers i wsp., 2004; Rostagno i wsp., 2007), procyjanidyn (Koerner i wsp., 2009) oraz ginkgolidów (Van Nederkassel i wsp., 2005).

Opisane cechy kolumn monolitycznych wskazują jednoznacznie na możliwość ich wykorzystania do separacji wieloskładnikowych mieszanin połączeń naturalnych ze skomplikowanych matryc roślinnych. Należy przy tym zaznaczyć, że kolumny monolityczne RP-18 dużej pojemności, mogące znaleźć zastosowanie do celów izolacji związków polifenolowych, są dostępne komercyjnie dopiero od kilku lat. W rezultacie, ilość doniesień literaturowych dotyczących ich użycia do izolacji roślinnych metabolitów wtórnych jest jak dotąd ograniczona (Malek i wsp., 2011; Zhang i wsp., 2011).

Z uwagi na powyższe, w pracach preparatywnych wchodzących w zakres niniejszego projektu zdecydowano się na zastosowanie układu dwóch szeregowo połączonych kolumn monolitycznych RP-18. Opisany system okazał się odpowiedni do separacji składników polifenolowych obecnych w wyciągu octanowym z części nadziemnych *C. subternata* (frakcja A2) oraz osadu (A1) uzyskanego w toku prac izolacyjnych (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 46).

W pierwszej kolejności, frakcję A2 poddano rozdzielaniu z wykorzystaniem elucji gradientowej wg programu analogicznego do stosowanego w przypadku analiz skryningowych miodokrzewów (rozdz. III.2.4.3.). Ponadto, w celu uniknięcia hydrolizy preparowanych połączeń, zrezygnowano z dodatku do fazy ruchomej modyfikatora kwasowego (tj. kwasu mrówkowego). Niestety, w opisywanych warunkach nie powiodło się rozdzielanie wszystkich składników badanego zespołu związków. Uzyskane frakcje (A2a, A2b i A2c) wymagały powtórnej separacji, tym razem z użyciem kolumny monolitycznej oraz elucji izokratycznej w układzie rozpuszczalników woda:acetonitryl. W efekcie zastosowanych procedur, uzyskano spektralnie czyste związki **2**, **8**, **9** i **10**, które następnie przeznaczono do badań identyfikacyjnych. Na mniejsze problemy napotkano w czasie prac preparatywnych obejmujących frakcję A1 (osad), którą rozdzielono w czasie pojedynczego pasażu na składniki **7** i **11** w warunkach izokratycznych (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 46; rozdz. III.2.4.3.).

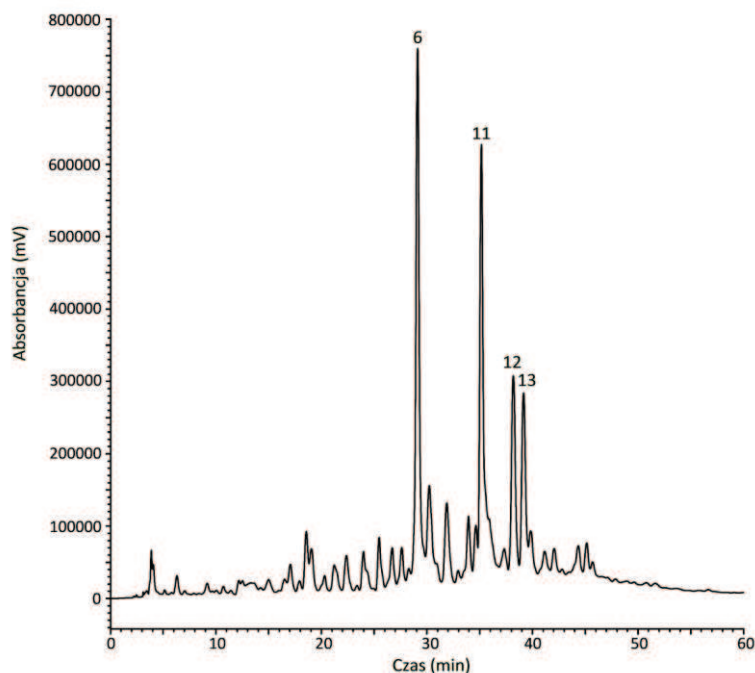
Zaproponowana w niniejszej pracy procedura izolacji związków polifenolowych z wyciągów *Cyclopia* sp., metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, stanowi alternatywę dla opisanych w literaturze, dla danego surowca, takich technik jak ekstrakcja przeciwwądowna Craiga, chromatografia kolumnowa z użyciem sit molekularnych SephadexTM (Ferreira i wsp., 1998; Kamara i wsp., 2004) oraz wysokosprawna chromatografia w przeciwwądownie HSCCC (De Beer i wsp., 2009). Wydaje się również, że opracowany, w toku prac izolacyjnych, system chromatografowania może być poddany dalszym usprawnieniom, obejmującym przede wszystkim dodatek kolejnych kolumn monolitycznych w celu zwiększenia ilości pólek teoretycznych. Ciśnienie robocze wynosiło, w omawianym przypadku, zaledwie ok. 70-90 bar, tj. znacznie mniej niż przewidywane 600 bar dla 200 mm kolumny wypełnionej ziarnem, stwarzając tym samym możliwość wydłużenia drogi rozdzielania bez

nadmiernego wzrostu oporu. Dostępne dane literaturowe wskazują, że w wybranych badaniach łączono szeregowo nawet do 6 kolumn monolitycznych, co byłoby nierealne w przypadku standardowych wypełnień złożonych z ziaren (Dear i wsp., 2002). Co istotne, stworzone w ten sposób układy chromatograficzne mogą pracować przy ok. 3-krotnie wyższych prędkościach przepływu fazy ruchomej w porównaniu do kolumn wypełnionych ziarnem (Unger i wsp., 2008). Powyższa właściwość jest szczególnie istotna z punktu widzenia wydajności procedur *downstream* w procesie biotechnologicznego otrzymywania związków naturalnych. Zapewnia ona bowiem pozyskanie większych ilości danego związku w jednostce czasu.

Oprócz samego faktu wyizolowania niezidentyfikowanych związków z części nadziemnych *C. subternata*, charakter nowości naukowej w opisywanym projekcie ma zastosowany sposób rozdzielania składników zespołu polifenolowego. Dostępne dane literaturowe wskazują, że technika szeregowego łączenia została, w ramach przeprowadzonych badań, użyta po raz pierwszy dla semipreparatywnych kolumn monolitycznych RP-18. Wykonane eksperymenty stanowiły jednocześnie pierwszą próbę separacji złożonej mieszaniny polifenoli roślinnych przy użyciu wspomnianego systemu seryjnie sprzężonych kolumn w skali semipreparatywnej. Wspomniane wcześniej doświadczenia z wykorzystaniem 6 połączonych kolumn analitycznych powyższego typu, obejmowały bowiem izolację leków z płynów ustrojowych (Dear i wsp., 2002).

B) *C. subternata* (kalus)

Podobnie jak w przypadku ekstraktów z części nadziemnych *C. subternata*, przeznaczonych do badań izolacyjnych, wzbogacony w związki flawonoidowe wyciąg z kalusa niniejszego gatunku uzyskano na drodze kolejnych ekstrakcji „pierwotnego wyciągu H₂O“ z surowca za pomocą octanu etylu (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 47). Przeprowadzone skryningowe analizy HPLC frakcji octanowych, odpowiadających poszczególnym porcjom użytego rozpuszczalnika organicznego, nie wykazały między nimi istotnych różnic jakościowych oraz ilościowych w zakresie izolowanych metabolitów. Połączono je więc i skierowano do dalszych prac preparatywnych (wyciąg B2, rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 47). Podobnie jak w przypadku rośliny gruntowej, kolejnym ekstrakcjom „pierwotnego wyciągu H₂O“ za pomocą octanu etylu towarzyszyło wytrącanie w warstwie wodnej osadu (B1), który po odsączeniu przebadano pod względem obecności polifenoli. Analiza chromatograficzna HPLC wykazała w nim obecność pojedynczego związku flawonoidowego – hesperydyny (**11**). Octanowa frakcja B2 charakteryzowała się zaś występowaniem wspomnianego powyżej flawanonu (**11**), a także znacznych ilości izoflawonoidowych połączeń **6**, **12** i **13** (Ryc. 41).

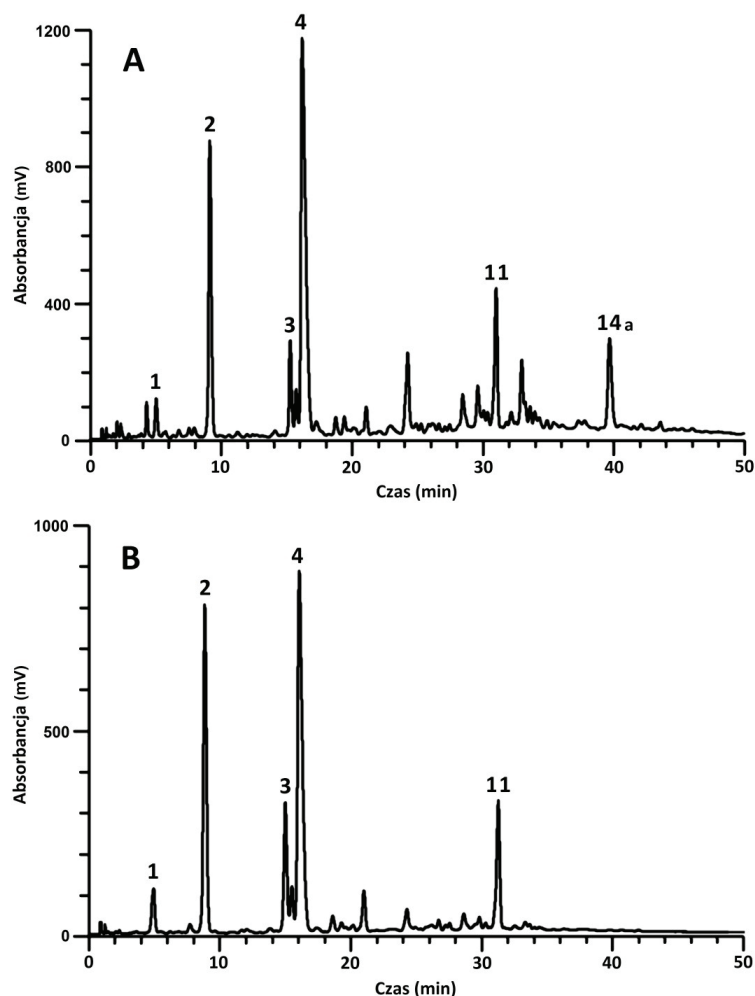


Ryc. 41. Chromatogram HPLC ($\lambda = 280$ nm, kolumna Supelcosil LC-18 15 cm \times 4,6 mm) frakcji octanowej z wyciągu metanolowego otrzymanego z kalusa *Cyclopia subternata*. Piki: **6**, 7-*O*- β -glukozyd kalikozyny; **11**, hesperydyna; **12**, 7-*O*- β -glukozyd pseudobaptygeniny; **13**, 7-*O*- β -glukozyd formononetyny.

Obecność znacznych ilości substancji balastowych pochodzących z materiału roślinnego *in vitro* (polisacharydy, peptydy i aminokwasy), sprawiała że frakcja octanowa z kalusa *C. subternata* nie nadawała się bezpośrednio do prac preparatywnych z wykorzystaniem HPLC. Z uwagi na powyższe, zdecydowano się na wstępną separację wyciągu B2 przy pomocy grawitacyjnej chromatografii kolumnowej w układzie faz normalnych złożonym z żelu krzemionkowego oraz eluentu w postaci mieszaniny chloroform/metanol (rozd. III.2.4.3.). Opisana procedura umożliwiła wstępne rozdzielenie ekstraktu B2 na 2 podfrakcje: B2b, zawierającą związek **6** oraz B2a, zawierającą połączenia **12** i **13** (rozd. III.2.4.1. – Ryc. 47). W żadnym z uzyskanych tą drogą izolatów nie wykazano ponadto obecności hesperydyny, co było korzystne z uwagi na pozyskiwanie izoflawonów **6**, **12** i **13**. Właściwą separację lub oczyszczenie uzyskanych podfrakcji wykonano z użyciem, opisanego w punkcie A) niniejszego rozdziału, semipreparatywnego systemu HPLC. Frakcje B2a i B2b rozdzielano w warunkach izokratycznych, uzyskując w rezultacie eluaty zawierające wymienione powyżej połączenia w postaci czystej (rozd. III.2.4.3.). Z uwagi na fakt, że biomasa parenchymatyczna *C. subternata* została wyselekcjonowana do prowadzenia wielkoskalowych eksperymentów biotechnologicznych ukierunkowanych na pozyskiwanie polifenoli (rozd. II.1.1.4.), opracowanie procedury izolacji wspomnianych związków z matrycy hodowlanych (etap *downstream* procesu technologicznego) stanowiło istotny element zaplanowanych prac badawczych.

C) *C. genistoides* (roślina gruntowa)

Proces izolacji połączeń polifenolowych z części nadziemnych *C. genistoides*, opisany szczegółowo w części doświadczalnej pracy (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 48; rozdz. III.2.4.3.), był zasadniczo zbliżony do procedury zastosowanej dla biomas *C. subternata*. W celu uzyskania frakcji o zwiększonej zawartości połączeń polifenolowych, „pierwotny wyciąg H₂O“ ekstrahowano wyczerpująco kolejnymi porcjami octanu etylu. Podobnie jak w przypadku opisanych uprzednio prac izolacyjnych obejmujących surowiec gruntowy i kalus *C. subternata*, podczas wytrząsania warstwy wodnej kolejnymi porcjami octanu etylu obserwowano w niej formowanie się osadu (C1). Analiza chromatograficzna otrzymanych wyciągów octanowych (C2-C13) wykazała zmienny skład poszczególnych frakcji w zakresie izolowanych polifenoli. Z tego względu, wyciągów nie łączono jak to miało miejsce podczas prac preparatywnych prowadzonych na biomasach *C. subternata*. Umieszczano je natomiast w niskiej temperaturze, gdzie obserwowano wytrącanie osadów (C14-C25) (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 48). Analizy HPLC wykazały, że wytrącone osady mają charakter jednoskładnikowy: hesperydyna (C1) oraz mangiferyna (C14-C25). Stwierdzono ponadto istotne różnice jakościowe i ilościowe w składach frakcji odpowiadających kolejnym porcjom octanu etylu, tj. C2-C13 (Ryc. 42). Frakcja C2, jako jedyna charakteryzowała się obecnością połączenia **14a** o długim czasie retencji (39, 8 min – Ryc. 42A), wskazującym na jego aglikonowy charakter. W dalszej części prac preparatywnych, powyższy związek wyizolowano z rozpuszczonego w wodzie wyciągu octanowego metodą frakcjonowanej ekstrakcji z użyciem eteru dietylowego, a następnie skierowano go do identyfikacji (frakcja C2a). Biorąc pod uwagę podstawowy cel zaplanowanych, z wykorzystaniem surowca gruntowego *C. genistoides*, prac izolacyjnych, tj. opracowanie metody pozyskiwania połączeń **1**, **2** oraz **4** (izomangiferyna), najbardziej cenne wydawały się w tym względzie frakcje od C3 do C11 (rozdz. III.2.4.1. – Ryc. 48). Zawierały one, oprócz znacznych ilości związków **1** i **2**, duże stężenia izomangiferyny (**4**) oraz niewielkie ilości mangiferyny (**3**). Frakcje C3 i C4, odpowiadające początkowym etapom ekstrakcji „pierwotnego wyciągu H₂O“ octanem etylu, odrzucono ze względu na znaczną zawartość niepolarnych substancji balastowych. Frakcje C12 i C13, charakteryzujące się porównywalnymi stężeniami mangiferyny i izomangiferyny, a także niewielką ilością związków **1** i **2**, również nie zostały wykorzystane w dalszej części badań. Jedynie połączone wyciągi C5-C11 (Ryc. 42B), z uwagi na małą ilość „zanieczyszczeń“ towarzyszących wtórnym metabolitom **1**, **2** i **4**, przeznaczono do dalszych prac eksperymentalnych.



Ryc. 42. Chromatogramy HPLC ($\lambda = 280$ nm, kolumna Discovery[®] HS C18 7,5 cm \times 4,6 mm) frakcji octanowych C2 (A) i C5-C11 (B) z wyciągów metanolowych otrzymanych z niefermentowanego materiału gruntowego *Cyclopia genistoides*. Piki: **1**, 3-C- β -glukozyd mاکلuryny; **2**, 3-C- β -glukozyd iriflofenonu; **3**, mangiferyna; **4**, izomangiferyna; **11**, hesperydyna; **14a**, luteolina.

Istotną obserwacją poczynioną w trakcie prowadzonych badań preparatywnych był fakt, że izomangiferyna (**4**) nie ulegała współwytrącaniu z mangiferyną (**3**) w trakcie przechowywania w obniżonej temperaturze rozpuszczonych w metanolu frakcji octanowych. Skutkiem powyższego, przeznaczona do prac izolacyjnych frakcja C5-11 zawierała znaczne ilości związku **4** w formie rozpuszczonej (Ryc. 42B). Jakkolwiek finalny etap separacji składników polifenolowych ze wspomnianej frakcji zamierzano przeprowadzić w oparciu o semipreparatywną chromatografię cieczową, postanowiono wstępnie sprawdzić, czy możliwe jest wytrącenie izomangiferyny z roztworu na drodze zmiany rozpuszczalnika na bardziej polarny. Pozostały po strąceniu izomangiferyny roztwór, zawierający kolejne składniki polifenolowe, mógłby być następnie wykorzystany do izolacji związków, które nie uległy wytrąceniu. W związku z powyższym, w celu obniżenia rozpuszczalności połączenia **4**, badany ekstrakt metanolowy odparowano do sucha, rozpuszczono w 25 % wodnym roztworze acetonitrylu, a następnie przechowywano w obniżonej temperaturze (rozd. III.2.4.1. – Ryc. 48; rozdz. III.2.4.3.). W efekcie, uzyskano wolny od mangiferyny osad jej strukturalnego izomeru (**4**) (frakcja C5-11a). Pozostały ekstrakt poddano następnie

separacji metodą semipreparatywnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem układu połączonych szeregowo kolumn monolitycznych RP-18, zastosowanych uprzednio do rozdzieleń wyciągów z *C. subternata* (punkt A niniejszego rozdziału). Powyższy system umożliwił separację składników **1** i **2** w fazie ruchomej złożonej z wody i acetonitrylu, w warunkach izokratycznych. Otrzymane połączenia **1**, **2** i **4** przeznaczono do badań strukturalnych, w celu określenia lub potwierdzenia ich tożsamości.

Zaproponowany w niniejszej pracy sposób pozyskiwania izomangiferyny (**4**) z części nadziemnych *C. genistoides*, oparty w znacznej mierze na różnicach w rozpuszczalności izomerycznych ksantonów **3** i **4**, wydaje się stanowić rozsądną alternatywę dla opisanych w literaturze technik chromatograficznych. Metodoms izolacji izomangiferyny, a także jej separacji od mangiferyny (w przypadku obecności obydwu izomerów w danym surowcu roślinnym), poświęcono jak dotąd nieliczne prace. W szczególności zwraca uwagę opracowany protokół izolacji izomangiferyny z części nadziemnych *C. subternata*, obejmujący frakcjonowaną ekstrakcję (etap I), zastosowanie wysokosprawnej chromatografii w przeciwrządzie HSCCC (etap II) oraz semipreparatywnej chromatografii cieczowej HPLC (etap III) (De Beer i wsp., 2009). Spośród innych surowców, do pozyskiwania izomangiferyny wykorzystano liście kawy gatunku *Coffea pseudozanguebariae*, stosując w tym celu metodę opartą o wstępną ekstrakcję matrycy roślinnej (I), średniociśnieniową chromatografię kolumnową (II) i finalne oczyszczanie związku z użyciem sit molekularnych SephadexTM (III) (Talamond i wsp., 2011). W porównaniu do opisanych powyżej technik, metoda opracowana w toku niniejszej pracy jest prosta i umożliwia pozyskanie, w ciągu względnie krótkiego czasu, znacznych ilości danego metabolitu (w omawianym przypadku uzyskano ponad 200 mg izomangiferyny ze 100 g surowca – rozdz. III.2.4.1., Ryc. 48). Dodatkowy atut stanowi ponadto możliwość wykorzystania wspomnianego protokołu do izolacji połączeń **1** oraz **2**, współwystępujących w badanym surowcu.

W przypadku opisanych w literaturze technik chromatograficznych, tzw. „wąskie gardło“ stanowi (w rozumieniu ograniczenia wydajności procesu) pojemność stosowanych kolumn oraz przepustowość zestawu. Przykładowo, zaproponowana metoda izolacji izomangiferyny z użyciem wysokosprawnej chromatografii przeciwrządowej umożliwiła uzyskanie jedynie 4,2 mg czystego związku, przy czym w pracy wykorzystywano wyciąg uzyskany ze 150 g części nadziemnych *C. subternata* (De Beer i wsp., 2009).

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych prac opracowano unikatowe procedury izolacji związków polifenolowych wchodzących w skład badanych matryc roślinnych. Wykorzystanie na szeroką skalę metod strąceniowych (izolacja mangiferyny, izomangiferyny oraz hesperydyny) oraz, po raz pierwszy, semipreparatywnej chromatografii cieczowej w układzie połączonych szeregowo kolumn monolitycznych RP-18 (izolacja izoflawonów oraz benzofenonów) stwarza realne szanse do wykorzystania opisanych protokołów w procedurach *downstream* procesu biotechnologicznego otrzymywania powyższych metabolitów. Zoptymalizowane metody separacji wybranych polifenoli, jako stosunkowo proste oraz bardzo wydajne, są niezwykle przydatne z technologicznego punktu widzenia.

II.2.4. Identyfikacja związków polifenolowych

Jak już wcześniej wspomniano, podstawowych informacji dotyczących struktury niezidentyfikowanych połączeń polifenolowych obecnych w wyciągach z *Cyclopia* sp. dostarczyły uzyskane w czasie analiz skryningowych HPLC widma LC-DAD oraz, w większym stopniu, LC-ESI-MS (rozdz. II.2.2.2. oraz III.2.3.3.3.). Tożsamość większości składników badanych zespołów polifenolowych, stwierdzonych uprzednio w rodzaju *Cyclopia*, tj. związków **3**, **4**, **5**, **6**, **9**, **10**, **11**, **13**, **14**, **14a** i **15**, potwierdzono dodatkowo na drodze kochromatografii z dostępnymi komercyjnie substancjami wzorcowymi (rozdz. II.2.2.2. oraz). W przypadku połączeń wyizolowanych po raz pierwszy w ramach niniejszej pracy, bądź metabolitów, których tożsamości nie potwierdziły w pełni przeprowadzone do tej pory badania nad miodokrzewami, ich strukturę chemiczną określano z wykorzystaniem technik NMR. Wyjątek stanowiła w tym względzie didymina (**14**), zidentyfikowana jedynie na podstawie widm LC-DAD i LC-ESI-MS oraz kochromatografii z substancją referencyjną, ze względu na nieuwzględnienie gatunku *C. intermedia* (stanowiącego jedyne, spośród badanych gatunków, źródło połączenia **14**) w zaplanowanych pracach izolacyjnych. Identyfikację pozostałych polifenoli prowadzono w oparciu o wyniki eksperymentów jednokierunkowych ^1H NMR (związki **1**, **2**, **4**, **6**, **7**, **8**, **10**, **12** i **13**) i ^{13}C NMR (**2**, **8**), dwukierunkowych ^1H - ^1H gCOSY (**2**, **6**, **7**, **8**, **10**, **12**, **13**), ^1H - ^1H DQF-COSY (**2**), ^1H - ^1H ROESY (**2**, **4**, **6**, **7**, **8**, **10**), ^1H - ^{13}C gHSQC (**2**, **4**, **6**, **7**, **8**, **10**, **12**) oraz ^1H - ^{13}C gHMBC (**2**, **6**, **7**, **8**, **10**). Pełne zestawienie danych spektralnych analizowanych połączeń zawarto w części doświadczalnej pracy (rozdz. III.2.5.). Z uwagi na objętość pracy, nie przedstawiono szczegółowej dyskusji odnośnie struktury identyfikowanych połączeń wynikającej z danych NMR. Wyizolowane polifenole, aczkolwiek stwierdzone w rodzaju *Cyclopia* po raz pierwszy, były już uprzednio opisywane jako składniki innych gatunków roślinnych. Z tego względu, tożsamość wydzielonych, z biomas miodokrzewów, wtórnych metabolitów określono porównując uzyskane dane spektralne z odpowiednimi informacjami źródłowymi dotyczącymi identyfikacji tych związków w innych matrycach. Poniżej przedstawiono wybrane aspekty identyfikacji poszczególnych polifenoli, ze szczególnym uwzględnieniem technik magnetycznego rezonansu jądrowego. Pominięto przy tym połączenia stanowiące dobrze rozpoznane składniki miodokrzewów, opisane uprzednio w literaturze (Joubert i wsp., 2008a), tj. mangiferynę (**3**), eriocytrynę (**5**), narirutynę (**9**), hesperydynę (**11**), luteolinę (**14a**) oraz hesperetynę (**15**), których strukturę określano jedynie na podstawie kochromatografii z substancjami wzorcowymi oraz analizy widm LC-DAD i LC-ESI-MS (rozdz. II.2.2.2.).

Związki 1 i 2

Widma LC-DAD i LC-ESI-MS, zarejestrowane dla połączeń **1** i **2**, były wyraźnie odmienne od danych spektroskopowych uzyskanych dla pozostałych składników polifenolowych występujących w ekstraktach z *Cyclopia* sp. Stwierdzono ponadto, że powyższe związki mają najprawdopodobniej charakter C-glukozydów.

Eksperyment ^{13}C NMR przeprowadzony dla połączenia **2** wykazał obecność sygnału δ 194,6 ppm, charakterystycznego dla pochodnych benzofenonu (Ferrari i wsp., 2000; Tanaka i wsp., 1984). Poprzez porównanie z dostępnymi danymi literaturowymi, związek **2** zidentyfikowano jednoznacznie jako 3-*C- β* -glukozyd iriflofenonu (Tanaka i wsp., 1984; Murakami i wsp., 1986).

Połączenie **1** charakteryzowało się widmem LC-DAD i LC-ESI-MS zbliżonym do związku **2**, jego masa odpowiadała zaś 3-*C- β* -glukozydowi makluryny. Podobnie jak w przypadku 3-*C- β* -glukozydu iriflofenonu, stwierdzono bardzo dobrą zgodność uzyskanych danych spektroskopowych z danymi literaturowymi (Tanaka i wsp., 1984). Widma ^1H NMR składników **1** i **2** były ponadto takie same w zakresie protonów cukrowych. Stwierdzono w nich m.in. obecność sygnałów charakterystycznych dla glukozy. Uwagę zwracał zwłaszcza sygnał w zakresie δ 4,58-4,59 ppm pochodzący od protonu znajdującego się przy węglu anomerycznym (dublet o stałej sprzężenia 9,6 Hz), wskazujący na *C*-glukozydowy charakter połączenia. Uzyskane dane pozwoliły jednoznacznie zidentyfikować część glikonową związków **1** i **2** jako glukozę.

Związek 4

Jakkolwiek związek **4** (izomangiferyna) został uprzednio zidentyfikowany w szeregu gatunkach miodokrzewów (Joubert i wsp., 2008a; De Beer i wsp., 2009), w ramach niniejszej pracy wyizolowano go w znacznych ilościach po raz pierwszy z części nadziemnych *C. genistoides*. Z tego względu, tożsamość składnika **4** ustalono, poza technikami chromatograficznymi, również na drodze eksperymentów NMR. Wykazały one jednoznacznie, że analizowany związek należy do grupy ksantonów (Silva i Pinto, 2005). W rezultacie szczegółowych analiz porównawczych, wykazano bardzo dobrą zgodność otrzymanych danych spektroskopowych z doniesieniami literaturowymi (Aritomi i Kawasaki, 1970; Fujita i Inoue, 1982; De Beer i wsp., 2009). Dla celów niniejszej pracy, istotne było przede wszystkim jednoznaczne określenie miejsca przyłączenia części cukrowej w analizowanym połączeniu, jako że pozostałe dane spektralne były zbieżne ze związkiem **3**, tj. mangiferyną. Umieszczenie reszty cukrowej w położeniu **4** wykazał eksperyment ^1H - ^1H ROESY, wskazujący na wystąpienie korelacji dalekiego zasięgu H1'/H5. Tym samym, ostatecznie potwierdzono obecność izomangiferyny w powyższym gatunku.

Związki 6, 12 i 13

Wyniki wykonanych uprzednio analiz skryningowych LC-DAD i LC-ESI-MS wykazały, że połączenia **6**, **12** i **13** wykryte w kulturach *in vitro* miodokrzewów mają najprawdopodobniej charakter glukozydów izoflawonoidowych (rozdz. II.2.2.2.). W związku z brakiem wspomnianych związków w biomasach *Cyclopia* sp. z upraw gruntowych, konieczne było jednoznaczne określenie ich struktury na drodze eksperymentów NMR.

W tym miejscu należy zaznaczyć, że obecność izoflawonów o charakterze aglikonów odnotowano uprzednio w materiale gruntowym z *C. intermedia* (kalikozyna, formononetyna, pseudobaptygenina, afrormozyna i fudzikinetyna) (Ferreira i wsp., 1998) i *C. subternata* (orobol) (Kamara i wsp., 2004). Co istotne, masy jonów fragmentacyjnych obserwowane w widmach LC-ESI-MS związków **6**, **12** i **13** były równe masom cząsteczkowym odpowiednio kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny. Analizy chromatograficzne wykazały ponadto, że omawiane połączenia charakteryzują się takim samym schematem fragmentacji ESI-MS, obejmującym utratę fragmentu o masie 163 Da, odpowiadającego heksopiranozie (rozdz. II.2.2.2. – Ryc. 39).

Z uwagi na powyższe postanowiono sprawdzić, czy wyniki analiz NMR i LC-ESI-MS, przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, odpowiadają dostępnym w literaturze danym spektralnym uzyskanym dla połączeń izoflawonoidowych. Uzyskane widma ^1H NMR związków **6**, **12** i **13** wykazywały obecność sygnałów pochodzących od protonu H-2 (singlet w zakresie 8,40-8,46 ppm) oraz protonu węgla anomerycznego części cukrowej (dublet o stałej sprzężenia 7,0-7,3 Hz przy 5,11-5,12 ppm), charakterystycznych dla *O*-glukozydów izoflawonowych (Du i wsp., 2006). Stwierdzono zarazem bardzo dobrą zgodność widm związków **6**, **12** oraz **13** odpowiednio z 7-*O*- β -glukozydami kalikozyny (Yu i wsp., 2005a; Du i wsp., 2006; Xu i wsp., 2006), pseudobaptygeniny (Yuldashev i wsp., 1989; Wang i wsp., 2001) i ononiny (Lewis i wsp., 1998; Wang i wsp., 2001; Yu i wsp., 2005a; Xu i wsp., 2006). Ograniczone ilości połączeń **12** i **13** nie pozwoliły na wykonanie w ich przypadku pełnego zestawu eksperymentów NMR, uniemożliwiając zarazem jednoznaczną identyfikację części cukrowej. Porównanie widma ^1H NMR związku **6**, o jednoznacznie określonej części glikonowej, z widmami połączeń **12** i **13** wykazało jednak, że są one identyczne w zakresie protonów cukrowych (ilość sygnałów charakterystyczna dla heksozy, obecność dubletu odpowiadającego protonowi zlokalizowanemu przy węglu anomerycznym, rozdz. III.2.5.). Powyższa obserwacja jest zgodna z dostępnymi informacjami, dotyczącymi biosyntezy połączeń izoflawonoidowych, wskazują one bowiem na 7-*O*- β -glukozydy jako podstawową formę magazynową wspomnianych związków (Dixon, 1999).

Związek 7 i 10

Przeprowadzone wcześniej analizy LC-DAD i LC-ESI-MS wskazywały, że związki **7** i **10** są najprawdopodobniej pochodnymi flawonu o charakterze rutynozydów. W uzyskanych dla wymienionych połączeń widmach NMR stwierdzono obecność sygnałów charakterystycznych dla protonu H-3 pierścienia heterocyklicznego (singlety przy 6,73 i 6,86 ppm odpowiednio dla związków **7** i **10**), jak również sygnałów grupy metylowej ramnozy (dublety o stałej sprzężenia 6,3 Hz przy 1,07 ppm). Poprzez analizę porównawczą widm NMR z dostępnymi danymi literaturowymi, powyższe połączenia zidentyfikowano odpowiednio jako skolimozyd (7-*O*-rutynozyd luteoliny) (Kim i wsp., 2000; Jung i wsp., 2011) oraz izoroifolinę (7-*O*-rutynozyd apigeniny) (Kasaj i wsp., 2001; El Alfy i wsp., 2010). Eksperymenty dwukierunkowe gHMBC (heterojądrowa

korelacja dalekiego zasięgu) potwierdziły też obecność wiązania 1→6 pomiędzy cząsteczkami ramnozy i glukozy, charakterystycznego dla rutynozydów. Wykazano tym samym, że analizowane połączenia nie należą do neohesperozydów, posiadających wiązanie 1→2 w części cukrowej (Mućaji i wsp., 2009).

Związek 8

Jakkolwiek widmo LC-DAD analizowanego metabolitu wskazywało na związek o budowie flawanonu, to zarejestrowane widma ¹H NMR nie wykazywały obecności sygnałów charakterystycznych dla protonów H-2 ($\delta \approx 5,4$ ppm, dd) i H₂-3 ($\delta \approx 3,0$ ppm, dd i $\delta \approx 2,8$ ppm, dd) połączeń z omawianej grupy (Iwase i wsp., 2001; Ogawa i wsp., 2001). Dalsza analiza uzyskanych danych spektralnych wykazała, że połączenie **8** jest w rzeczywistości dihydrochalkonem, tj. 3',5'-di-C- β -glukozydem floretyny. Wskazywały na to sygnały pochodzące od grup metylenowych przy δ 3,28 (m) i 2,78 (t) ppm (rozd. III.2.5.). Wyniki eksperymentów NMR były ponadto zgodne z wykonanymi wcześniej analizami LC-ESI-MS (rozd. II.2.2.2.), wskazującymi na C-glukozydowy charakter opisywanego związku. Stwierdzono również bardzo dobrą zgodność uzyskanych danych NMR z danymi literaturowymi, co pozwoliło na jednoznacznie określenie tożsamości połączenia **8** (Ogawa i wsp., 2001; Sato i wsp., 2006; Slimestad i wsp., 2008; Roowi i Crozier, 2011).

Podsumowując, przeprowadzone w ramach niniejszego projektu badania fitochemiczne przyczyniły się do lepszego rozpoznania, zarówno pod względem jakościowym jak i ilościowym, składu frakcji polifenolowych występujących w roślinach macierzystych oraz kulturach *in vitro* *Cyclopia* sp. W toku doświadczeń opracowano metodę przygotowywania i oczyszczania ekstraktów z biomas *C. subternata*, *C. genistoides* i *C. intermedia*, a także separacji zawartych w nich połączeń polifenolowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją DAD oraz ESI-MS. Przeprowadzone analizy wykazały obecność w powyższych wyciągach bogatego zespołu polifenoli, w tym szeregu połączeń o nieokreślonej do tej pory strukturze.

Niezidentyfikowane składniki zespołu izolowano z użyciem technik łączonych, obejmujących frakcjonowaną ekstrakcję, grawitacyjną chromatografię kolumnową, jak również nowatorski sposób separacji związków polifenoliowych metodą wysokosprawnej, semipreparatywnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem seryjnie połączonych kolumn monolitycznych RP-18. Spośród nowo wydzielonych połączeń, na szczególną uwagę zasługują pochodne benzofenonu, tj. 3-C- β -glukozydy makluryny i iriflofenonu, oraz dihydrochalkon – 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny, których obecność stwierdzono po raz pierwszy w częściach nadziemnych roślin z rodzaju *Cyclopia*. Oprócz wymienionych związków, z biomasy parenchymatycznej *C. subternata* wyizolowano 3 wtórne metabolity o charakterze izoflawonów, nie stwierdzonych uprzednio w surowcu gruntowym, tj. 7-O- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny oraz formononetyny. Dodatkowo, w toku prac preparatywnych

opracowano prostą i wydajną metodę pozyskiwania znacznych ilości izomangiferyny z materiału gruntowego *C. genistoides*.

Wspomniane wyżej protokoły izolacji związków polifenolowych mogą znaleźć zastosowanie w pozyskiwaniu wybranych metabolitów z materiału gruntowego miodokrzewów w celach komercyjnych lub na potrzeby badań naukowych. W odniesieniu do kultur *in vitro* *C. subternata*, izolacja glukozydów izoflawonowych stanowi kompletny etap *downstream* procedury pozyskiwania wspomnianych związków na skalę półtechniczną metodami biotechnologicznymi.

Wyizolowane w toku prac preparatywnych składniki miodokrzewów, a także dostępne komercyjnie substancje referencyjne, zostały wykorzystane w procedurze walidacji zoptymalizowanej metody HPLC, użytej następnie do oznaczeń zawartości badanych związków polifenolowych w biomasach *Cyclopia* sp. otrzymanych na wszystkich etapach eksperymentów biotechnologicznych. W rezultacie, uzyskano wiarygodne narzędzie analityczne służące prowadzeniu jakościowych i ilościowych analiz skryningowych ksantonów i bioflawonoidów w kulturach *in vitro* badanych roślin, a także odpowiadających im roślin gruntowych.

III. Część doświadczalna

III.1. Badania biotechnologiczne

III.1.1. Surowiec do badań

Materiałem służącym do wyprowadzenia kultur *in vitro* były nasiona *Cyclopia intermedia* E. Mey., *Cyclopia subternata* Vogel oraz *Cyclopia genistoides* (L.) Vent., zakupione w firmie Silverhill Seeds (Kapsztad, RPA) w roku 2004. Tożsamość gatunków potwierdzono po skielkowaniu nasion (rozdz. III.1.5), izolacji DNA roślinnego (Genomic Mini AX Plant, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), amplifikacji regionów ITS1 i ITS2 jądrowego rDNA (White i wsp., 1990), oczyszczeniu produktów PCR (Clean Up kit, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) i ich zsekwencjonowaniu (ABI PRISM 3130 Genetic Analyser, Life Technologies, Carlsbad, USA), oraz porównaniu otrzymanych sekwencji z biblioteką danych GenBank. Badania genetyczne wykonano we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Kokotkiewicz i wsp., 2012). Próbkę materiału nasiennego zdeponowano w Ogrodzie Roślin Leczniczych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod numerami AK00-01 (*Cyclopia subternata* semen Vogel), AK00-02 (*Cyclopia genistoides* semen (L.) Vent.) oraz AK00-03 (*Cyclopia intermedia* semen E. Mey.).

III.1.2. Technika badań

Wszystkie prace wymagające sterylności, związane z prowadzeniem kultur *in vitro*, prowadzono w komorze laminarnej z pionowym nawiewem jałowego powietrza (JOUAN MSC12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Podczas badań korzystano z narzędzi metalowych (pincety, skalpele) wyjałowionych suchym gorącym powietrzem (2 h, 180 °C – komora cieplna KBC 100/250, PREMED, Marki, Polska) bądź promieniowaniem podczerwonym (30 s, 800 °C – infrared heat sterilizer, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Jako powierzchnie robocze do prowadzenia prac biotechnologicznych (cięcie tkanek roślinnych, przygotowywanie eksplantatów itp.) wykorzystano sterylne (suche gorące powietrze), szklane szalki Petriego wyłożone papierem (chromatography paper 3, Whatman, Maidstone, UK). Naczynia szklane oraz z tworzyw sztucznych (z wyjątkiem fabrycznie sterylnych, polistyrenowych szalek Petriego, stosowanych na etapie kiełkowania nasion), a także pożywki wzrostowe i roztwory substancji wielkocząsteczkowych (PVP, chitosan), wykorzystywane w czasie prac biotechnologicznych, sterylizowano parą wodną pod ciśnieniem (20 min, 121 °C, nadciśnienie 0,1 MPa – sterylizator ASVE, Spółdzielnia Pracy Mechaników, Warszawa, Polska). Świeże i zliofilizowane biomasy roślinne ważono przy użyciu wagi precyzyjnej (dokładność odczytu 1 mg, model E2000D, Sartorius, Göttingen, Niemcy). Liofilizację biomas *in vitro* prowadzono przy użyciu liofilizatora LYOVAC GT 2 (Finn-Aqua Santasolo-Sohlberg, Tuusula, Finlandia). Odczynniki chemiczne wykorzystywane w

pracach biotechnologicznych ważono przy użyciu wagi precyzyjnej (model E2000D, Sartorius), bądź analitycznej (dokładność odczytu 0,1 mg, model WA 31, Zakłady Mechaniki Precyzyjnej, Gdańsk, Polska), w zależności od wymaganej dokładności.

Jeśli nie zaznaczono inaczej, doświadczenia biotechnologiczne prowadzono w fitotronie, w warunkach ciągłego oświetlenia ($88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lampy jarzeniowe Philips TLD 35W/33, Chalon-sur-Saône, Francja) i temperaturze $24 \pm 1^\circ\text{C}$, określanych dalej „warunkami standardowymi”.

III.1.3. Odczynniki i podłoża doświadczalne

Do sporządzania pożywek doświadczalnych posłużyły odczynniki dedykowane do prowadzenia roślinnych kultur *in vitro* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) oraz woda redestylowana (REL-5, MERA-POLNA, Przemyśl, Polska). W toku doświadczeń, jeśli nie zaznaczono inaczej, wykorzystywano zmodyfikowane podłoża Schenka-Hildebrandta (SH) (Schenk i Hildebrandt, 1972) oraz Murashige’a-Skooga (MS) (Murashige i Skoog, 1962). Jeżeli nie podano inaczej, prace doświadczalne prowadzono z wykorzystaniem pożywek SH i MS o podstawowym składzie przedstawionym w tabeli 18. Wartość pH podłoży ustalano na poziomie 5,6 (pożywki SH) bądź 5,8 (pożywki MS) przed dodaniem agaru (w przypadku podłoży stacjonarnych), za pomocą 1M roztworów HCl i NaOH, prowadząc pomiar przy użyciu pH-metru (model 654, Metrohm, Herisau, Szwajcaria).

Tab. 18. Podstawowy skład pożywek Schenka-Hildebrandta (SH) oraz Murashige’a i Skooga (MS), wykorzystywanych w trakcie prac biotechnologicznych.*

Składniki	Stężenie (mg l ⁻¹)	
	SH	MS
<i>Sole mineralne</i>		
NH ₄ NO ₃	500,00	1650,00
KNO ₃	2500,00	1900,00
NaH ₂ PO ₄	300,00	-
CaCl ₂ ·6H ₂ O	300,00	655,00
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,00	10,59
H ₃ BO ₃	5,00	6,20
KI	1,00	0,83
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,10	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,20	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,10	0,25
MnSO ₄ ·5H ₂ O	10,80	24,10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400,00	370,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15,00	27,85
Na ₂ EDTA	20,00	37,25
KH ₂ PO ₄	-	175,00

Tab. 18. Podstawowy skład pożywek Schenka-Hildebrandta (SH) oraz Murashige'a i Skooga (MS), wykorzystywanych w trakcie prac biotechnologicznych – kontynuacja.*

Składniki	Stężenie (mg l ⁻¹)	
	SH	MS
<i>Węglowodany</i>		
sacharoza	30000,00	30000,00
myo-inozytol	500,00	100,00
agar (w przypadku podłoża zestalonych)	6000,00	7000,00
<i>Aminokwasy</i>		
glicyna	-	3,00
<i>Witaminy</i>		
tiamina	5,00	0,10
ryboflawiona	5,00	-
kwas nikotynowy	50,00	0,50
pirydoksyna	-	0,10

* Skład pożywek wg Schenk i Hildebrandt (1972) oraz Murashige i Skoog (1962), nie uwzględnia roślinnych regulatorów wzrostu.

Roztwory termolabilnych regulatorów wzrostu, takich jak 4-CPPU (*N*-(2-chloro-4-pirydylo)-*N'*-fenylomocznik) lub IAA (kwas indolilo-3-octowy) sterylizowano metodą jałowego sączenia (nylonowe sączki strzykawkowe, wielkość porów 0,2 µm – SUN-Sri, Rockwood, USA), a następnie dodawano do uprzednio wyjałowionych termicznie pożywek po ich wstępnym ostudzeniu do temperatury ok. 50 °C.

III.1.4. Pomiary przyrostu namnażanych biomas

III.1.4.1. Wyznaczanie świeżej (FW) i suchej masy (DW) oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi)

W celu wyznaczenia świeżej masy (FW) na poszczególnych etapach kultur *in vitro*, zbierano materiał roślinny, oddzielając go mechanicznie od podłoża agarowego (w przypadku kultur stacjonarnych) lub odsączając od medium doświadczalnego (w przypadku kultur płynnych – przy użyciu sączka ze szkła spiekanego, wielkość porów G2, Chemland, Stargard Szczeciński, Polska) i następnie ważono. Ilość świeżej biomasy (kalusa, zawiesiny lub mikropędów) przeliczano na 1 l podłoża eksperymentalnego.

W celu wyznaczenia suchej masy (DW), zebrany materiał roślinny poddawano liofilizacji (III.1.2.), a następnie ważono i przeliczano ilość suchej biomasy na 1 l podłoża eksperymentalnego.

Współczynniki przyrostu biomas (Gi) wyznaczano stosując formułę wykorzystywaną uprzednio przez Swedlund i Locy (1993):

$$Gi = [(FW_x - FW_0) / FW_0] \cdot 100\%$$

gdzie: **Gi**, współczynnik przyrostu (%); **FW_x**, świeża masa próbki w **x** dniu eksperymentu; **FW₀**, masa *inoculum* (g).

III.1.4.2. Badanie morfologiczne biomas roślinnych

W trakcie eksperymentów biotechnologicznych prowadzono obserwacje makroskopowe hodowanych tkanek oceniając ich barwę, konsystencję oraz ewentualne tendencje do morfogenezy bądź zamierania. Na podstawie dokonanych spostrzeżeń określano żywotność kalusów, zawiesin i mikropędów. Poczynione obserwacje wykorzystano następnie, podobnie jak rezultaty pomiarów przyrostu biomas i analiz fitochemicznych, w dyskusji wyników prowadzonych badań.

III.1.5. Wyprowadzenie kultur *in vitro*

III.1.5.1. Sterylizacja nasion i uzyskanie jałowych siewek

Przeznaczony do kiełkowania materiał nasienny poddano skaryfikacji z użyciem drobnoziarnistego papieru ściernego (P120), odrzucając jednocześnie egzemplarze martwe bądź uszkodzone. Następnie nasiona poszczególnych gatunków myto za pomocą detergentu (1 % *v/v* roztwór płynu Ludwik, INCO-VERITAS, Warszawa, Polska) przez 15 min, po czym płukano bieżącą wodą wodociągową przez kolejne 15 min. Umyte nasiona odtłuszczano 70 % *v/v*, wodnym roztworem etanolu przez 1 min. Po usunięciu alkoholu, materiał nasienny przenoszono do sterylnych fiolek poj. 4 ml wypełnionych w $\frac{3}{4}$ 10 % *v/v*, wodnym roztworem preparatu Domestos (zawartość podchlorynu sodu 4,8 g/100 g preparatu, Unilever Polska, Warszawa, Polska) i umieszczano w pozycji poziomej na wytrząsarce rotacyjnej (INNOVA 2350, New Brunswick Scientific, Enfield, USA; średnica ruchu obrotowego 25,4 mm, 120 obr./min) na okres 30 min. Po zakończeniu sterylizacji usunięto roztwór podchlorynu, a nasiona przemyto trzema porcjami jałowej wody redestylowanej (3 × 5 min) i przeniesiono na sterylne szalki Petriego (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) wyłożone wilgotną (jałowa woda redestylowana) bibułą filtracyjną (typ 3h, Filtrak, Bärenstein, Niemcy). Szalki zabezpieczono folią Parafilm M (Pechiney Plastic, Chicago, USA) i umieszczono w ciemności, w temp. $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (szafa termostatyczna ST1, POL-EKO Aparatura, Wodzisław Śląski, Polska). Po rozpoczęciu kiełkowania, szalki z nasionami przeniesiono do fitotronu i kultywowano w warunkach standardowych. Po upływie 10 dni, kiełki długości 3-5 cm przeznaczono do inicjacji kultur *in vitro* oraz badań genetycznych mających na celu potwierdzenie tożsamości poszczególnych gatunków (rozd. III.1.1.).

III.1.5.2. Kultury inicjalne

Do wyprowadzenia poszczególnych typów kultur *in vitro* wykorzystano 0,5-1,0 cm fragmenty liścieni, hypokotyli oraz korzonków (inicjacja kalusowania), 1-2 węzłowe, szczytowe części kielków długości 0,5-1,0 cm (w przypadku kultur pędowych) oraz 2,0-3,0 cm fragmenty korzonków (dla kultur korzeni odciętych), które umieszczano w szklanych pojemnikach hodowlanych z polipropylenową nakrętką (baby

food culture jars, Sigma-Aldrich), na zestalonych agarem, zmodyfikowanych podłożach SH i MS (25 ml pożywki/słoik), różniących się pod względem zawartości antyoksydantów i roślinnych regulatorów wzrostu (Tab. 19). Biomasy kultywowano w fitotronie w warunkach standardowych (rozdz. III.1.2.) i pasażowano na świeże podłoża o takim samym składzie, w 4-tygodniowych odstępach czasu, usuwając jednocześnie fragmenty tkanek objęte nekrozą. Uzyskane, po 6 miesiącach, kultury inicjalne przeznaczono do dalszych doświadczeń biotechnologicznych.

Tab. 19. Pożywki wzrostowe stosowane na etapie inicjacji kultur *in vitro* *Cyclopia* sp.

Inicjowana kultura	Rodzaj eksplantatu	Pożywka*	Regulatory wzrostu (µM)*	Antyoksydanty (mg l ⁻¹)*
kalus	fragmenty	SH	KN (2,32); 2,4-D (22,72)	-
	liścieni,	SH	KN (2,32); 2,4-D (22,72)	L-cysteina (100)
	hypokotyłu,	SH	KN (2,32); 2,4-D (22,72)	PVP (1000)
	korzonka	MS	KN (2,32); 2,4-D (22,72)	-
	(0,5-1,0 cm)	MS	KN (2,32); 2,4-D (22,72)	L-cysteina (100)
		MS	KN (2,32); 2,4-D (22,72)	PVP (1000)
mikroroślinki	szczytowe części kiełków (0,5-1 cm, 1-2 węzły)	SH	2iP (9,84); TDZ (1,0)	-
		SH	2iP (9,84); TDZ (1,0)	L-cysteina (100)
		SH	2iP (9,84); TDZ (1,0)	PVP (1000)
korzenie odcięte	fragmenty korzonków (2,0-3,0 cm)	SH	-	-
		SH	-	L-cysteina (100)
		SH	-	PVP (1000)
		SH	IBA (4,92)	-
		SH	IBA (4,92)	L-cysteina (100)
		SH	IBA (4,92)	PVP (1000)
		SH	NAA (26,85)	-
		SH	NAA (26,85)	L-cysteina (100)
	SH	NAA (26,85)	PVP (1000)	

* Zastosowane skróty: **SH**, pożywka Schenka-Hildebrandta; **MS**, pożywka Murashige'a-Skooga; **KN**, kinetyna; **2,4-D**, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; **2iP**, (6-γ,γ-dimetyloallilo)-aminopuryna, **TDZ**, tidiazuron; **IBA**, kwas indolilo-3-masłowy; **NAA**, kwas naftylo-1-octowy; **PVP**, poliwinylpirolidon.

III.1.5.3. Uzyskanie stabilnych kultur stacjonarnych *Cyclopia* sp.

W celu opracowania warunków do ciągłego wzrostu kultur *in vitro* *Cyclopia* sp., uzyskane uprzednio biomasy inicjalne umieszczano na zestalonych agarem pożywkach SH i MS (baby food culture jars, Sigma-Aldrich; 25 ml pożywki/słoik) o różnej zawartości regulatorów wzrostu i pozbawionych dodatku antyoksydantów (Tab. 20). Biomasy pasażowano na świeże podłoża, o takim samym składzie, w 4-tygodniowych odstępach czasu, usuwając jednocześnie fragmenty tkanek objęte nekrozą oraz tworzące się liście potworne (w przypadku kultur mikroroślinek). Po 6 kolejnych pasażach, uzyskane kultury stacjonarne oceniono pod względem morfologii oraz wyznaczono ich współczynniki przyrostu (Gi), celem określenia przydatności hodowanych biomas do dalszych eksperymentów biotechnologicznych. Próbkę mikropędów oraz kalusów charakteryzujących się najlepszymi parametrami wzrostowymi poddano liofilizacji i

przeznaczono do analiz fitochemicznych z uwagi na zawartość związków polifenolowych (rozd. III.2.3.).

Tab. 20. Pożywki wzrostowe stosowane na etapie otrzymywania stacjonarnych kultur *in vitro* *Cyclopia* sp.

Rodzaj biomasy	Pożywka*	Regulatory wzrostu (μM)*
kalus	SH	KN (2,32); 2,4-D (22,72)
	SH	KN (2,32); 2,4,5-T (19,57)
	SH	4-CPPU (20,19); 2,4-D (2,27)
	SH	4-CPPU (20,19); 2,4,5-T (1,96)
	MS	KN (2,32); 2,4-D (22,72)
	MS	KN (2,32); 2,4,5-T (19,57)
	MS	4-CPPU (20,19); 2,4-D (2,27)
	MS	4-CPPU (20,19); 2,4,5-T (1,96)
	mikrodroślinki	SH

* Zastosowane skróty: **SH**, pożywka Schenka-Hildebrandta; **MS**, pożywka Murashige'a-Skooga; **KN**, kinetyna, **2,4-D**, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; **2,4,5-T**, kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy; **4-CPPU**, *N*-(2-chloro-4-pirydylo)-*N'*-fenylo-mocznik; **2iP**, (6- γ,γ -dimetyloallilo)-aminopuryna; **TDZ**, tidiazuron.

III.1.6. Kultury parenchymatyczne *Cyclopia subternata*

III.1.6.1. Wpływ czynników fizycznych na wzrost biomasy oraz produkcję związków polifenolowych w hodowli kalusowej *Cyclopia subternata*

W doświadczeniach z zakresu wpływu czynników fizycznych na akumulację związków polifenolowych w biomasach *in vitro* *Cyclopia* sp. wykorzystano stabilny, parenchymatyczny kalus *C. subternata*, rosnący na pożywce MS suplementowanej 20,19 μM 4-CPPU [*N*-(2-chloro-4-pirydylo)-*N'*-fenylo-mocznik] i 1,96 μM 2,4,5-T (kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy) (rozd. III.1.5.3.). Około 1,5-gramowe porcje parenchymatycznej biomasy pobierano w 20 dniu pasażu i umieszczano na stacjonarnej pożywce MS (pojemniki typu baby food culture jars, Sigma-Aldrich; 25 ml pożywki/słoik) o wymienionym powyżej składzie, nazywanej dalej pożywką MS_{STD}.

W celu określenia wpływu oświetlenia (światło ciągłe o spektrum dziennym lub modyfikowanym za pomocą filtrów barwnych, całkowity brak oświetlenia, naświetlanie promieniami ultrafioletowymi) oraz temperatury (obniżona bądź podwyższona w stosunku do warunków standardowych) na wzrost kalusa *C. subternata* i akumulację związków polifenolowych w niniejszej biomacie, naczynia hodowlane inokulowano wg powyższej procedury, a następnie prowadzono doświadczenie wykorzystując modyfikacje warunków eksperymentalnych zestawione w tabeli 21. Biomasy zbierano w 14 i 28 dniu, wyznaczając następnie dla nich wartości współczynników przyrostu (G_i) wg procedury opisaney w rozdz. III.1.4.1. oraz poddając je, po uprzedniej liofilizacji, analizie fitochemicznej pod względem zawartości wybranych polifenoli (rozd. III.2.3.). Próbę odniesienia stanowiła, w tym wypadku, kultura kalusowa

prowadzona przez 14 lub 28 dni w warunkach standardowych (tj. $88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temp. $24 \pm 1^\circ\text{C}$, rozdz. III.1.2.). Uzyskane wyniki (wartości G_i oraz zawartości poszczególnych polifenoli w materiale roślinnym) przedstawiono jako średnie arytmetyczne pochodzące z trzech próbek hodowlanych (3 naczynia hodowlane/modyfikację) \pm odchylenie standardowe (SD). Dodatkowo, w czasie prowadzenia doświadczeń oceniano morfologię kultywowanych biomas wg opisu zamieszczonego w rozdz. III.1.4.2.

Tab. 21. Modyfikacje warunków oświetleniowych oraz temperaturowych zastosowane dla hodowli kalusowej *Cyclopia subternata*.

Kod modyfikacji ¹	Warunki oświetleniowe ²	Temp. ($^\circ\text{C}$) ³	Czas trwania eksperymentu (dni)
ŚB 14d	światło białe	24 ± 1	14
ŚB 28d	światło białe	24 ± 1	28
C 14d	filtr czerwony (106 primary red)	24 ± 1	14
C 28d	filtr czerwony (106 primary red)	24 ± 1	28
N 14d	filtr niebieski (119 dark blue)	24 ± 1	14
N 28d	filtr niebieski (119 dark blue)	24 ± 1	28
Ż 14d	filtr żółty (101 yellow)	24 ± 1	14
Ż 28d	filtr żółty (101 yellow)	24 ± 1	28
CM 14d	całkowita ciemność	24 ± 1	14
CM 28d	całkowita ciemność	24 ± 1	28
UV0 14d	światło białe (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniu 0 (5 min)	24 ± 1	14
UV0 28d	światło białe (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniu 0 (5 min)	24 ± 1	28
UV10 14d	światło białe (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniu 10 (5 min)	24 ± 1	14
UV10 28d	światło białe (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniu 10 (5 min)	24 ± 1	28
UV20 28d	światło białe (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniu 20 (5 min)	24 ± 1	28

Tab. 21. Modyfikacje warunków oświetleniowych oraz temperaturowych zastosowane dla hodowli kalusowej *Cyclopia subternata* – kontynuacja.

Kod modyfikacji ¹	Warunki oświetleniowe ²	Temp. (°C) ³	Czas trwania eksperymentu (dni)
UV0+20 28d	światło białe (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniach 0 (5 min) i 20 (5 min)	24 ± 1	28
N+UV10 28d	filtr niebieski 119 dark blue (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniu 10 (5 min)	24 ± 1	28
N+UV20 28d	filtr niebieski 119 dark blue (oświetlenie ciągłe) + naświetlanie promieniowaniem UVC w dniu 20 (5 min)	24 ± 1	28
CM+OT 14d	całkowita ciemność	13 ± 1	14
CM+OT 28d	całkowita ciemność	13 ± 1	28
CM+OT (14-28) 28d	całkowita ciemność	24 ± 1 (0-14d) 13 ± 1 (14-28d)	28
CM+PT 14d	całkowita ciemność	29 ± 1	14
CM+PT 28d	całkowita ciemność	29 ± 1	28
CM+PT (14-28) 28d	całkowita ciemność	24 ± 1 (0-14d) 29 ± 1 (14-28d)	28

¹ Pogrubionym tekstem zaznaczono modyfikację eksperymentalną stanowiącą kulturę odniesienia.

² W doświadczeniach zastosowano lampy jarzeniowe Philips TLD 35W/33 ($88 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), których spektrum modyfikowano za pomocą foliowych filtrów barwnych (Lee Filters, Andover, Wielka Brytania; oznaczenia filtrów wg Lee Filters); naświetlanie promieniowaniem UVC (lampa TUV 30W/G30 T8, Philips, Amsterdam, Holandia) prowadzono w warunkach aseptycznych (nawiew laminarny) przy otwartych naczyniach hodowlanych, z odległości 15 cm.

³ Wartości podane w nawiasach oznaczają dni eksperymentu, w których zastosowano podaną temperaturę. Doświadczenia w temp. 13 bądź 29 °C prowadzono z użyciem szafy termostatycznej ST1 (POL-EKO Aparatura).

III.1.6.2. Kultury zawieszinowe *Cyclopia subternata*

III.1.6.2.1. Wyprowadzenie hodowli wytrząsanych

Do wyprowadzenia kultur wytrząsanych wykorzystano kalus *C. subternata* rosnący w warunkach standardowych na stacjonarnej pożywce MS_{STD} (rozd. III.1.6.1.). Puszystą biomasę parenchymatyczną, pobraną w 20 dniu pasażu, rozdrabniano mechanicznie, w zlewce o poj. 100 ml, za pomocą szklanego tłuczka. Około 1,25 g porcji jednorodnej biomasy inokulowano następnie do kolb Erlenmeyera poj. 125 ml, zawierających 50,0 ml płynnego podłoża MS_{STD}. Kolby zamykano korkami ze spienionego silikonu (Carl-Roth, Karlsruhe, Niemcy) i umieszczano na wytrząsarce orbitalnej (INNOVA 2350, New Brunswick Scientific; średnica ruchu obrotowego 25,4

mm, 120 obr. min⁻¹, praca ciągła). Opisaną powyżej procedurę stosowano każdorazowo podczas zakładania kultur zawiesinowych *C. subternata*.

III.1.6.2.2. Wzrost biomasy oraz produkcja związków polifenolowych w podstawowej hodowli zawiesinowej *Cyclopia subternata*

W ramach eksperymentu zainokulowano sześćdziesiąt trzy 125 ml kolby Erlenmeyera wg procedury opisanej w podrozdziale III.1.6.2.1., z wykorzystaniem płynnego podłoża MS_{STD} i kultywowano na wytrząsarce rotacyjnej, w warunkach standardowych. Biomasy zbierano w 2-dniowych odstępach czasu (každorazowo po 3 kolby) aż do 40 dnia eksperymentu. Po odsączeniu pożywek (szklany lejek filtracyjny G2, Chemland, Stargard Szczeciński, Polska) i przemyciu wodą redestylowaną, kultury pochodzące z kolejnych dni doświadczenia ważono (wyznaczanie FW i Gi), poddawano liofilizacji, po czym ponownie ważono (wyznaczanie DW). Na podstawie uzyskanych wartości FW, DW i Gi wykreślono dla zawiesiny odpowiednie profile wzrostowe. Zliofilizowane biomasy oraz zebrane podłoża doświadczone, pochodzące z kolejnych dni hodowli, przeznaczono do skryningowych analiz fitochemicznych, w celu wyznaczenia profilu produkcyjnego kultury w zakresie wybranych połączeń polifenolowych. Wszystkie uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne pochodzące z trzech próbek hodowlanych ± SD.

III.1.6.2.3. Wpływ braku oświetlenia na wzrost biomasy oraz produkcję związków polifenolowych w zawieszynie *Cyclopia subternata*

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach całkowitej ciemności, w sposób analogiczny jak eksperyment przedstawiony w rozdz. III.1.6.2.2. Należy jednak zaznaczyć, że w opisywanym przypadku biomasą inokularną był kalus *C. subternata* rosnący na pożywce MS_{STD}, bez dostępu światła, przez okres 3 tygodni (1 cykl wzrostowy).

III.1.6.2.4. Wpływ dokarmiania i elicytacji na wzrost biomasy oraz produkcję polifenoli w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata*

Procedury badawcze przeprowadzono w sposób analogiczny jak eksperyment opisany w rozdziale III.1.6.2., dodatkowo suplementując rosnącą zawieszinę złożonymi substancjami odżywczymi, prekursorem biosyntezy polifenoli lub elicytorami, w 16 dniu doświadczenia. W eksperymentach wykorzystano roztwory pomocnicze:

- hydrolizatu kazeiny (Sigma-Aldrich) – 125,0 mg/50,0 ml wody redestylowanej
- wody kokosowej (Sigma-Aldrich) – gotowy produkt, sterylizowany fabrycznie metodą sączenia wyjąłwiającego
- fenyloalaniny (Sigma-Aldrich) – 125,0 mg/50,0 ml wody redestylowanej

- jasmonianu metylu (Sigma-Aldrich) – 112,5 mg/50,0 ml 96° etanolu
- chitosanu (Sigma-Aldrich) – roztwór elicytora przygotowano wg procedury opisanej uprzednio przez Komaraiah i wsp. (2002). 0,5 g chitosanu z muszli krabów rozpuszczono na gorąco (60 °C) w 1,0 ml lodowatego kwasu octowego (JT Baker, Deventer, Holandia). Po rozcieńczeniu wodą redestylowaną do 100 ml, pH roztworu doprowadzono do wartości 5,8 za pomocą 1M NaOH (POCH, Gliwice, Polska) i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 200 ml.
- zobojętnionego kwasu octowego (roztwór stanowiący próbę kontrolną dla elicytacji chitosanem) – 1,0 ml lodowatego kwasu octowego (JT Baker, Deventer, Holandia) rozcieńczono wodą redestylowaną do 100 ml, doprowadzono pH roztworu do wartości 5,8 za pomocą 1M NaOH (POCH, Gliwice, Polska), a następnie uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 200 ml.

Wymienione powyżej roztwory sterylizowano metodą sączenia wyjaławiającego (hydrolizat kazeiny, fenyloalanina, jasmonian metylu), przy użyciu nylonowych sączków strzykawkowych o wielkości porów 0,2 µm (SUN-Sri, Rockwood, USA), bądź nasyconą parą wodną (chitosan i zobojętniony kwas octowy; 20 min, 121 °C, naciśnienie 0,1 Mpa). W ramach poszczególnych eksperymentów, hodowlę zawiesinową suplementowano:

- 100 mg l⁻¹ hydrolizatu kazeiny (2,0 ml roztworu pomocniczego/kolbkę)
- 5 % (v/v) wody kokosowej (2,5 ml/kolbkę, produkt sterylny)
- 100 mg l⁻¹ fenyloalaniny (2,0 ml roztworu pomocniczego/kolbkę)
- 150 mg l⁻¹ chitosanu (3,0 ml roztworu pomocniczego/kolbkę)
- 100 µM jasmonianu metylu (0,5 ml roztworu pomocniczego/kolbkę)

Próbki biomas zbierano w tryplikatach (36 kolb/eksperyment), w 2-dniowych odstępach czasu, począwszy od 18 dnia eksperymentu do 40 dnia hodowli. Próbę odniesienia dla poszczególnych doświadczeń stanowiła:

- w przypadku dokarmiania hydrolizatem kazeiny, wodą kokosową i fenyloalaniną – kultura prowadzona w standardowych warunkach pełnego oświetlenia
- w przypadku elicytacji za pomocą chitosanu – kultura suplementowana zobojętnionym kwasem octowym, w dniu 16 (3,0 ml roztworu pomocniczego/kolbkę)
- w przypadku elicytacji jasmonianem metylu – hodowla suplementowana 96° etanolem, w dniu 16 (0,5 ml roztworu pomocniczego/kolbkę)

Parametry wzrostowe dla zawiesiny *C. subternata* wyznaczano analogicznie jak w przypadku hodowli podstawowej (III.1.6.2.2.). Zliofilizowane próbki biomas dokarmianych oraz kontrolnych, a także podłoża wzrostowe zebrane w poszczególnych dniach eksperymentu przeznaczono do badań fitochemicznych. Wszystkie uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne pochodzącą z trzech próbek hodowlanych ± SD.

III.1.6.2.5. Wpływ immobilizacji na wzrost biomasy oraz produkcję polifenoli w kulturach zawieszinowych *Cyclopia subternata*

III.1.6.2.5.1. Przygotowanie czynników immobilizujących

Korek

Granulat korkowy (0,5-1,0 mm, CORKPOL, Ożarów Mazowiecki, Polska) przesiano przez sita (VEB Metallweberei, Neustadt/Orla, DDR) zbierając frakcję o wielkości ziaren 0,5-0,063 mm. W celu oczyszczenia surowca z lipofilnych i polarnych substancji balastowych, 50 g granulatu ekstrahowano pod chłodnicą zwrotną kolejno za pomocą eteru naftowego (POCH, Gliwice, Polska; 2 × 500 ml, 2 × 1 h, 50 °C), chloroformu (POCH; 2 × 500 ml, 2 × 1 godz, 60 °C), metanolu (POCH; 2 × 500 ml, 2 × 1 h, 60 °C), oraz wody redestylowanej (12 × 500 ml, 12 × 1 godz, 100 °C). Po zakończeniu ekstrakcji, korek wysuszono w temp. 60 °C przez 2 h, w celu odparowania pozostałości rozpuszczalników organicznych. Przed wykorzystaniem w doświadczeniach biotechnologicznych, korek sterylizowano nasyconą parą wodną (30 min, 121 °C, naciskiienie 0,1 Mpa).

Amberlite™ XAD4

50 g żywicy Amberlite™ XAD4 (Rohm and Haas, Philadelphia, USA) ekstrahowano metanolem (POCH) pod chłodnicą zwrotną, przy użyciu mieszadła magnetycznego wyposażonego w płytę grzewczą (2 × 300 ml, 2 × 1 h 200 obr. min⁻¹, 60°C; mieszadło RT5 power, IKA, Staufen, Niemcy), płukano wodą redestylowaną w celu usunięcia metanolu i polarnych zanieczyszczeń (10 × 300 ml, 10 × 10 min), a następnie wysuszono w temp. 60°C. Przed wykorzystaniem w doświadczeniach biotechnologicznych, żywicę XAD4 sterylizowano nasyconą parą wodną (30 min, 121 °C, naciskiienie 0,1 Mpa).

III.1.6.2.5.2. Przebieg doświadczenia

Doświadczenia przeprowadzono w sposób analogiczny jak eksperyment opisany w rozdziale III.1.6.2.2., z zastosowaniem płynnego podłoża MS_{STD}. Ok. 1,25 g porcje biomasy kalusowej inokulowano do kolb Erlenmeyera pojemności 125 ml, zawierających 50,0 ml pożywki doświadczalnej. Kolby zamykano korkami ze spienionego silikonu (Carl-Roth) i umieszczano na wytrząsarce orbitalnej (INNOVA 2350, New Brunswick Scientific), prowadząc eksperyment w warunkach standardowych. Ok. 0,5-gramowe porcje sterylne go korka bądź żywicy Amberlite™ XAD4 dodawano do kolb w dniu inokulacji lub 16 dnia eksperymentu. Biomasy zbierano w dniach 16 i 26 (w przypadku dodatku środka immobilizującego na początku doświadczenia), bądź jedynie w dniu 26 (w przypadku dodatku korka lub żywicy

Amberlite™ w dniu 16). Doświadczenie przeprowadzono w tryplikatach (3 kolby/dzień; łącznie 9 kolb dla modyfikacji z wykorzystaniem korka i tyle samo dla dodatku żywicy). Po zebraniu kultur wyznaczono parametry FW i DW, uwzględniając dodatek nośników. Zliofilizowane próbki biomas (wraz z czynnikami immobilizującymi) oraz odpowiednie podłoża wzrostowe przeznaczono do badań fitochemicznych na zawartość związków polifenolowych. Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z trzech prób \pm SD.

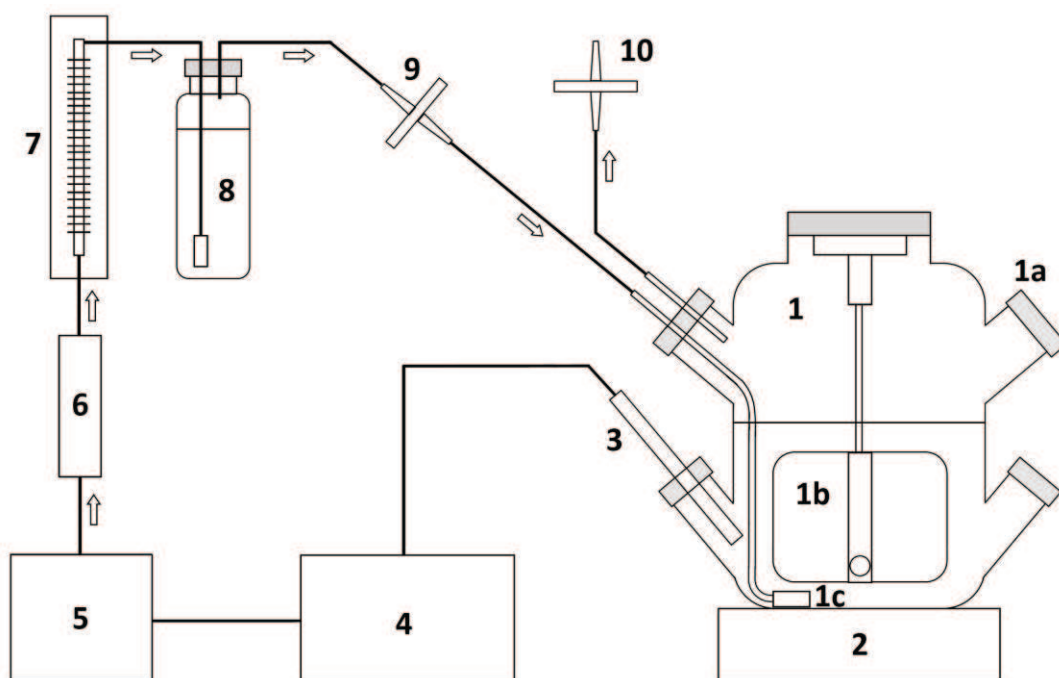
III.1.6.2.6. Wzrost biomasy oraz produkcja związków polifenolowych w hodowli zawieszinowej *Cyclopa subternata* prowadzonej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym

III.1.6.2.6.1. Konstrukcja bioreaktora

W skład systemu bioreaktora mieszająco-napowietrzającego (Ryc. 43) wchodziły:

- szklany zbiornik hodowlany Bio-Probe (Bellco Glass, Vineland, USA; poj. 3 l, wymiary 170 × 300 mm) wyposażony w napędzane magnetycznie mieszadło płytowe (76 × 108 mm)
- mieszadło magnetyczne Biosystem Direct (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- system napowietrzania i kontroli tlenu rozpuszczonego, składający się z elektrody polarograficznej (Cole-Parmer, Vernon Hills, USA), kontrolera stężenia tlenu rozpuszczonego (Cole-Parmer), pompy membranowej Optima (Hagen, Baie-D'Urfé, Kanada), przewodów silikonowych o średnicy wewnętrznej 6 mm (doprowadzenie powietrza do zbiornika hodowlanego) oraz 8 mm (odprowadzenie powietrza) (Labart, Gdańsk, Polska).

Powietrze, pompowane do zbiornika przewodami silikonowymi (Ryc. 43, kierunek przepływu oznaczony strzałkami), przechodziło kolejno przez filtr wstępny z waty szklanej (14 × 87 mm, Bellco Glass), rotometr (Cole-Parmer), płuczkę wodną, filtr wyjąłwiający PTFE (średnica 50 mm, wielkość porów 0,2 μ m; Cole-Parmer), belkotkę umieszczoną przy dnie naczynia (średnica 12 mm, długość 25 mm, spiek G3; Bellco Glass), oraz wyjściowy, identyczny z wejściowym, filtr wyjąłwiający PTFE. Kalibrację kontrolera tlenu rozpuszczonego prowadzono wobec roztworu kalibracyjnego (0 % nasycenia powietrzem; Zero Oxygen Solution, Cole-Parmer, Vernon Hills, USA) oraz nasyconej pożywki (100 % nasycenia powietrzem; podłoże bez dodatku biomasy napowietrzane przez 1 h przy przepływie powietrza 0,2 vvm (objętość powietrza/objętość pożywki/minutę), odpowiadające przepływowi powietrza 0,4 l min⁻¹).



Ryc. 43. Schemat bioreaktora mieszająco-napowietrzającego wykorzystywanego do prowadzenia hodowli zawiesinowych *Cyclopija subternata*:

1, naczynie hodowlane; 1a, port inokulacyjny; 1b, mieszadło płytowe; 1c, bełkotka; 2, mieszadło magnetyczne; 3, elektroda tlenowa; 4, moduł kontroli stężenia tlenu rozpuszczonego; 5, pompa membranowa; 6, filtr wstępny; 7, rotametr; 8, płuczka wodna; 9, 10, filtry wyjaławiające; strzałkami oznaczono kierunek przepływu powietrza w przewodach silikonowych.

III.1.6.2.6.2. Przebieg eksperymentu

Biomasę parenchymatyczną *C. subternata*, przeznaczoną do zainokulowania bioreaktora, przygotowywano wg procedury opisanej w podrozdziale III.1.6.2.1. Odważony materiał roślinny (50,0 g) zawieszano w 200 ml płynnego podłoża MS_{STD} (III.1.6.1.), przenoszono do bioreaktora poprzez port inokulacyjny, w warunkach aseptycznych (nawiew laminarny), i uzupełniano pożywką do 2000 ml (objętość robocza). Stosunek ilości biomasy do objętości pożywki, w opisywanym eksperymencie, był identyczny jak w przypadku kultur zawiesinowych wytrząsanych (1:40). Doświadczenie prowadzono przy prędkości mieszadła wynoszącej 40 obr. min⁻¹, przepływie powietrza 0,2 vvm oraz napowietrzeniu pożywki na poziomie 50% (co odpowiada ok. 10% nasyceniu tlenem). Eksperyment wykonano w warunkach standardowych (rozdz. III.1.2.). W doświadczeniu wykorzystano model hodowli okresowej (*batch culture*), tj. całość pożywki umieszczano w naczyniu hodowlanym na początku eksperymentu. Biomasy oraz próbki pożywek zbierano w 4-dniowych odstępach czasu aż do 32 dniadoświadczenia, a także w dniu 40-tym, rozładowując każdorazowo bioreaktor. Parametry wzrostowe (FW, DW i Gi) oraz profil produkcyjny zawiesiny wyznaczano analogicznie jak w przypadku kultur wytrząsanych (III.1.6.2.2.). Eksperyment powtórzono dwukrotnie, a uzyskane wyniki są średnimi arytmetycznymi z 2 prób ± SD.

III.1.6.2.6.3. Wpływ dokarmiania i warunków hodowli na wzrost biomasy i produkcję związków polifenolowych w kulturach zawiesinowych *Cyclopia subternata* prowadzonych w bioreaktorze

Doświadczenie przeprowadzono w sposób analogiczny do opisanego powyżej, przy czym pożywkę wzrostową suplementowano 0,1% v/v (2,0 ml/bioreaktor) silikonowego środka przeciwpiennego SE-15 (Sigma-Aldrich), dodawanego do podłoża przed autoklawowaniem. Dodatkowo, podłoże suplementowano 5 % v/v wody kokosowej (100 ml/bioreaktor) w 16 dniu hodowli (kultura okresowo-dolewowa, *fed-batch*). Eksperyment prowadzono w warunkach całkowitej ciemności, zbierając biomasy i pożywki w 16, 20, 24, 28 i 32 dniu kultury. Doświadczenie powtórzono dwukrotnie, a uzyskane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 2 prób \pm SD.

III.1.7. Kultury pędowe *Cyclopia genistoides*

III.1.7.1. Mikrorozmnażanie *Cyclopia genistoides*

III.1.7.1.1. Multiplikacja mikropędów

W celu określenia wpływu roślinnych regulatorów wzrostu na indukcję mikrooślinek, eksplantaty składające się z 3 mikropędów (ok. 5,0-10,0 mm długości), nazywane dalej „pośrednimi”, pobierano z podstawowej kultury pędowej *C. genistoides* (rozdz. III.1.5.3.) w 30 dniu cyklu wzrostowego. Umieszczano je następnie na zmodyfikowanych, stacjonarnych podłożach Schenka-Hildebrandta (6 eksplantatów/słoik typu baby food jar /Sigma-Aldrich/; 3 pojemniki/modyfikację – łącznie 18 eksplantatów), różniących się pod względem zawartości roślinnych regulatorów wzrostu (Tab. 22). Eksperyment prowadzono w fitotronie w warunkach standardowych (III.1.2.). Po okresie 30 dni zbierano tkanki, oceniano ich morfologię oraz określano ilość i średnią długość tworzących się mikropędów. Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z 18 prób \pm SD.

III.1.7.1.2. Wydłużanie pędów

W celu wydłużenia pędów, eksplantaty złożone z 3 mikropędów (ok. 5,0-10,0 mm długości) pobierano z kultury mikrooślinek prowadzonej na podłożu M1 (Tab. 22), w 30 dniu cyklu wzrostowego, a następnie umieszczano je na zmodyfikowanych pożywkach SH o składzie przedstawionym w tabeli 23 (6 eksplantatów/naczynie hodowlane Magenta™ /Sigma-Aldrich/; 3 pojemniki/modyfikację – łącznie 18 eksplantatów). Kulturę prowadzono w warunkach standardowych (III.1.2.). Po upływie 30 dni pędy mierzono i przeznaczano do ukorzenia, bądź przenoszono na świeże podłoża o tym samym składzie i kultywowano, w warunkach standardowych, przez kolejne 30 dni (2-etapowa procedura wydłużania). Po upływie 60 dni wyznaczano

średnią długość pędów, a uzyskane eksplantaty poddawano zabiegom ukorzenia. Otrzymane wyniki są średnimi arytmetycznymi z 18 prób \pm SD.

Tab. 22. Modyfikacje pożywki Schenka-Hildebrandta stosowane na etapie indukcji mikropędów *Cyclopia genistoides*.

Kod pożywki	Regulatory wzrostu (μ M)*			
	2iP	BAP	TDZ	IBA
M0	-	-	-	-
M1	9,84	-	1,0	-
M2	9,84	-	2,27	-
M3	9,84	-	4,54	-
M4	9,84	-	-	-
M5	24,6	-	-	-
M6	-	-	1,0	-
M7	-	-	4,54	-
M8	-	8,88	1,0	-
M9	-	8,88	-	-
M10	-	-	-	4,92
M11	-	-	-	14,76
M12	-	-	1,0	4,92
M13	9,84	-	1,0	4,92
M14	9,84	-	1,0	14,76
M15	9,84	-	1,0	24,6

* Zastosowane skróty: **2iP**, (6- γ,γ -dimetyloallilo)-aminopuryna; **BAP**, 6-benzyloaminopuryna; **TDZ**, tidiazuron; **IBA**, kwas indolilo-3-masłowy.

Tab. 23. Modyfikacje pożywki Schenka-Hildebrandta stosowane na etapie wydłużania pędów *Cyclopia genistoides*.

Kod pożywki	Regulatory wzrostu (μ M)*	Zastosowana modyfikacja podłoża*	Czas wydłużania (dni)
M10	IBA (4,92)	-	30
M10	IBA (4,92)	-	60
E1	IBA (4,92)	½S	30
E1	IBA (4,92)	½S	60
E2	IBA (4,92)	½SN	30
E2	IBA (4,92)	½SN	60

* Zastosowane skróty: **IBA**, kwas indolilo-3-masłowy; **½S**, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy; **½SN**, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy oraz azotanów amonu i potasu.

III.1.7.1.3. Ukorzenianie i aklimatyzacja

Do zabiegów ukorzeniania przeznaczono szczytowe części pędów wydłużanych przez 30 (15,0-20,0 mm), bądź 60 dni (40,0-50,0 mm). Eksplantaty umieszczano na zmodyfikowanych pożywkach SH o składzie przedstawionym w tabeli 24 (6 eksplantatów/naczynie hodowlane – łączone/podwójne pojemniki Magenta™ /Sigma-Aldrich/; 3 pojemniki/modyfikację – łącznie 18 eksplantatów). Po upływie 30 dni kultywacji, w warunkach standardowych, określano procent eksplantatów podlegających ryzogenezie. Ukorzenione roślinki przenoszono następnie do doniczek o średnicy 5,0 cm wypełnionych niesterylnym podłożem złożonym z torfu, perlitu (2,0-6,0 mm) i żwiru (1,0-3,0 mm), zmieszanych w proporcjach 1/1/1 (w/w/w), przykrywano je workami z folii polietylenowej i aklimatyzowano przez 30 dni w warunkach szklarniowych. Po okresie 30 dni określano procentową przeżywalność zregenerowanych roślin.

Tab. 24. Modyfikacje pożywki Schenka-Hildebrandta stosowane na etapie ukorzeniania pędów *Cyclopia genistoides*.

Rodzaj eksplantatu	Oznaczenie pożywki	Regulatory wzrostu oraz inne substancje (μM)*	Zastosowana modyfikacja podłoża*
wydłużany	R1	NAA (26,85)	½S
przez 30 dni	R2	NAA (26,85)	½SN
wydłużany	R1	NAA (26,85)	½S
przez 60 dni	R2	NAA (26,85)	½SN
	R3	NAA (26,85), kwas cytrynowy (260,25)	½SN
	R4	IAA (28,54), kwas cytrynowy (260,25)	½SN
	R5	IPA (26,43), kwas cytrynowy (260,25)	½SN

* Zastosowane skróty: **NAA**, kwas naftylo-1-octowy; **IAA**, kwas indolilo-3-octowy; **IPA**, kwas indolilo-3-propionowy; **½S**, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy; **½SN**, zmodyfikowana pożywka SH o zmniejszonej o ½ zawartości sacharozy oraz azotanów amonu i potasu.

III.1.7.1.4. Wpływ morfogenezy na biosyntezę związków polifenolowych

W celu określenia wpływu zróżnicowania histologicznego na zawartość związków polifenolowych w kulturach pędowych *C. genistoides*, wybrane próbki biomas reprezentujące poszczególne etapy mikrorozmnażania i różniące się statusem morfogenicznym poddano liofilizacji i przeznaczono do badań fitochemicznych. Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z pięciu prób \pm SD.

III.1.7.2. Wzrost biomasy oraz produkcja związków polifenolowych w płynnych kulturach pędowych *Cyclopia genistoides*

III.1.7.2.1. Hodowle wytrząsane

Do wyprowadzenia kultur wytrząsanych wykorzystano mikropędy *C. genistoides* rosnące, w warunkach standardowych, na pożywce SH suplementowanej 9,84 μM 2iP i 1,00 μM TDZ (III.1.5.3.). Ok. 2,5-gramowe porcje biomasy pobierano w 30 dniu pasażu, a następnie inokulowano do kolb Erlenmeyera poj. 125 ml, zawierających 50,0 ml płynnego podłoża SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy (15 g l⁻¹) i suplementowanego 4,92 μM IBA (5 kolb/eksperyment). Kolby zamykano korkami ze spienionego silikonu (Carl-Roth) i umieszczano na wytrząsarce orbitalnej INNOVA 2350 (New Brunswick Scientific). Doświadczenie prowadzono, w warunkach standardowych, przez okres 30 dni. Po zakończonym cyklu hodowlanym pędy zbierano, przemywano wodą redestylowaną, i po liofilizacji przeznaczano do badań fitochemicznych.

III.1.7.2.2. Płynne hodowle stacjonarne

Do przeprowadzenia eksperymentu wykorzystano mikropędy *C. genistoides* rosnące, w warunkach standardowych, na pożywce SH suplementowanej 9,84 μM 2iP i 1,00 μM TDZ (podstawowa kultura mikropędowa, rozdz. III.1.5.3.). Ok. 2,5-gramowe porcje biomasy pobierano w 30 dniu pasażu, a następnie wykładano na półprzepuszczalne polipropylenowe tratwy (Liferaft[®] membrane raft, Sigma-Aldrich), umieszczone w pojemnikach Magenta[™] (Sigma-Aldrich) wypełnionych 50,0 ml płynnego podłoża SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy (15 g l⁻¹) i suplementowanego 4,92 μM IBA (3 serie po 15 pojemników). Hodowlę prowadzono w warunkach standardowych przez okres 60 dni, zbierając pędy oraz podłoża wzrostowe w 4-dniowych odstępach czasu (każdorazowo 3 pojemniki). Po wyznaczeniu parametrów wzrostowych FW, DW i Gi, zliofilizowane próbki biomas przeznaczono do badań fitochemicznych. Uzyskane wyniki stanowią średnie arytmetyczne z trzech prob \pm SD.

III.1.7.3. Wzrost biomasy oraz produkcja związków polifenolowych w kulturach pędowych *Cyclopia genistoides* prowadzonych w bioreaktorze okresowo-zalewowym

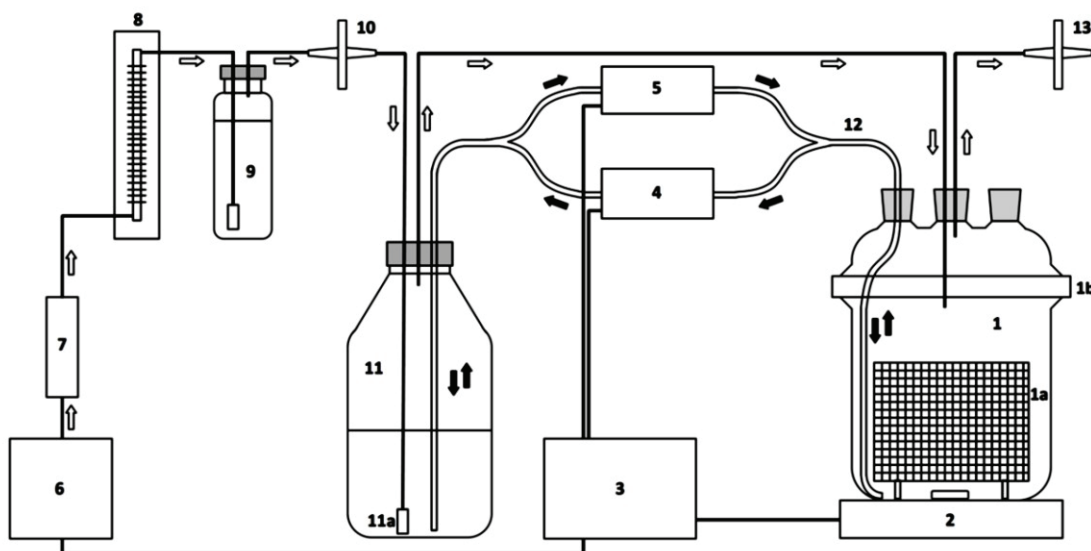
III.1.7.3.1. Konstrukcja bioreaktora

W skład bioreaktora okresowo-zalewowego (Ryc. 44) wchodziły:

- płaskodenny zbiornik hodowlany (Duran Group, Wertheim, Niemcy) o poj. 2 l i wymiarach wewnętrznych 150 × 200 mm. Wewnątrz naczynia umieszczono kosz ze stali nierdzewnej (120 × 100 mm, wielkość oczek 8 × 8 mm, Labart;

odległość od dna naczynia 10 mm), służący do immobilizacji pędów. Do dna zbiornika doprowadzono przewód silikonowy (średnica wewnętrzna 6 mm, Labart), służący do okresowego doprowadzania/odprowadzania pożywki, połączony z rezerwuarem medium wzrostowego.

- rezerwuuar pożywki (butla szklana pojemności 2 l, Duran Group), połączony przewodem silikonowym (\varnothing 6 mm) ze zbiornikiem hodowlanym.
- system napowietrzania, złożony z pompy membranowej Optima (Hagen) pompującej powietrze przewodami silikonowymi (średnica wewnętrzna 6 mm, Labart) kolejno przez: filtr wstępny z waty szklanej (14×87 mm, Bellco Glass), płuczkę wodną, membranowy filtr wyjąławiający PTFE (wielkość porów 0,2 μ m, średnica 50 mm, Cole-Parmer), rezerwuuar pożywki (bełkotka/spiek G3 umieszczony przy dnie butli, Chemland), naczynie hodowlane (tylko ponad powierzchnią cieczy) oraz wyjściowy filtr wyjąławiający. Szybkość napowietrzania wynosiła 0,4 vvm (co odpowiada przepływowi powietrza równemu 0,4 l min⁻¹).
- system przetaczania/mieszania pożywki, złożony z 2 stałobrotowych pomp perystaltycznych Masterflex (wydajność 43 ml/min; Cole-Parmer), przewodów silikonowych (średnica wewnętrzna 6 mm, Labart) łączących rezerwuuar pożywki ze zbiornikiem hodowlanym oraz mieszadła magnetycznego Variomag Mono Direct (prędkość robocza 200 obr. min⁻¹, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), umieszczonego pod zbiornikiem hodowlanym. Praca systemu kontrolowana była przez zespół programatorów czasowych Auraton 100 (LARS, Poznań, Polska).



Ryc. 44. Schemat bioreaktora okresowo-zalewowego wykorzystywanego do prowadzenia kultur pędowych *Cyclopiu genistoides*: 1, naczynie hodowlane; 1a, kosz ze stali nierdzewnej; 1b, kłamra spinająca; 3, moduł kontrolny; 4, 5, pompy perystaltyczne; 6, pompa membranowa; 7, filtr wstępny; 8, rotametr; 9, płuczka wodna; 10, filtr wyjąławiający; 11, rezerwuuar pożywki; 11a, bełkotka; 12, przewód doprowadzający/odprowadzający pożywkę; 13, filtr wyjąławiający; białe strzałki oznaczają kierunek przepływu powietrza a strzałki czarne – kierunek przepływu pożywki.

III.1.7.3.2. Przebieg eksperymentu

Do przeprowadzenia eksperymentu wykorzystano mikropędy *C. genistoides* rosnące w warunkach standardowych, na podłożu SH suplementowanym 9,84 μM 2iP i 1,00 μM TDZ (rozdz. III.1.5.3.). 50,0 g pędów pobierano w 30 dniu pasażu i rozkładano równomiernie w koszu znajdującym się na dnie naczynia hodowlanego (Ryc. 44). Rezerwuar medium doświadczalnego napełniano 1000,0 ml pożywki SH o zmniejszonej o połowę zawartości sacharozy (15 g l⁻¹) i suplementowanej 4,92 μM IBA. 1,5-godzinny cykl pracy bioreaktora przebiegał wg programu:

- 0 min – rozpoczęcie napełniania naczynia hodowlanego pożywką do objętości 300 ml (odpowiada zanurzeniu pędów do wysokości ok. 1,0 cm); włączenie napowietrzania
- 7 min – zakończenie napełniania naczynia hodowlanego pożywką; wyłączenie napowietrzania
- 10 min – włączenie mieszadła magnetycznego
- 40 min – wyłączenie mieszadła magnetycznego
- 45 min – rozpoczęcie wypompowywania pożywki ze zbiornika hodowlanego
- 53 min – zakończenie opróżniania naczynia hodowlanego z pożywki
- 90 min (0 min) – początek nowego cyklu pracy.

Kulturę prowadzono w warunkach standardowych przez okres 32 i 60 dni. Po rozładowaniu bioreaktora, wyznaczano dla biomas współczynniki przyrostu G_i . Zliofilizowane próbki pędów oraz media hodowlane poddano analizie fitochemicznej pod względem zawartości związków polifenolowych. Eksperyment przeprowadzono w duplikacie, a uzyskane wyniki są średnimi arytmetycznymi z dwóch prób \pm SD.

III.2. Badania fitochemiczne

III.2.1. Surowiec do badań

Surowiec do badań fitochemicznych stanowiły:

- zliofilizowane biomasy organowe i parenchymatyczne *in vitro* *C. subternata*, *C. genistoides* i *C. intermedia* pozyskane w toku prac biotechnologicznych (rozdz. III.1.).
- media hodowlane pochodzące z poszczególnych etapów eksperymentów *in vitro* (rozdz. III.1.)
- części nadziemne zregenerowanych roślin *C. genistoides*, uzyskanych na drodze mikrorozmnażania (III.1.7.1.).
- niefermentowane (tzw. „zielona” herbata honeybush i fermentowane części nadziemne roślin gruntowych *C. subternata* Vogel, *C. genistoides* (L.) Vent. i *C. intermedia* E. Mey. (Cape Honeybush Tea, Mossel Bay, RPA, 2008). Próbki poszczególnych roślin zdeponowano w Herbarium Ogrodu Roślin Leczniczych

Katedry i Zakładu Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod numerami:

- AZ₁-01 (niefermentowany surowiec *C. subternata*)
- AZ₂-01 (fermentowany surowiec *C. subternata*)
- AZ₁-02 (niefermentowany surowiec *C. genistoides*)
- AZ₂-02 (fermentowany surowiec *C. genistoides*)
- AZ₁-03 (niefermentowany surowiec *C. intermedia*)
- AZ₂-03 (fermentowany surowiec *C. intermedia*)

III.2.2. Odczynniki

Na poszczególnych etapach badań fitochemicznych korzystano z odczynników pochodzących z wymienionych poniżej źródeł:

- przygotowywanie ekstraktów roślinnych do badań chromatograficznych oraz faz ruchomych do preparatywnej, grawitacyjnej chromatografii kolumnowej – odczynniki organiczne (POCH, Gliwice, Polska) oraz woda redestylowana (redestylator REL 5, POLNA, Przemyśl, Polska).
- semipreparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa – acetonitryl (Merck, Darmstadt, Niemcy) oraz woda redestylowana (redestylator REL 5).
- analizy LC-DAD-ESI/MS – acetonitryl, kwas mrówkowy (JT Baker, Phillipsburg, USA) oraz woda (system DirectQ3, Millipore, Billerica, USA).
- analizy NMR – DMSO-*d*₆ (Deutero, Kastellaun, Niemcy) oraz kwas trifluorooctowy-*d* (Alfa Aesar, Karlsruhe, Niemcy).

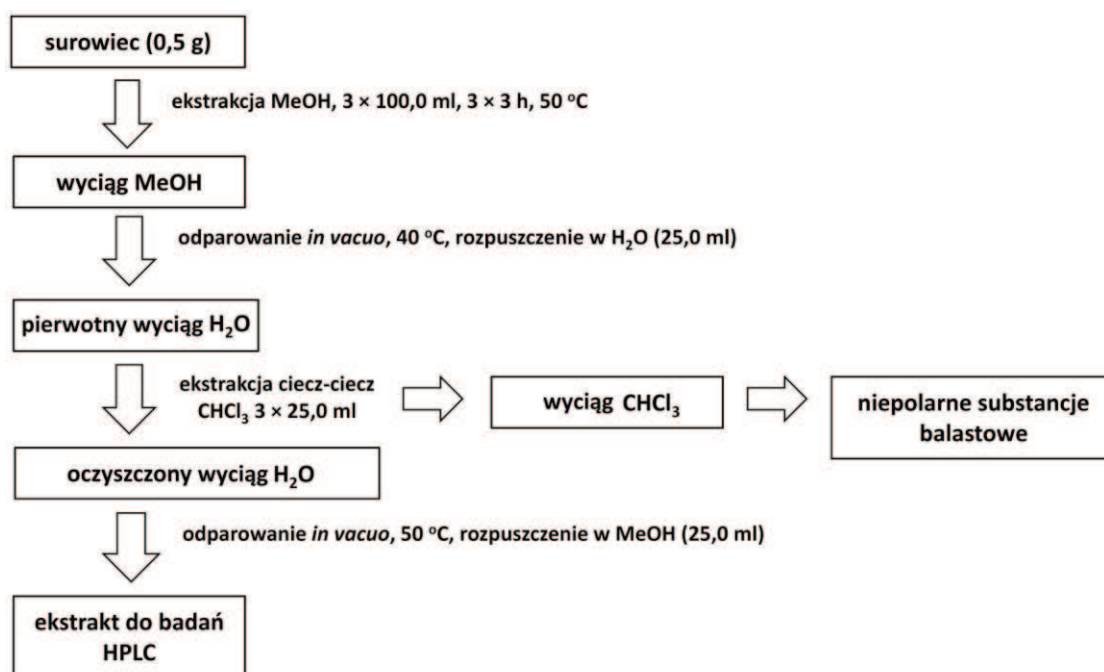
III.2.3. Jakościowe oraz ilościowe analizy chromatograficzne HPLC

III.2.3.1. Przygotowanie próbek do badań

Około 0,5 g dokładnie odważonego, zliofilizowanego i rozdrobnionego (w móżdżerku za pomocą pistla – wielkość fragmentów < 1 mm) materiału roślinnego poddawano wyczerpującej ekstrakcji metanolem, pod chłodnicą zwrotną, z wykorzystaniem wielostanowiskowego mieszadła magnetycznego z płytą grzewczą (3×100 ml MeOH, 3×3 h, 50° C, 200 obr min⁻¹; mieszadło RT5, IKA, Staufen, Niemcy). Po uprzednim przesączeniu przez bibułę filtracyjną (typ 3h, Filtrak), połączone wyciągi metanole odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem (40 °C, wyparka próżniowa Unipan 350, Unipan, Warszawa, Polska). Suchą pozostałość rozpuszczano w wodzie redestylowanej (25 ml). Uzyskany roztwór, nazywany dalej umownie „pierwotnym wyciągiem H₂O”, przenoszono do rozdzielacza i oczyszczano od balastowych substancji lipofilnych metodą ekstrakcji ciecz–ciecz z użyciem chloroformu (3 × 25 ml). Połączone ekstrakty chloroformowe, po stwierdzeniu braku obecności w nich związków polifenolowych (analizy HPLC), wyłączono z dalszych badań. Oczyszczoną

warstwę wodną przenoszono do kolby próżniowej, odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem (40 °C) do syropowatej pozostałości i uzupełniano metanolem do objętości 25 ml. Otrzymane próbki przechowywano w temp. 8 °C do momentu poddania ich analizie chromatograficznej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczej. Przed analizą próbki wirowano (7500 × g, 15 min, wirówka Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Niemcy). Szczegółową procedurę przygotowania ekstraktów do chromatograficznych badań jakościowych i ilościowych przedstawiono na Ryc. 45.

Zebrane w toku doświadczeń biotechnologicznych (rozd. III.1.) próbki płynnych pożywek wzrostowych, przechowywano w temp. -20 °C. Przed przeprowadzeniem analiz, podłoża doprowadzano do temperatury pokojowej, odwirowywano (7500 × g, 15 min, wirówka Universal 320R), a następnie bezpośrednio przeznaczano do oznaczeń chromatograficznych.



Ryc. 45. Schemat przygotowywania wyciągów z biomasy *Cyclopia* sp. do chromatograficznych badań jakościowych i ilościowych.

III.2.3.2. Aparatura

W badaniach chromatograficznych stosowano system LC-DAD-ESI/MS (Shimadzu, Kyoto, Japonia), w skład którego wchodziły:

- autosampler SIL-20AC
- dwie pompy LC-20AD
- degazer DGU-20A3
- piec termostatujący CTO-20AC
- detektor diodowy SPD-M20A
- detektor masowy (ESI) 2010EV
- oprogramowanie LC-MS Solution 3.40

III.2.3.3. Procedury analityczne

III.2.3.3.1. Warunki rozdzielania

Do przeprowadzenia analiz wykorzystano kolumnę Supelcosil LC-18 (150,0 × 4,6 mm; wielkość ziaren 3 μm, Sigma-Aldrich) oraz fazę ruchomą złożoną z:

A – woda : kwas mrówkowy (100,0 : 0,1 v/v)

B – woda : acetonitryl : kwas mrówkowy (50,0 : 50,0 : 0,1 v/v/v)

W analizach zastosowano elucję gradientową wg programu:

0-15 min: 12-25% B; 15-75 min: 25-100% B; 75-77 min: 100% B; 77-80 min: 100-12% B; 82 min: stop.

Rozdzielenia prowadzono w temp. 30 °C, przy przepływie fazy ruchomej wynoszącym 0,6 ml min⁻¹. Objętość nastrzyku wynosiła 3,0 μl.

III.2.3.3.2. Detekcja DAD i ESI-MS

Rejestracja widm DAD (*Diode Array Detection*) prowadzona była w zakresie promieniowania 200-800 nm. Detekcję ESI-MS (*Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*) prowadzono w trybie jonów negatywnych (NI-ESI), przy następujących parametrach:

- napięcie kapilary -2000 V
- napięcie detektora -2000V
- temperatura desolwacji 230 °C
- przepływ gazu nebulizującego 1,5 l/min
- przepływ gazu suszącego 15,0 l/min

Sygnaly rejestrowano w trybie przemiatacia (scan) w zakresie mas *m/z* 50-1800.

III.2.3.3.3. Analizy jakościowe

Identyfikacja poszczególnych składników zespołu polifenolowego w biomasach *Cyclopia* sp. prowadzona była w oparciu o kochromatografię z substancjami wzorcowymi oraz analizę widm DAD i ESI-MS. W trakcie analiz korzystano z metanolowych roztworów wymienionych poniżej substancji referencyjnych:

A) wzorce dostępne komercyjnie:

- mangiferyna (Sigma-Aldrich)
- izomangiferyna (Chengdu Biopurify Phytochemicals, Chengdu, Chiny)
- hesperydyna (Fluka, Buchs, Szwajcaria)
- eriocytryna (Extrasynthese, Genay, Francja)
- narirutyna (Extrasynthese)
- izoroifolina (Extrasynthese)
- ononina /7-*O*-β-glukozyd formononetyny/ (Extrasynthese)
- 7-*O*-β-glukozyd kalikozyny (Phytomarker, Tianjin, Chiny)

- luteolina (Extrasynthese)
- didymina (Extrasynthese)
- florydzyina (Sigma-Aldrich)

B) substancje wyizolowane i zidentyfikowane w toku prac preparatywnych (rozdz. III.2.4.):

- 3-C- β -glukozyd makluryny (części nadziemne *C. genistoides*)
- 3-C- β -glukozyd iriflofenonu (części nadziemne *C. subternata*)
- 3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny (części nadziemne *C. subternata*)
- skolimozyd (części nadziemne *C. subternata*)
- 7-O- β -glukozyd pseudobaptygeniny (kalus *C. subternata*)

III.2.3.3.4. Analizy ilościowe

Zawartości polifenoli w badanych matrycach roślinnych określono, wykorzystując zależność ilościową pomiędzy polem powierzchni pików, odpowiadających poszczególnym związkom i zarejestrowanych z użyciem detektora DAD, przy długości fali 280 nm, a stężeniem analitów w badanej próbce. Dla celów oznaczeń metabolitów, należących do różnych grup związków polifenolowych, sporządzono krzywe kalibracyjne:

- mangiferyny (1,0-2000,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) – oznaczanie zawartości ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna)
- hesperydyny (0,1-2000,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) – oznaczanie zawartości flawanonów (hesperydyna, eriocytryna, narirutyna, didymina, hesperetyna)
- skolimozydu (2,0-225,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) – oznaczanie zawartości flawonów (skolimozyd, izoroifolina, luteolina)
- florydzyiny (0,1-2000,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) – oznaczanie zawartości dihydrochalkonów (3',5'-di-C- β -glukozyd floretyny)
- 3-C- β -glukozydu iriflofenonu (0,5-525,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) – oznaczanie zawartości pochodnych benzofenonu (3-C- β -glukozydy iriflofenonu i makluryny)
- 7-O- β -glukozydu kalikozyny (0,5-525,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) – oznaczanie zawartości izoflawonów (7-O- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny)

Opisaną w niniejszym rozdziale metodę analityczną, wykorzystywaną do prowadzenia oznaczeń ilościowych polifenoli w biomasach *Cyclopia* sp., poddano procedurze walidacji, obejmującej wyznaczenie zakresów liniowości, limitów detekcji (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzji wewnątrz- i międzygrupowej oraz dokładności.

Zakres liniowości oznaczeń, dla poszczególnych związków, określono poprzez przeprowadzenie analiz dla serii 12 rozcieńczeń substancji wzorcowych, w przedstawionych powyżej zakresach stężeń. Dla krzywych kalibracyjnych poszczególnych związków wyznaczono następnie równania regresji (wyrażone jako $y = ax + b$, gdzie: y, pole powierzchni pików; x, stężenie w $\mu\text{g ml}^{-1}$; a, współczynnik kierunkowy prostej; b, wyraz wolny) oraz współczynniki determinacji (R^2).

Limity detekcji i oznaczalności (wyrażone jako ilość ng substancji/nastrzyk) dla badanych połączeń, wyznaczono poprzez wykonanie analiz chromatograficznych rosnących rozcieńczeń poszczególnych związków, przyjmując jako kryterium stosunek wysokości pików zarejestrowanego dla analitu do wysokości szumów (S/N) odpowiednio ≥ 3 dla LOD i ≥ 10 dla LOQ.

Precyzję wewnątrz- i międzygrupową (wyrażoną jako % RSD) określono z użyciem mieszaniny substancji wzorcowych, zawierającej mangiferynę, hesperydynę i florydzynę w stężeniu $500,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, skolimozyd w ilości $225,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ oraz 7-O- β -glukozyd kalikozyny i 3-C- β -glukozyd iriflofenonu w stężeniu $525,0 \mu\text{g ml}^{-1}$. Precyzję wewnątrzgrupową (dokładność nastrzyku) wyznaczono poprzez wykonanie analizy chromatograficznej powyższej mieszaniny 6-krotnie w ciągu 1 dnia oraz porównanie uzyskanych wyników. Precyzję międzygrupową (międzydniową) określono poprzez przeprowadzenie analizy dla 6 przygotowanych w identyczny sposób próbek (rozcieńczeń), w 3 różnych dniach (6 analiz/dzień, łącznie 18 rozdzieleń) oraz zestawienie rezultatów oznaczeń.

Dokładność metody (wyrażoną jako % odzysku) wyznaczono na drodze dodatku określonych ilości substancji referencyjnych do porcji surowca ($n = 5$), o znanej zawartości oznaczanych związków, przed przeprowadzeniem ekstrakcji. Próbkę do badań przygotowano wg protokołu opisanego w rozdz. III.2.3.1., a następnie poddano chromatograficznej analizie ilościowej. Ze względu na niewystarczającą dostępność wzorca skolimozydu, powyższej substancji nie uwzględniono przy określaniu odzysku metody. Zestawienie parametrów walidacyjnych metody przedstawiono w rozdz. II.2.2.3. (Tab. 16).

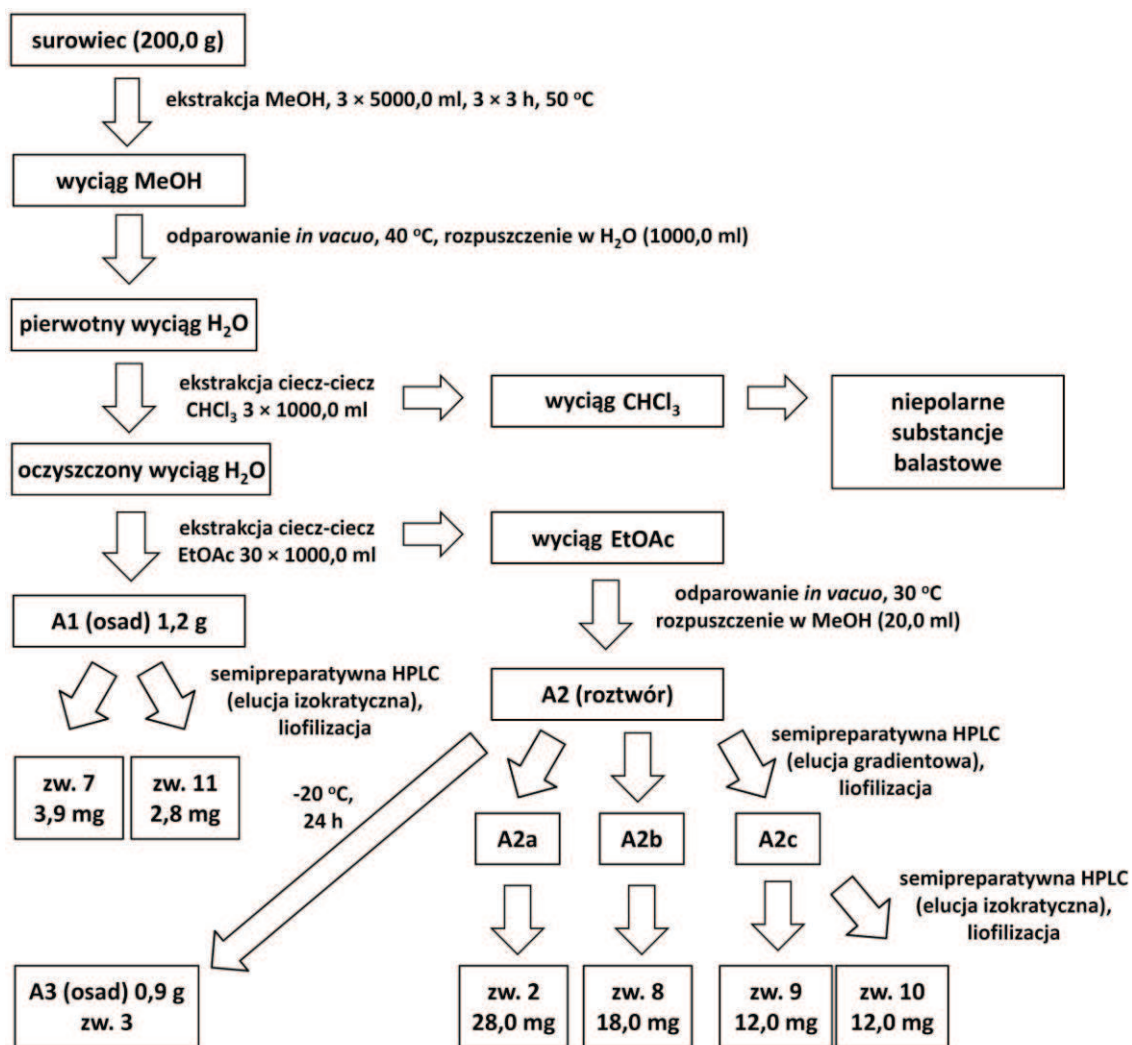
III.2.4. Izolacja wybranych związków polifenolowych z badanych matrycy roślinnych

III.2.4.1. Przygotowanie frakcji polifenolowych do chromatografii preparatywnej

A) C. subternata (roślina gruntowa)

Poszczególne etapy przygotowania frakcji polifenolowych do prac chromatograficznych przedstawiono na Ryc. 46. 200,0 g rozdrobnionego ($< 2,0 \text{ mm}$) materiału roślinnego (nie poddane fermentacji części nadziemne *C. subternata*) ekstrahowano metanolem pod chłodnicą zwrotną przy użyciu mieszadła magnetycznego wyposażonego w płytę grzewczą ($3 \times 5000,0 \text{ ml MeOH}$, $3 \times 3 \text{ h}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 obr min^{-1} ; mieszadło Thermolyne Nuova II, Sigma-Aldrich). Po przesączeniu przez bibułę filtracyjną (typ 3h, Filtrak), połączone wyciągi odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem ($40 \text{ }^\circ\text{C}$, wyparka próżniowa typ 350, Unipan) i rozpuszczono w $1000,0 \text{ ml}$ wody redestylowanej. Roztwór wodny przeniesiono do rozdzielacza i oczyszczono od balastowych substancji lipofilnych metodą frakcjonowanej ekstrakcji ciecz-ciecz przy pomocy chloroformu ($3 \times 1000,0 \text{ ml}$). Wyciągi chloroformowe nie zawierające badanych polifenoli odrzucono, a pozostały chloroform usunięto z frakcji

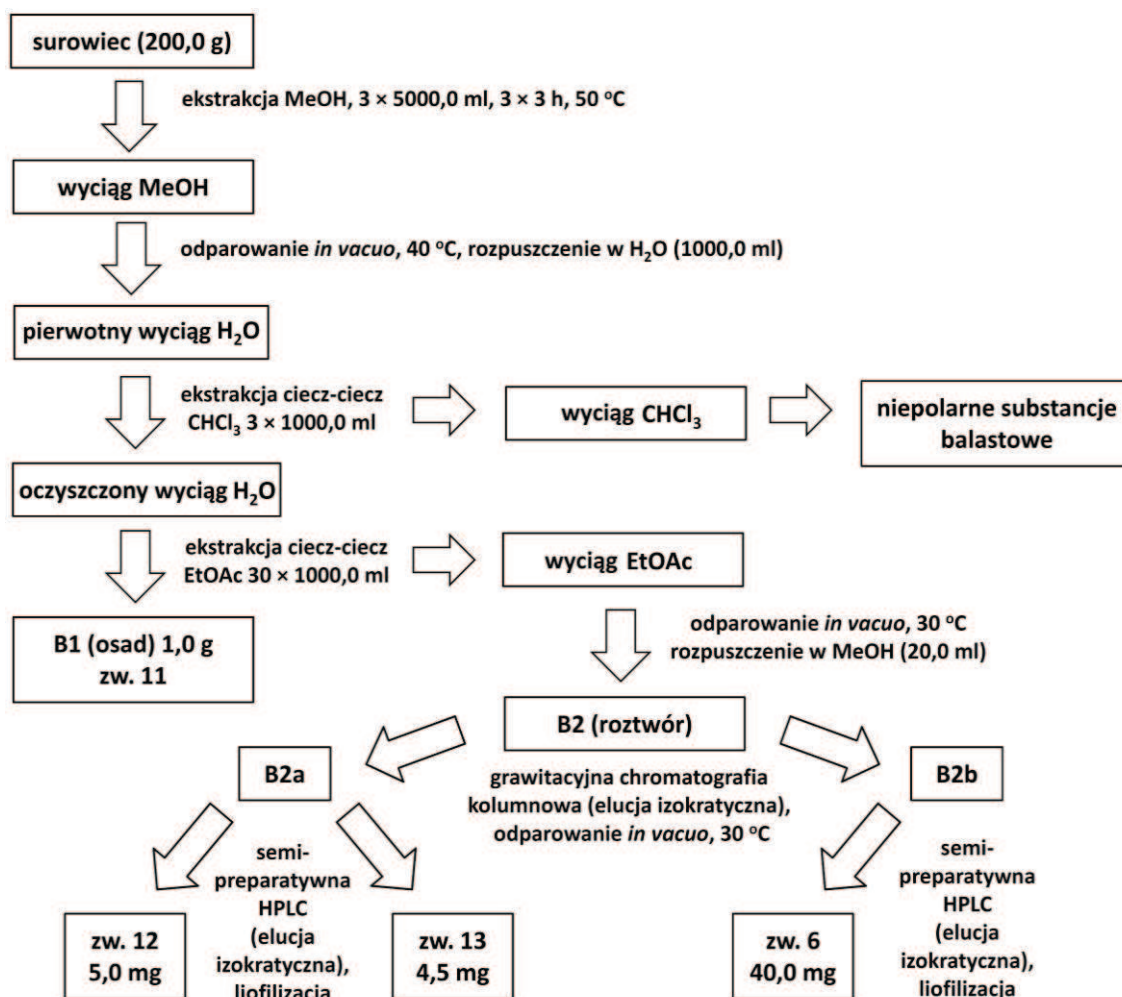
wodnej poprzez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Oczyszczony roztwór wodny ekstrahowano następnie octanem etylu ($30 \times 1000,0$ ml), zbierając jednocześnie wytrącający się w warstwie wodnej osad, który odsączono (bibuła filtracyjna 3h, Filtrak), przepłukano metanolem ($3 \times 20,0$ ml) i wysuszono (frakcja A1, 1,2 g, biały osad). Frakcję A1, zawierającą związki **7** i **11** (analiza skryningowa HPLC – rozdz. III.2.3.3.), przeznaczono do dalszych prac izolacyjnych. Połączone, po odsączeniu osadu A1, frakcje octanowe oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem (30 °C), a uzyskaną suchą pozostałość (13,0 g) rozpuszczono w 20,0 ml metanolu, i po analizie skryningowej HPLC (obecność związków **2**, **8**, **9** i **10**) przeznaczono do dalszych prac fitochemicznych (frakcja A2, czerwono-brunatna ciecz – Ryc. 46). Umieszczenie frakcji A2 w temp. -20 °C na 24 h spowodowało wytrącenie osadu, który po odsączeniu, przemyciu metanolem ($3 \times 20,0$ ml) i wysuszeniu przeznaczono do dalszych badań (frakcja A3, 0,9 g, jasno-żółty osad – Ryc. 46). Analiza HPLC wykazała obecność w niniejszym osadzie tylko jednego połączenia polifenolowego (zw. **3**).



Ryc. 46. Schemat izolacji związków polifenolowych z części nadziemnych rośliny grunтовой *Cyclopia subternata*. Związki: **2**, 3-*C*- β -glukozyd iriflofenonu; **3**, mangiferyna; **7**, skolimozyd; **11**, hesperydyna; **8**, 3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny; **9**, narirutyna; **10**, izoroifolina.

B) *C. subternata* (kalus)

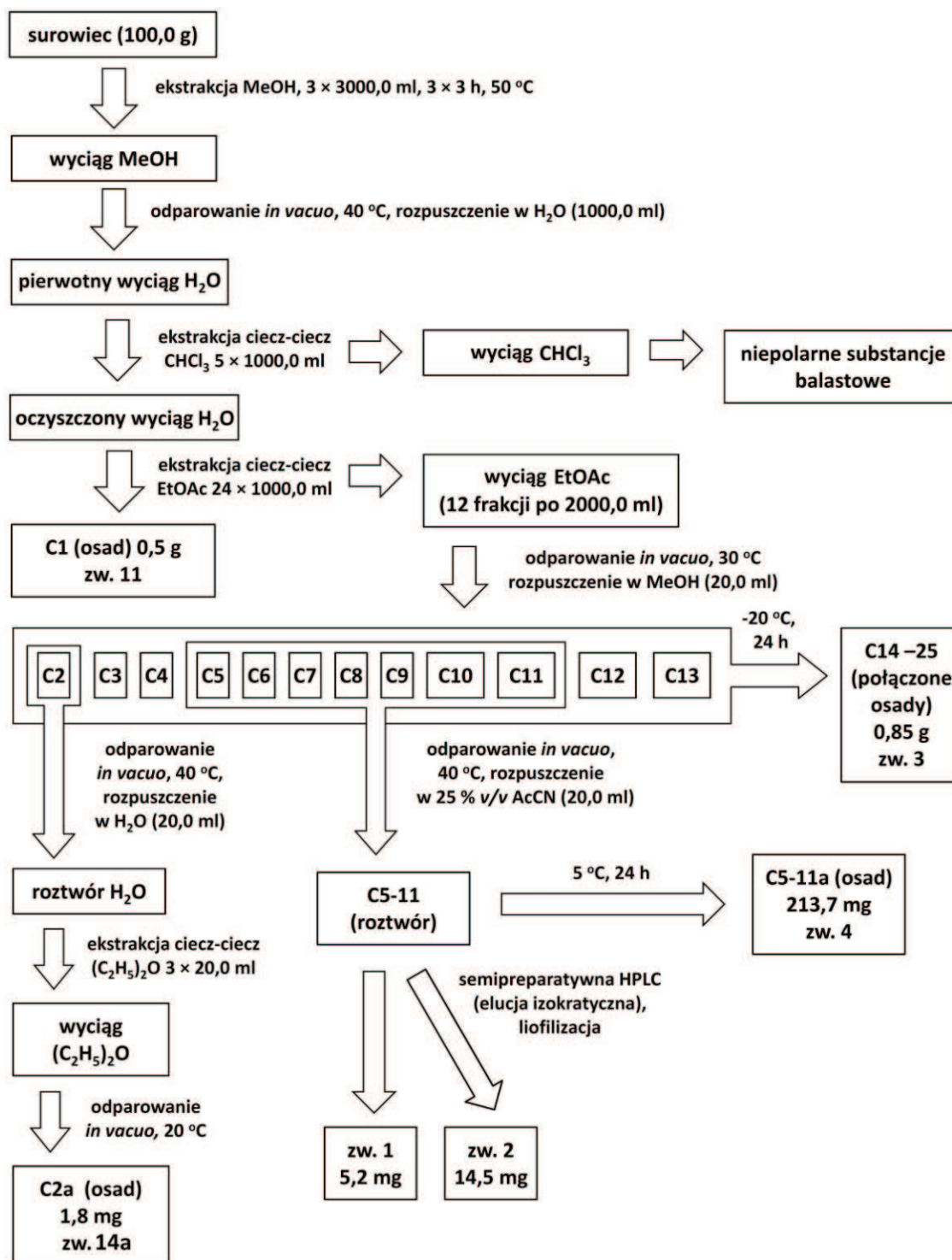
200,0 g zliofilizowanego, rozdrobnionego (< 2,0 mm) kalusa ekstrahowano wg procedury opisanej dla rośliny gruntowej w punkcie A. Suchą pozostałość uzyskaną po odparowaniu octanu etylu (6,0 g), rozpuszczono w 10,0 ml metanolu (frakcja B2, pomarańczowa ciecz – Ryc. 47) i z uwagi na obecność związków **6**, **12** i **13**, przeznaczono do dalszych prac izolacyjnych. Podobnie jak w przypadku rośliny gruntowej, ekstrakcji kolejnymi porcjami octanu etylu towarzyszyło wytrącanie osadu w warstwie wodnej, który po zebraniu, przemyciu metanolem (3 × 20,0 ml) i wysuszeniu (frakcja B1; 1,0 g, biały osad) poddano analizie skryningowej HPLC (obecność jedynie zw. **11**). Poszczególne etapy przygotowania frakcji do prac chromatograficznych przedstawiono szczegółowo na Ryc. 47.



Ryc. 47. Schemat izolacji związków polifenolowych z kalusa *Cyclopia subternata*. Związki: **6**, 7-*O*- β -glukozyd kalikozyny; **11**, hesperydyna; **12**, 7-*O*- β -glukozyd pseudobaptygeniny; **13**, 7-*O*- β -glukozyd formononetyny.

C) *C. genistoides* (roślina gruntowa)

100,0 g rozdrobnionego (< 2,0 mm) materiału roślinnego (nie poddane fermentacji części nadziemne *C. genistoides*) ekstrahowano metanolem pod chłodnicą zwrotną przy użyciu mieszadła magnetycznego wyposażonego w płytę grzewczą (3 × 3000,0 ml, 3 × 3 h, 50 °C, 200 obr min⁻¹; mieszadło Thermolyne Nuova II, Sigma-Aldrich). Po przesączeniu przez bibułę filtracyjną (typ 3h, Filtrak), połączone wyciągi odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem (40 °C, wyparka próżniowa typ 350, Unipan) i rozpuszczono w 1000,0 ml wody redestylowanej. Roztwór wodny przeniesiono do rozdzielacza i oczyszczono od balastowych substancji lipofilnych metodą frakcjonowanej ekstrakcji ciecz-ciecz przy pomocy chloroformu (5 × 1000,0 ml). Wyciągi chloroformowe nie zawierające badanych polifenoli odrzucono, a pozostały chloroform usunięto z frakcji wodnej poprzez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Wyciąg wodny ekstrahowano octanem etylu (24 × 1000,0 ml), zbierając jednocześnie wytrącający się w warstwie wodnej osad, który odsączono, przepłukano metanolem (3 × 20,0 ml) i wysuszono (frakcja C1; 0,5 g, biały osad – Ryc. 48). Analiza HPLC wykazała w powyższej frakcji obecność jedynie związku **11**. Każde z dwóch kolejnych frakcji octanowych (1 i 2, 3 i 4, *etc.* – Ryc. 48) łączono, odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem (30 °C) i rozpuszczano w 20,0 ml metanolu, uzyskując frakcje od C2 do C13 (pomarańczowo-czerwone roztwory). Umieszczenie powyższych frakcji w temp. -20 °C na okres 24 h spowodowało wytrącenie w każdej z nich osadu, który po odsączeniu, przemyciu metanolem (3 × 20,0 ml) i wysuszeniu (frakcje od C14 do C25) poddano analizie HPLC, wykazując w nich obecność pojedynczego związku (**3**). Oddzielną od osadu frakcję C2 (odpowiadającą 2 pierwszym ekstrakcjom za pomocą octanu etylu) odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczono w 20,0 ml wody redestylowanej i ekstrahowano za pomocą eteru dietylowego (3 × 20,0 ml). Połączone frakcje eterowe odparowano do sucha (frakcja C2a), stwierdzając w nich obecność pojedynczego związku (**14a**). Po oddzieleniu od osadów (C14-C25), frakcje C5 do C11 połączono, oddestylowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczono w 20,0 ml 25% (v/v) acetonitrylu i umieszczono w temp. 5 °C na okres 24 h. Powstały w wyniku wspomnianej procedury osad odsączono, przemyto metanolem (3 × 20,0 ml) i wysuszono (frakcja C5-11a – Ryc. 48). Analiza chromatograficzna wykazała w nim obecność pojedynczego polifenolu – zw. **4**. Pozostały roztwór wodno-acetonitrylowy (frakcja C5-11), zawierający związki **1** i **2**, przeznaczono do dalszych prac preparatywnych. Poszczególne etapy przygotowania frakcji do prac chromatograficznych przedstawiono na Ryc. 48.



Ryc. 48. Schemat izolacji związków polifenolowych z części nadziemnych rośliny grunтовой *Cyclopia genistoides*. Związki: 1, 3-*C*-β-glukozyd makluryny; 2, 3-*C*-β-glukozyd iriflofenonu; 3, mangiferyna; 4, izomangiferyna; 14a – luteolina.

III.2.4.2. Aparatura i technika badań

III.2.4.2.1. Semipreparatywna wysokosprawna chromatografia cieczowa

W skład zestawu HPLC wykorzystywanego do prac preparatywnych wchodziły:

- 2 pompy L-7100 (Merck Hitachi, Darmstadt, Niemcy)
- termostat Jetstream 2 Plus (WO Industrial Electronics, Langenzersdorf, Austria)
- detektor UV z interfejsem V7566 (Knauer, Berlin, Niemcy)
- zawór Rheodyne (Cotati, USA).

Separację związków polifenolowych prowadzono z wykorzystaniem dwóch szeregowo połączonych kolumn monolitycznych Chromolith RP-18e 100 × 10 mm (Merck, Darmstadt, Niemcy), wyposażonych w prekolumnę 10 × 4,6 mm tego samego producenta. Prędkość przepływu odpowiedniej fazy ruchomej wynosiła 8,0 ml/min, zaś detekcję związków prowadzono przy długości fali 280 nm. Do rejestracji danych wykorzystano oprogramowanie Eurochrom 2000 (Merck). Szczegółowe informacje dotyczące analiz (typ elucji, temperatura, skład fazy ruchomej i objętość nastrzyku) przedstawiono w rozdz. III.2.4.2.2. poświęconym procedurom izolacji poszczególnych połączeń. Próbkę przeznaczoną do chromatografowania sączone przez nylonowe sączki membranowe (wielkość porów 0,45 μm; SUN-Sri, Rockwood, USA). Zebrane eluaty liofilizowano przy użyciu aparatu LYOVAC GT 2 (Finn-Aqua Santasolo-Sohlberg, Tuusula, Finlandia).

III.2.4.2.2. Analizy jakościowe frakcji i związków pozyskanych w toku prac preparatywnych

Analizy jakościowe HPLC frakcji polifenolowych oraz związków naturalnych wyizolowanych w toku prac preparatywnych z rośliny gruntowej i kalusa *C. subternata* (odpowiednio rozdz. III.2.4.1 *A* i *B*) prowadzono z wykorzystaniem zestawu Shimadzu (rozd. III.2.3.2.) oraz procedury opisanej w rozdz. i III.2.3.3.

W przypadku rośliny gruntowej *C. genistoides* (rozd. III.2.4.1 *C*), analizy skryningowe HPLC frakcji pozyskanych w czasie prac izolacyjnych wykonywano z użyciem opisanego powyżej zestawu Merck-Hitachi, kolumny Discovery[®] HS C18 7,5 cm × 4,6 mm (wielkość ziaren 3 μm; Sigma-Aldrich) oraz elucji gradientowej wg programu przedstawionego w rozdz. III.2.3.2. Detekcję UV prowadzono przy długości fali 280 nm.

III.2.4.3. Procedury izolacji

Związki 3, 4, 7, 11, 14a (frakcje/osady: A1, A3, B1, C1, C14-25, C2a, C5-11a)

Frację A1 (osad zawierający związki **7** i **11** – Ryc. 46) rozpuszczano w 16,5 % v/v wodnym roztworze acetonitrylu (0,05 % w/v), a następnie rozdzielano z wykorzystaniem semipreparatywnej HPLC (elucja izokratyczna, 16,5 % v/v wodny roztwór acetonitrylu, temp. 20 °C, obj. nastrzyku 5000,0 µl). Eluaty zawierające związki **7** i **11** zbierano odpowiednio w 5,0 i 10,0 min. Procedurę powtórzono 30 razy (30 kolejnych nastrzyków). Eluaty odpowiadające poszczególnym połączeniom połączono, uzyskując po liofilizacji 3,9 mg związku **7** i 2,8 mg związku **11**. Frakcje zawierające pojedyncze związki **3** (A3 – Ryc. 46, C14-25 – Ryc. 48), **4** (C5-11a – Ryc. 48), **11** (B1 – Ryc. 47, C1 – Ryc. 48) i **14a** (C2a – Ryc. 48) wyłączono z dalszych procedur preparatywnych i poddano bezpośredniej identyfikacji (wg procedury opisanej w rozdz. III.2.3.3.).

Związki 2, 8, 9, 10 (frakcja/roztwór A2)

Frację A2 (roztwór zawierający związki **2, 8, 9, 10** – Ryc. 46) rozcieńczono 5-krotnie wodą redestylowaną, a następnie rozdzielano metodą semipreparatywnej HPLC (elucja gradientowa: A – woda, B – acetonitryl:woda 50,0:50,0 v/v; program gradientu: 0–15 min, 12–25 % B; 15–75 min, 25–100 % B; temp. 20 °C; obj. nastrzyku 1000,0 µl, odpowiadająca ok. 80 mg suchego ekstraktu), zbierając eluaty odpowiadające kolejno związkowi: **2** (frakcja A2a – 5,0 min), **8** (frakcja A2b – 22,0 min) oraz **9** i **10** (frakcja A2c – 24,0 min). Po 30-krotnym powtórzeniu opisanej procedury (30 kolejnych nastrzyków), eluaty odpowiadające poszczególnym związkom zostały połączone, zliofilizowane, rozpuszczone w 5,0 ml odpowiedniej fazy ruchomej, a następnie poddane ponownej separacji w warunkach izokratycznych: frakcja A2a – 7,5 % v/v wodny roztwór acetonitrylu, eluat odpowiadający związkowi **6** zebrany w 5,0 min, temp. 25 °C, obj. nastrzyku 400,0 µl (procedura powtórzona 12×); frakcja A2b – 15,0 % v/v wodny roztwór acetonitrylu, eluat odpowiadający związkowi **8** zebrany po czasie 6,5 min, temp. 20 °C, obj. nastrzyku 400,0 µl (procedura powtórzona 12×); frakcja A2c – 15,0 % v/v wodny roztwór acetonitrylu, eluaty zawierające związki **9** i **10** zebrane odpowiednio po czasie 10,5 i 11,5 min, temp. 20 °C, obj. nastrzyku 200 µl (procedura powtórzona 25×). Frakcje zawierające identyczne związki połączono i poddano liofilizacji, uzyskując 28,0 mg związku **2**, 18,0 mg związku **8**, 12,0 mg związku **9** i 11,0 mg związku **10** (Ryc. 46).

Związki 6, 12, 13 (frakcja/roztwór B2)

Frację B2 (roztwór zawierający związki **6, 12** i **13** – Ryc. 47) rozdzielano wstępnie za pomocą grawitacyjnej chromatografii kolumnowej w normalnym układzie

faz (kolumna $9,0 \times 3,5$ cm; wypełnienie Silica gel 60 – 46,0 g, wielkość ziaren 0,075-0,150 mm, Macherey-Nagel, Düren, Niemcy), z wykorzystaniem elucji izokratycznej (faza ruchoma – chloroform:metanol 95:5 v/v). 1,0 ml frakcji B1 nanoszono w postaci zawiesiny na szczyt kolumny po uprzednim zmieszaniu z 19,0 ml chloroformu. Elucję prowadzono z prędkością 10 ml min^{-1} , zbierając eluaty objętości 100,0 ml (1-30). W celu uzyskania związków w ilości niezbędnej do przeprowadzenia badań strukturalnych, opisaną procedurę chromatograficzną powtórzono 10-krotnie (10 kolumnienek). Po zagęszczeniu otrzymanych frakcji i przeprowadzeniu analiz jakościowych HPLC, eluaty 9-13, jak również 15-30 połączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), uzyskując odpowiednio frakcję B2a (związki **12** i **13**) i B2b (związek **6**). Wymienione frakcje rozpuszczono w 30,0 ml odpowiedniej fazy ruchomej, a następnie rozdzielano techniką semipreparatywnej HPLC w warunkach izokratycznych: frakcja B2a – 16,5 % v/v wodny roztwór acetonitrylu, eluaty odpowiadające związkom **12** i **13** zebrane odpowiednio po upływie 13,0 i 15,5 min, temp. $20 \text{ }^\circ\text{C}$, obj. nastrzyku $2000 \text{ }\mu\text{l}$ (procedura powtórzona 15×); frakcja B2b – 10,0 % v/v wodny roztwór acetonitrylu, eluat odpowiadający związkowi **6** zebrany w 20,0 min, temp. $30 \text{ }^\circ\text{C}$, obj. nastrzyku $1000 \text{ }\mu\text{l}$ (procedura powtórzona 30×). Uzyskane frakcje poddano liofilizacji, otrzymując 40,0 mg związku **6**, 5,0 mg związku **12** i 4,5 mg związku **13** (Ryc. 47).

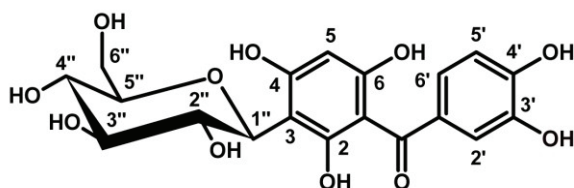
Związki 1, 2 (frakcja/roztwór C5-11)

Frakcję C5-11 (rozpuszczoną w 25 % v/v wodnym roztworze acetonitrylu i zawierającą związki **1** oraz **2** – Ryc. 48) rozdzielano techniką semipreparatywnej HPLC (elucja izokratyczna, 8,0 % wodny roztwór acetonitrylu, temp. $20 \text{ }^\circ\text{C}$, obj. nastrzyku $100 \text{ }\mu\text{l}$). Eluaty odpowiadające związkom **1** i **2** zbierano odpowiednio w 3,0 i 6,0 min. Procedurę powtórzono 30 razy, uzyskując po liofilizacji 5,2 mg związku **1** i 14,5 mg związku **2** (Ryc. 48).

III.2.5. Identyfikacja związków

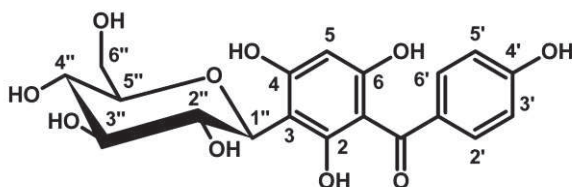
Połączenia polifenolowe wchodzące w skład materiału gruntowego oraz biomas *in vitro* miodokrzewów zidentyfikowano w oparciu o kochromatografię z substancjami referencyjnymi oraz analizę widm LC-DAD i LC-ESI-MS wg procedur opisanych w rozdz. III.2.3.3. Dodatkowo, nowo wyizolowane związki zidentyfikowano za pomocą jedno- (^1H i ^{13}C) i dwuwymiarowych (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^1H DQF-COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C gHSQC oraz ^1H - ^{13}C gHMBC) eksperymentów NMR, przeprowadzonych z użyciem spektrometru Varian Unity Plus 500 MHz (Varian, Palo Alto, USA). Widma ^1H i ^{13}C NMR zarejestrowano przy częstotliwościach wynoszących odpowiednio 500 i 125 MHz. Próbkę rozpuszczano w DMSO- d_6 , albo 10% (v/v) roztworze kwasu trifluorooctowego- d w DMSO- d_6 . Przesunięcia chemiczne w widmach ^1H i ^{13}C NMR odnoszono do sygnału resztkowego rozpuszczalnika (odpowiednio 2,5 i 39,5 ppm). Dane spektralne poszczególnych połączeń przedstawiono poniżej:

Związek 1: 3-C- β -glukozyd makluryny (3-C- β -glukozyd 2,3',4,4',6-pentahydroksybenzofenonu) (Ryc. 49). Biały, bezpostaciowy proszek (MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} nm: 231, 317; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 10,3 min, m/z : 423 [M-H]⁻, 847 [2M-H]⁻, 303 [M-H-120]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,62, 9,43, 9,41, 9,19, 9,0 (5 \times 1H, 5 \times bs, sygnały grup fenolowych), 7,14 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-2'), 7,05 (1H, dd, J = 8,5, 2,0 Hz, H-6'), 6,72 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-5'), 5,93 (1H, s, H-5), 4,94 (1H, bs, OH-3''), 4,87 (1H, bs, OH-4''), 4,58 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-1''), 4,59 (1H, t, J = 5,7 Hz, OH-6''), 3,60 (1H, m, H-6a''), 3,53 (1H, m, H-2''), 3,51 (1H, m, H-6b''), 3,20 (3H, m, H-3'', 4'', 5'').



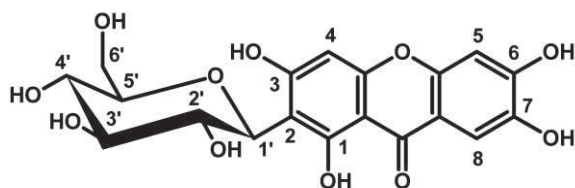
Ryc. 49. Struktura 3-C- β -glukozydu makluryny (zw. 1).

Związek 2: 3-C- β -glukozyd iriflofenonu (3-C- β -glukozyd 2,4,4',6-tetrahydroksybenzofenonu) (Ryc. 50). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 294; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 15,3 min, m/z : 407 [M-H]⁻, 287 [M-H-120]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10,19 (1H, s, H-4'a), 9,57 (1H, s, H-6a), 9,52 (1H, s, H-4a), 9,33 (1H, bs, H-2a), 7,56 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2', H-6'), 6,78 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-3', H-5'), 5,95 (1H, s, H-5), 4,92 (1H, d, J = 3,0 Hz, OH-3''), 4,88 (1H, d, J = 3,0 Hz, OH-4''), 4,59 (1H, t, J = 5,7 Hz, OH-6''), 4,59 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-1''), 3,62 (1H, m, H-6a''), 3,57 (1H, m, H-2''), 3,48 (1H, m, H-6b''), 3,20 (3H, m, H-3'', 4'', 5''); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 194,6 (-CO-), 161,4 (C-4'), 159,0 (C-4), 157,4 (C-2), 156,7 (C-6), 131,5 (C-2', 6'), 130,7 (C-1'), 114,6 (C-3', 5'), 107,0 (C-1), 103,7 (C-3), 94,8 (C-5), 81,1 (C-5''), 78,3 (C-3''), 74,7 (C-1''), 71,8 (C-2''), 69,6 (C-4''), 60,5 (C-6'').



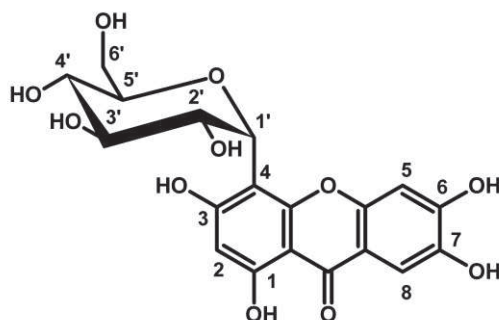
Ryc. 50. Struktura 3-C- β -glukozydu iriflofenonu (zw. 2).

Związek 3: Mangiferyna [(2-(β -D-glukopiranozylo)-1,3,6,7-tetrahydroksy-9H-ksanten-9-on)] (Ryc. 51). Jasnożółty, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 239, 257, 317, 365; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 22,5 min, m/z : 421 [M-H]⁻, 331 [M-H-90]⁻, 301 [M-H-120]⁻.



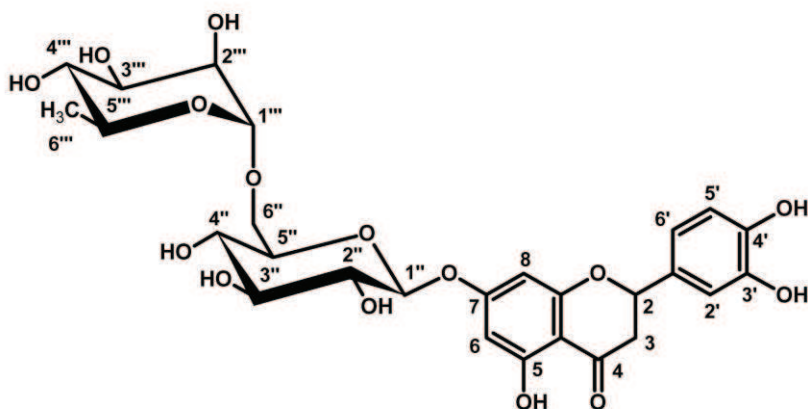
Ryc. 51. Struktura mangiferyny (zw. 3).

Związek 4: *Izomangiferyna* [(4-(β-D-glukopiranozylo)-1,3,6,7-tetrahydroksy-9H-ksanten-9-on] (Ryc. 52). Jasnożółty, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 240, 256, 316, 358; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 23,0 min, m/z : 421 [M-H]⁻, 843 [2M-H]⁻, 331 [M-H-90]⁻, 301 [M-H-120]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 80°C) δ (ppm): 13,30* (1H, s, 1-OH), 10,90* (1H, s, 3-OH), 10,70* (1H, s, 6-OH), 9,80* (1H, s, 7-OH), 7,40 (1H, s, H-8), 6,86 (1H, s, H-5), 6,23 (1H, s, H-2), 4,79 (1H, d, $J = 9,8$ Hz, H-1'), 3,98 (1H, t, $J = 9,8$ Hz, H-2'), 3,73 (1H, d, $J = 11,5$ Hz, H-6a'), 3,50 (1H, dd, $J = 11,5, 4,2$ Hz, H-6b'), 3,31 (3H, m, H-3', 4', 5'); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, przesunięcia chemiczne na podstawie widma ghsqc) δ (ppm): 107,5 (C-8), 102,5 (C-5), 97,0 (C-2), 81,0 (C-5'), 78,5 (C-3'), 73,0 (C-1'), 71,0 (C-2'), 70,5 (C-4'), 61,0 (C-6'); * eksperyment przeprowadzony w temperaturze pokojowej.



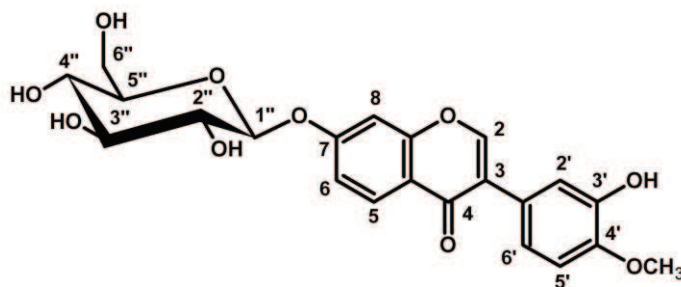
Ryc. 52. Struktura izomangiferyny (zw. 4).

Związek 5: *Eriocytryna* (7-O-rutynozyd eriodykjolu, 7-O-rutynozyd 3',4',5,7-tetrahydroksyflawanonu) (Ryc. 53). Białe, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 282, 325 ; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 28,7 min, m/z : 595 [M-H]⁻, 287 [M-rutynoza-H]⁻.



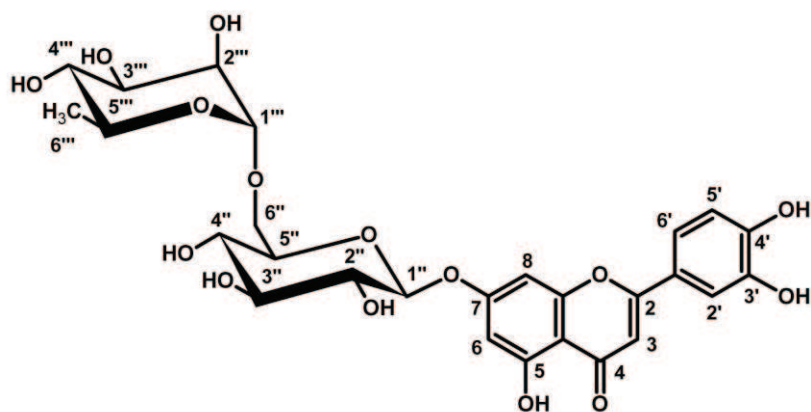
Ryc. 53. Struktura eriocytryny (zw. 5).

Związek 6: 7-*O*- β -glukozyd kalikozyzny (7-*O*- β -glukozyd 3',7-dihydroksy-4'-metoksyizoflawonu) (Ryc. 54). Jasnożółty, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 248, 258, 284sh; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 29,0 min, *m/z*: 491 [M+HCOO]⁻, 283 [M-glukoza-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9,05 (1H, s, H-3'a), 8,40 (1H, s, H-2), 8,05 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H-5), 7,23 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-8), 7,14 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, 2,2 Hz, H-6), 7,07 (1H, s, H-2'), 6,97 (1H, s, H-5', 6'), 5,11 (1H, d, *J* = 7,3 Hz, H-1''), 3,80 (3H, s, OCH₃), 3,71 (1H, m, H-6''), 3,46 (2H, m, H-5'', 6''), 3,31 (2H, m, H-2'', 3''), 3,17 (1H, bt, *J* = 7,9 Hz, H-4''); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, przesunięcia chemiczne na podstawie widm ghmbc i ghsqc) δ (ppm): 174,5 (C-4), 161,5 (C-7), 157,0 (C-9), 154,0 (C-2), 147,5 (C-3'), 146,0 (C-5'), 127,0 (C-5), 124,5 (C-1'), 123,5 (C-3), 120,0 (C-4'), 118,5 (C-10), 116,5 (C-2'), 115,5 (C-6), 103,5 (C-8), 100,0 (C-1''), 77,0 (C-5''), 76,5 (C-2''), 73,0 (C-3''), 69,5 (C-4''), 60,5 (C-6''), 55,5 (OCH₃).



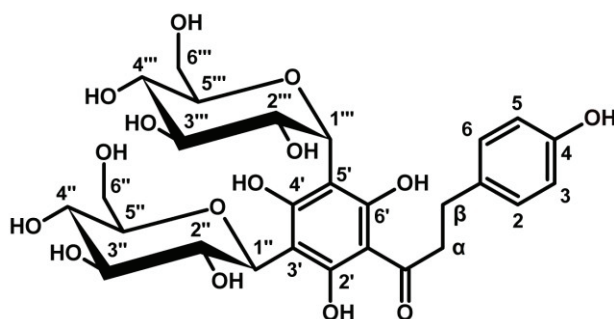
Ryc. 54. Struktura 7-*O*- β -glukozydu kalikozyzny (zw. 6).

Związek 7: Skolimozyd (7-*O*-rutynozyd luteoliny, 7-*O*-rutynozyd 3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu) (Ryc. 55). Żółty, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 253, 265, 347; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 30,3 min, *m/z*: 593 [M-H]⁻, 285 [M-rutynoza-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, 10% *v/v* kwas trifluorooctowy-*d* w DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,41 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-2'), 7,42 (1H, dd, *J* = 8,3, 2,5 Hz, H-6'), 6,91 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H-5'), 6,73 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 6,73 (1H, s, H-3), 6,45 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 5,07 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-1''), 4,55 (1H, s, H-1'''), 3,84 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-6a''), 3,47 (m, H-3'''), 3,45 (m, H-6b''), 3,41 (1H, q, *J* = 6,3 Hz, H-5'''), 3,31 (1H, t, *J* = 8,7 Hz, H-3''), 3,27 (1H, dd, *J* = 7,5, 8,7 Hz, H-2''), 3,17 (1H, t, *J* = 8,7 Hz, H-4''), 3,15 (1H, t, *J* = 9,4 Hz, H-4'''), 1,07 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, H-6'''); ¹³C NMR (125 MHz, 10% *v/v* kwas trifluorooctowy-*d* w DMSO-*d*₆, przesunięcia chemiczne na podstawie widm ghmbc i ghsqc) δ (ppm): 183,0 (C-4), 165,5 (C-2), 164,0 (C-7), 162,0 (C-5), 157,0 (C-9), 150,0 (C-4'), 146,0 (C-3'), 122,0 (C-1'), 119,5 (C-6'), 116,5 (C-5'), 114,0 (C-2'), 106,0 (C-10), 103,5 (C-3), 102,0 (C-1'''), 101,0 (C-1''), 100,0 (C-6), 95,5 (C-8), 77,5 (C-3''), 77,0 (C-5''), 74,5 (C-2''), 73,0 (C-4'''), 72,0 (C-3'''), 71,5 (C-2'''), 71,0 (C-4''), 69,5 (C-5'''), 67,0 (C-6''), 18,5 (C-6'').



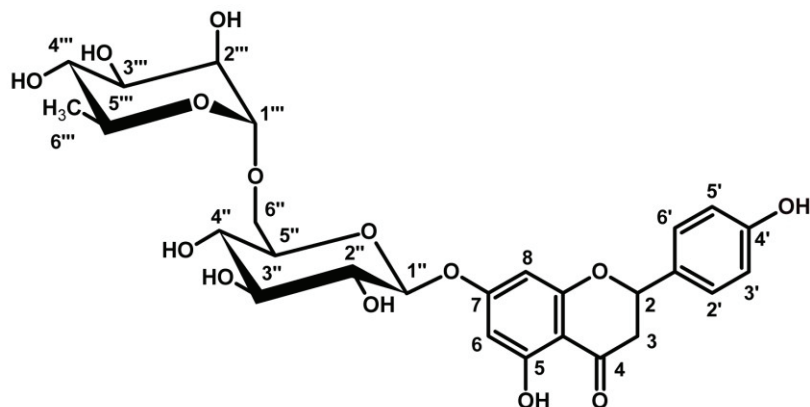
Ryc. 55. Struktura skolimozydu (zw. 7).

Związek 8: *3',5'-di-C-β-glukozyd floretyny (3',5'-di-C-β-glukozyd 2',4,4',6'-tetrahydroksydihydrochalkonu)* (Ryc. 56). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 284; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 31,3 min, m/z : 597 [M-H]⁻ 477 [M-H-120]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,03 (2H, d, J = 8,2 Hz, H-2, 6), 6,66 (2H, d, J = 8,2 Hz, H-3, 5), 4,71 (1H, d, J = 9,1 Hz, H-1'', 1'''), 3,60 (2H, m, H-6'', 6'''), 3,47 (1H, t, J = 9,1, H-2'', 2'''), 3,30 (1H, m, H-4'', 4'''), 3,28 (2H, m, H- α), 3,27 (m, H-3'', 3''', 5'', 5'''), 2,78 (2H, t, J = 7,6, H- β). ¹³C NMR (125 MHz, 10% v/v kwas trifluoroctowy-*d* w DMSO-*d*₆) δ (ppm): 205,7 (-CO-), 161,9 (C-2', 4', 6'), 156,1 (C-4), 132,3 (C-1), 129,9 (C-2, 6), 115,8 (C-3, 5), 105,3 (C-1'), 104,6 (C-3', 5'), 81,8 (C-5'', 5'''), 78,5 (C-3'', 3'''), 75,4 (C-1'', 1'''), 72,7 (C-2'', 2'''), 69,9 (C-4'', 4'''), 60,7 (C-6'', 6'''), 46,9 (C- α), 30,0 (C- β).



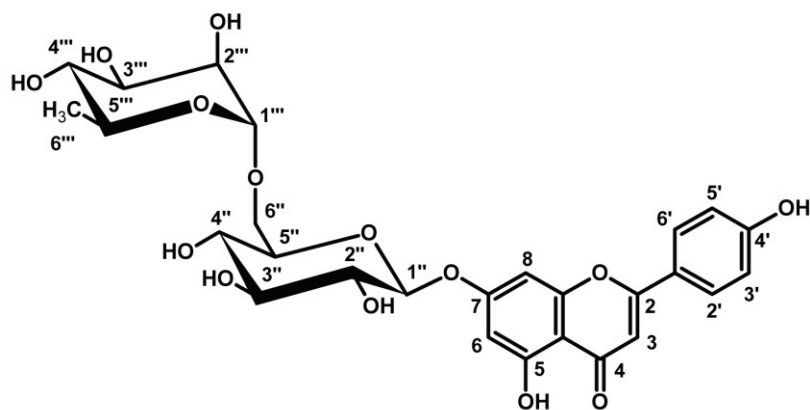
Ryc. 56. Struktura 3',5'-di-C-β-glukozydu floretyny (zw. 8).

Związek 9: *Narirutyna (7-O-rutynozyd naryngeniny, 7-O-rutynozyd 4',5,7-trihydroksyflawanonu)* (Ryc. 57). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 282, 327; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 33,0 min, m/z : 579 [M-H]⁻, 271 [M-rutynoza-H]⁻.



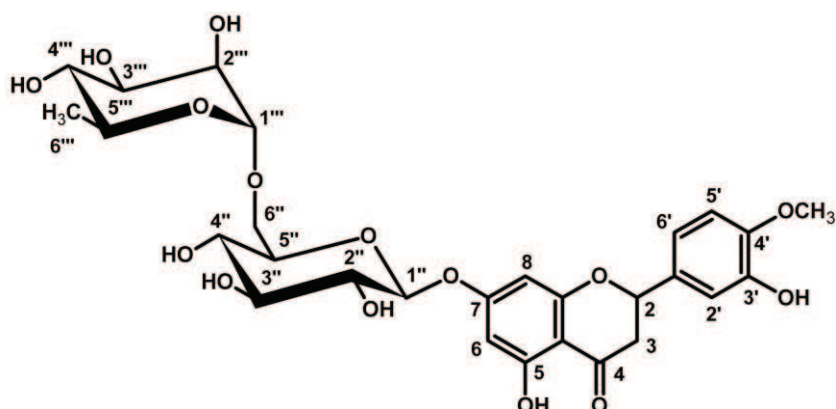
Ryc. 57. Struktura narirutyny (zw. 9).

Związek 10: *Izoroifolina* (7-*O*-rutynozyd apigeniny, 7-*O*-rutynozyd 4',5,7-trihydroksyflawonu) (Ryc. 58). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 269, 339; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 34,0 min, m/z : 577 [M-H]⁻, 269 [M-rutynoza-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,95 (2H, d, J = 8,8 Hz, H-2', 6'), 6,95 (2H, d, J = 8,8 Hz, H-3', 5'), 6,86 (1H, s, H-3), 6,77 (1H, s, H-8), 6,45 (1H, s, H-6), 5,06 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-1''), 4,54 (1H, s, H-1'''), 3,84 (1H, d, J = 11,2 Hz, H-6''), 3,65 (1H, bs, H-2'''), 3,60 (1H, m, H-5''), 3,41 (m, H-6''', H-3'''), 3,47 (m, H-5'''), 3,30 (m, H-2''), 3,28 (m, H-3''), 3,15 (m, H-4''), 3,12 (m, H-4'''), 1,07 (3H, d, J = 6,2 Hz, H-6'''); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, przesunięcia chemiczne na podstawie widm ghmbc i ghsqc) δ (ppm): 182,0 (C-4), 165,5 (C-2), 163,5 (C-7), 162,0 (C-4'), 161,5 (C-5), 157,5 (C-9), 129,5 (C-2', 6'), 121,5 (C-1'), 116,5 (C-3', 5'), 106,0 (C-10), 104,0 (C-3), 101,0 (C-1'''), 100,5 (C-1''), 100,0 (C-6), 95,5 (C-8), 77,0 (C-3''), 76,5 (C-5''), 74,0 (C-2''), 72,5 (C-4'''), 71,5 (C-3'''), 71,0 (C-2'''), 70,5 (C-4''), 69,0 (C-5'''), 67,0 (C-6''), 18,0 (C-6''').



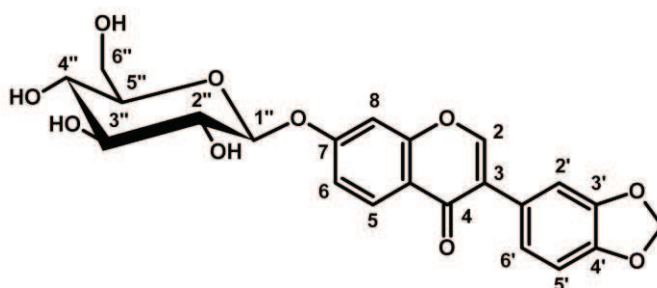
Ryc. 58. Struktura izoroifoliny (zw. 10).

Związek 11: *Hesperydyna* (7-*O*-rutynozyd hesperetyny, 7-*O*-rutynozyd 3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanonu) (Ryc. 59). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 283, 324; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 35,2 min, m/z : 609 [M-H]⁻, 301 [M-rutynoza-H]⁻.



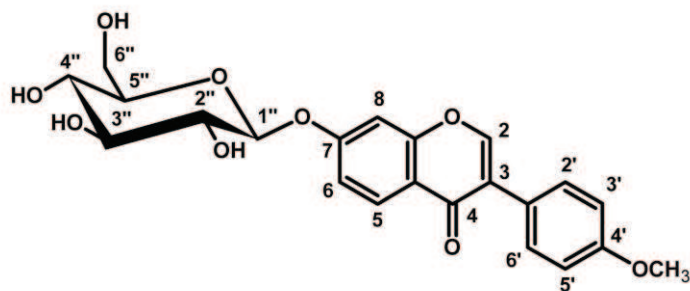
Ryc. 59. Struktura hesperydyny (zw. 11).

Związek 12: 7-O- β -glukozyd pseudobaptygeniny (rotindyna; 7-O- β -glukozyd 7-hydroksy-3',4'-metylenodioksyizoflawonu) (Ryc. 60). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 247, 259, 290; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 38,2 min, m/z : 489 [M+HCOO]⁻, 281 [M-glukoza-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,46 (1H, s, H-2), 8,05 (1H, d, J = 8,9 Hz, H-5), 7,25 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-8), 7,17 (1H, d, J = 1,6 Hz, H-2'), 7,15 (1H, dd, J = 8,9 Hz, 2,2 Hz, H-6), 7,08 (1H, dd, J = 8,0, 1,6 Hz, H-6'), 6,99 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-5'), 6,06 (2H, s, -OCH₂O-) 5,11 (1H, d, J = 7,3 Hz, H-1''), 3,71 (1H, m, H-6''), 3,46 (2H, m, H-5'', 6''), 3,31 (2H, m, H-2'', 3''), 3,17 (1H, bt, J = 7,8 Hz, H-4'').



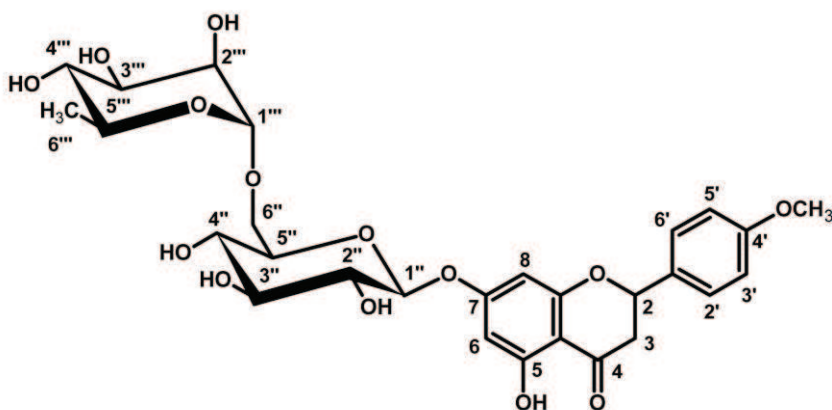
Ryc. 60. Struktura 7-O- β -glukozydu pseudobaptygeniny (zw. 12).

Związek 13: 7-O- β -glukozyd formononetyny (ononina; 7-O- β -glukozyd 7-hydroksy-4'-metoksyizoflawonu) (Ryc. 61). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 249, 295sh; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 39,2 min, m/z : 475 [M+HCOO]⁻, 267 [M-glukoza-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,46 (1H, s, H-2), 8,07 (1H, d, J = 8,9 Hz, H-5), 7,55 (2H, d, J = 8,6, 2,0 Hz, H-2', 6'), 7,26 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8), 7,16 (1H, dd, J = 8,9 Hz, 2,0 Hz, H-6), 7,01 (1H, d, J = 8,6, H-3', 5'), 5,12 (1H, d, J = 7,0 Hz, H-1''), 3,80 (3H, s, H-4'a), 3,72 (1H, m, H-6''), 3,47 (2H, m, H-5'', 6''), 3,32 (2H, m, H-2'', 3''), 3,18 (1H, bt, J = 7,8 Hz, H-4'').



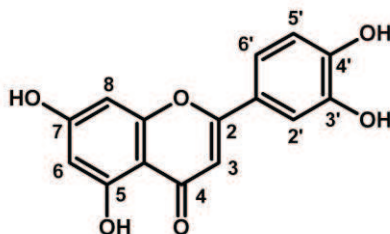
Ryc. 61. Struktura 7-O- β -glukozydu formononetyny (zw. 13).

Związek 14: *Didymina* (7-O-rutynozyd izosakuranetyny, 7-O-rutynozyd 5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu) (Ryc. 62). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 283, 327; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 43,5 min, m/z : 593 [M-H]⁻, 285 [M-rutynoza-H]⁻.



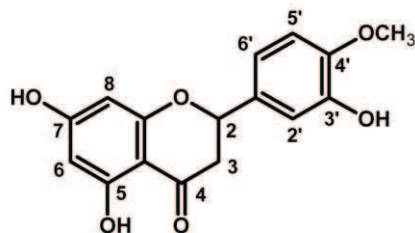
Ryc. 62. Struktura didyminy (zw. 14).

Związek 14a: *Luteolina* (3',4',5,7-tetrahydroksyflawon) (Ryc. 63). Żółty, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 254, 266, 292, 347; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 46,8 min, m/z : 285 [M-H]⁻.



Ryc. 63. Struktura luteoliny (zw. 14a).

Związek 15: *Hesperetyna* (3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanon) (Ryc. 64). Biały, bezpostaciowy proszek; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 286, 333sh; LC-DAD-MS (ESI-): Rt = 52,0 min, m/z : 301 [M-H]⁻.



Ryc. 64. Struktura hesperetyny (zw. 15).

III.3. Analiza statystyczna

Dane uzyskane w toku eksperymentów biotechnologicznych (parametry wzrostowe badanych biomas, a także zawartości w nich poszczególnych związków polifenolowych z grupy ksantonów, flawanonów, izoflawonów oraz pochodnych benzofenonu), analizowano statystycznie w celu określenia istotności różnic pomiędzy wartościami uzyskanymi dla poszczególnych rodzajów biomas, kolejnych dni prowadzonych eksperymentów, bądź odmiennych strategii doświadczalnych.

Dla zebranych wyników zastosowano analizę wariancji (ANOVA), wykorzystując następnie testy *post-hoc* dla wyznaczenia istotności różnic pomiędzy średnimi z poszczególnych grup. Ocenie statystycznej poddano dane doświadczalne w rozdz. II.1.2.1., II.1.2.2., II.1.3.2. (test rozsądnej istotnej różnicy /RIR/ Tukeya) oraz II.1.3.1. (test porównań wielokrotnych Duncana /DMRT/), wykorzystując do tego celu oprogramowanie STATISTICA PL (StatSoft, Tulsa, USA). Zgodnie z danymi literaturowymi, wymienione testy są odpowiednie do analizy danych zawartych w niniejszej pracy (Łomnicki, 2007).

Rezultaty doświadczeń wchodzących w zakres prezentowanego projektu przedstawiono na rycinach, bądź w formie tabelarycznej. Zawarte w nich wyniki stanowią średnie arytmetyczne \pm SD. Odmiennymi literami oznaczono dane różniące się statystycznie (dla poziomu ufności $p < 0,05$).

Streszczenie

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wybrane aspekty pozyskiwania związków polifenolowych z grupy ksantonów, flawanonów, izoflawonów oraz pochodnych benzofenonu, w oparciu o kultury *in vitro* endemicznych, południowoafrykańskich roślin z rodzaju *Cyclopia*.

Część teoretyczna prezentowanej pracy składa się z dwóch rozdziałów. W pierwszym z nich poruszono zagadnienia związane z charakterystyką botaniczną, zastosowaniem, składem chemicznym oraz aktywnością biologiczną badanych roślin. Analiza powyższych danych literaturowych pozwoliła na wyselekcjonowanie, do planowanych badań biotechnologicznych, gatunków najbardziej wartościowych pod względem zawartości połączeń polifenolowych oraz aktywności biologicznej, a także istotnych z ekonomicznego punktu widzenia. W drugim rozdziale przedstawiono wybrane problemy dotyczące wykorzystania bioreaktorów w badaniach nad kulturami *in vitro* roślin wyższych, ukierunkowanych na biotechnologiczną produkcję metabolitów wtórnych. Jest to pierwsze, kompilacyjne opracowanie powyższego zagadnienia, w którym zwrócono szczególną uwagę na zastosowanie bioreaktorów w specyficznych schematach eksperymentalnych, dotyczących otrzymywania związków aktywnych biologicznie z roślinnych kultur *in vitro*. Podkreślono przy tym takie aspekty prowadzonych prac jak: wybór gatunku, typ kultury, rodzaj produkowanych połączeń oraz konstrukcja fermentora. Z punktu widzenia badań biotechnologicznych, wchodzących w zakres niniejszej pracy, szczególnie istotne było poznanie problematyki związanej z doбором właściwego typu bioreaktora do rodzaju prowadzonej kultury. W porównaniu do kultur mikrobiologicznych, biomasy *in vitro* roślin wyższych, rosnące w instalacjach wielkoskalowych, są bardziej zróżnicowane pod względem odporności na stres mechaniczny, a także wymagań odnośnie konstrukcji naczynia hodowlanego, rodzaju mieszania oraz nasycenia pożywki tlenem rozpuszczonym. Uzyskane informacje były tym samym kluczowe dla powodzenia doświadczeń, obejmujących zwiększenie skali prowadzenia kultur *in vitro* roślin z rodzaju *Cyclopia*.

Druga część niniejszej rozpraw doktorskiej obejmuje prace eksperymentalne w zakresie akumulacji związków naturalnych z grupy ksantonów, izoflawonów, flawonów, flawanonów oraz pochodnych benzofenonu, w kulturach tkankowych wybranych miodokrzewów. Nadrzędny cel projektu, tj. otrzymanie roślinnych systemów *in vitro* ukierunkowanych na pozyskiwanie wyselekcjonowanych polifenoli, realizowano na drodze szeroko rozumianych doświadczeń biotechnologicznych, obejmujących inicjację kultur *in vitro* *Cyclopia* sp. różniących się statusem morfotycznym, selekcję biomas najbardziej cennych pod względem zawartości badanych metabolitów wtórnych, opracowanie strategii eksperymentalnych zapewniających dużą produktywność systemów względem wybranych połączeń oraz zwiększenie skali hodowli „superproducentów” przy użyciu skonstruowanych, specjalnie w tym celu, bioreaktorów.

Integralną część projektu naukowego stanowiły badania fitochemiczne, dotyczące jakościowych oraz ilościowych analiz chromatograficznych HPLC frakcji

polifenolowych z otrzymanych biomas *in vitro* oraz materiału gruntowego *Cyclopia* sp. Wykorzystując zoptymalizowane, w toku prowadzonych eksperymentów, warunki rozdzielania polifenoli występujących w miodokrzewach, dokonywano selekcji biomas, a także wyboru biotechnologicznych strategii doświadczalnych, umożliwiających w efekcie uzyskanie roślinnych systemów *in vitro* o największej produktywności względem poszczególnych metabolitów wtórnych. W zakres planowanych prac fitochemicznych wchodziła również izolacja oraz identyfikacja nierozpoznanych do tej pory składników polifenolowych roślin gruntowych, a także nowych połączeń obecnych jedynie w kulturach *in vitro* miodokrzewów.

W oparciu o dane literaturowe, do prowadzonych badań wybrano 3 gatunki: *C. genistoides* (L.) Vent., *C. intermedia* E. Mey. i *C. subternata* Vogel, istotne z ekonomicznego punktu widzenia jako podstawowe źródło surowca do produkcji herbaty honeybush, a także charakteryzujące się obecnością bogatego zespołu związków polifenolowych.

Pierwszy etap doświadczeń biotechnologicznych obejmował wyprowadzenie organowych oraz kalusowych kultur *in vitro* miodokrzewów, zoptymalizowanie dla nich warunków do ciągłego wzrostu, a następnie ocenę otrzymanych biomas pod względem morfologii (stopień cytodyferencjacji, konsystencja, barwa) oraz tempa wzrostu (wyznaczenie wartości współczynnika przyrostu G_i). Jako, że do tej pory nie uzyskano hodowli tkankowych roślin z rodzaju *Cyclopia*, na etapie inicjacji kultur *in vitro* konieczne okazało się empiryczne dobranie zarówno *inoculum*, jak również medium wzrostowego pozwalającego na otrzymanie żywotnych i stabilnie rosnących biomas. Jako podłoża doświadczalne wykorzystano tzw. pożywki „bogate”, stosowane powszechnie w biotechnologii roślin wyższych, charakteryzujące się różną zawartością soli mineralnych, węglowodanów, aminokwasów, witamin (podłoża Schenka-Hildebrandta – SH i Murashige’a-Skooga – MS), a także, w zależności od celu eksperymentu (organogeneza lub indukcja tkanki przyrannej), zróżnicowanym składem w zakresie regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin. Eksplantatami użytymi do wyprowadzenia kultur *in vitro* *Cyclopia* sp. były fragmenty korzeniowe, hypokotylowe, liścieniowe, a także szczytowe części sterylnych siewek badanych gatunków. W rezultacie przeprowadzonych doświadczeń, obejmujących inicjację i w dalszej kolejności, optymalizację warunków do ciągłego wzrostu biomas, otrzymano stabilnie rosnące mikropędy i kalusy *C. genistoides*, *C. intermedia* i *C. subternata*. Uzyskane biomasy parenchymatyczne miodokrzewów charakteryzowały się zróżnicowanymi wymaganiami pod względem optymalnego składu podłoża: kultury kalusowe *C. intermedia* i *C. subternata* prowadzono na pożywce MS wzbogaconej 20,19 μM 4-CPPU (*N*-(2-chloro-4-pirydylo)-*N'*-fenylomocznik) i 1,96 μM 2,4,5-T (kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy), podczas gdy kalus *C. genistoides* wymagał do ciągłego wzrostu podłoża SH z dodatkiem 20,19 μM 4-CPPU i 2,27 μM 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy). Kultury pędowe wszystkich badanych gatunków namnażano na pożywce SH suplementowanej 9,84 μM 2iP ((6- γ , γ -dimetyloallilo)-aminopuryna) i 1,0 μM TDZ (tidiazuron). W toku eksperymentu nie udało się natomiast wyprowadzić kultur korzeni odciętych roślin z rodzaju *Cyclopia*, prawdopodobnie ze względu na specyficzne wymagania odnośnie obecności bakteryjnych szczepów symbiotycznych,

koniecznych w badanych gatunkach do zapoczątkowania procesu ryzogenezy. Spośród wyprowadzonych kultur *in vitro*, najszybszym przyrostem charakteryzował się kalus *C. subternata* (współczynnik $G_i \approx 1200 \%$), biomasa organową o najlepszych parametrach wzrostowych były zaś mikropędy *C. genistoides* ($G_i \approx 700 \%$).

Uzyskane kultury *in vitro* *Cyclopia* sp. oceniano pod względem zawartości ksantonów i bioflawonoidów, porównując uzyskane wyniki z częściami nadziemnymi odpowiednich roślin gruntowych. Przeprowadzenie powyższych analiz możliwe było dzięki zoptymalizowaniu, w ramach realizowanego projektu, warunków ekstrakcji i oczyszczania frakcji polifenolowych z matryc roślinnych miodokrzewów oraz metody chromatograficznego rozdzielania uzyskanych mieszanin związków.

Próbki do badań jakościowych i ilościowych przygotowywano na drodze wyczerpującej ekstrakcji matryc roślinnych za pomocą metanolu, a następnie oczyszczenia pierwotnych wyciągów od niepolarnych substancji balastowych przy użyciu chloroformu. Z uwagi na charakter badanych metabolitów wtórnych (polifenole), techniką analityczną z wyboru była, w opisywanym przypadku, wysokosprawna chromatografia cieczowa. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano, po raz pierwszy, warunki analizy HPLC do prowadzenia oznaczeń ilościowych polifenoli występujących zarówno w roślinach gruntowych, jak i biomasach *in vitro* *Cyclopia* sp. Całkowite rozdzielanie poszczególnych składników zespołu wybranych metabolitów uzyskano w układzie faz odwróconych, wykorzystując kolumnę C18 oraz elucję gradientową, przy zastosowaniu fazy ruchomej złożonej z acetonitrylu, wody i kwasu mrówkowego. Poszczególne związki zidentyfikowano w oparciu o widma LC-DAD oraz LC-ESI-MS, a także kochromatografię z substancjami wzorcowymi. Oznaczenia ilościowe prowadzono z wykorzystaniem detektora UV-DAD. W dalszej kolejności, zoptymalizowaną metodę HPLC poddano walidacji, obejmującej określenie zakresów liniowości, limitów detekcji i oznaczalności, precyzji wewnątrz- i międzygrupowej oraz dokładności oznaczeń, dla poszczególnych połączeń polifenolowych. W rezultacie, opracowana procedura analityczna mogła być z powodzeniem wykorzystana do prowadzenia skryningowych badań jakościowych oraz ilościowych ksantonów i bioflawonoidów, występujących w surowcach gruntowych oraz kulturach *in vitro* miodokrzewów.

Integralną część badań fitochemicznych, wchodzących w zakres niniejszego projektu, stanowiły prace preparatywne, ukierunkowane na wyizolowanie i identyfikację nierozpoznanych do tej pory składników polifenolowych z części nadziemnych oraz biomas *in vitro* miodokrzewów. Obejmowały one, w pierwszej kolejności, uzyskanie frakcji wolnych od substancji balastowych, a także ekstraktów wzbogaconych w wybrane metabolity wtórne. W tym celu, pierwotne wyciągi metanolowe oczyszczano, analogicznie jak w przypadku skryningowych analiz ilościowych, za pomocą chloroformu, a następnie poddawano frakcjonowanej ekstrakcji octanem etylu. Poszczególne składniki zespołu polifenolowego izolowano przy użyciu grawitacyjnej chromatografii kolumnowej w układzie faz normalnych i/lub semipreparatywnej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych. W toku prezentowanych badań zastosowano, po raz pierwszy, nowatorski sposób rozdzielania ksantonów i bioflawonoidów z wykorzystaniem dwóch

seryjnie połączonych, semipreparatywnych kolumn monolitycznych C18. Opisane procedury umożliwiły wyizolowanie, z poszczególnych matryc roślinnych, trzynastu związków polifenolowych (w tym 7 dotychczas nieopisanych w rodzaju *Cyclopia*), których tożsamość określono następnie na drodze jedno- i dwukierunkowych eksperymentów ^1H i ^{13}C NMR oraz przy użyciu technik łączonych LC-DAD i LC-ESI-MS.

W ramach przeprowadzonych badań fitochemicznych wyizolowano, po raz pierwszy, z kalusa *C. subternata* 3 pochodne izoflawonowe, których obecności nie stwierdzono uprzednio w częściach nadziemnych rośliny macierzystej (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny). Trzy niezidentyfikowane do tej pory w miodokrzewach połączenia polifenolowe otrzymano również z niefermentowanego surowca gruntowego powyższego gatunku. Były to: 3-*C*- β -glukozyd iriflofenonu, 3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny oraz izoroifolina (7-*O*-rutynozyd apigeniny). Pierwsze dwa z wymienionych związków, należące odpowiednio do grupy pochodnych benzofenonu i dihydrochalkonów, są jednocześnie pierwszymi metabolitami tego typu zidentyfikowanymi w roślinach z rodzaju *Cyclopia*. Oprócz powyższych polifenoli, wyizolowano z niefermentowanego materiału gruntowego *C. subternata* 3 połączenia o charakterze rutynozydów: hesperydynę (7-*O*-rutynozyd hesperetyny), skolimozyd (7-*O*-rutynozyd luteoliny) oraz narirutynę (7-*O*-rutynozyd naryngeniny), a także znaczne ilości ksantonu mangiferyny.

W toku prac preparatywnych opracowano, po raz pierwszy, prosty i wydajny sposób pozyskiwania, z niefermentowanych części nadziemnych *C. genistoides*, ksantonów: izomangiferyny oraz jej podstawieniowego izomeru mangiferyny. Powyższe związki otrzymano w postaci czystej, wykorzystując jedynie frakcjonowaną ekstrakcję pierwotnych wyciągów oraz różnice w rozpuszczalności badanych połączeń. Stosując wysokosprawną, semipreparatywną chromatografię cieczową, w układzie faz odwróconych, wyizolowano ponadto z powyższego surowca, po raz pierwszy, 2 pochodne benzofenonu: 3-*C*- β -glukozydy makluryny i iriflofenonu.

Zoptymalizowana metoda chromatograficznego rozdzielania składników polifenolowych występujących w miodokrzewach, została wykorzystana do przeprowadzenia analiz ilościowych surowców gruntowych oraz biomas *in vitro* *Cyclopia* sp., pod względem znanych pochodnych fenylopropanu, a także związków wyizolowanych w toku prowadzonych prac preparatywnych.

Pierwotnie określono zawartość ksantonów i bioflawonoidów w niefermentowanych oraz poddanych fermentacji częściach nadziemnych *C. genistoides*, *C. subternata* i *C. intermedia*. Pierwszy z wymienionych gatunków stanowił, niezależnie od statusu surowca, najbogatsze spośród badanych roślin źródło mangiferyny (ok. 5250-7000 mg/100 g DW) oraz izomangiferyny (ok. 1450-1900 mg/100 g DW). Niefermentowany materiał gruntowy *C. genistoides* charakteryzował się ponadto najwyższymi stężeniami 3-*C*- β glukozydów makluryny (ok. 280 mg/100 g DW) oraz iriflofenonu (ok. 830 mg/100 g DW). Nie poddane fermentacji części nadziemne *C. subternata*, o największej spośród badanych surowców zawartości hesperydyny (ok. 1950 mg/100 g DW), cechowała ponadto obecność znacznych ilości eriocytryny (ok. 470 mg/100 g DW), skolimozydu (ok. 520 mg/100g DW) oraz 3',5'-di-

C- β -glukozydu floretyny (ok. 510 mg/100 g DW). Materiał gruntowy z *C. intermedia* zawierał, jako jedyny spośród analizowanych biomas, flawanon didyminę (7-*O*-rutynozyd izosakuranetyny), której stężenie w niefermentowanym i fermentowanym surowcu wynosiło odpowiednio ok. 800 i 380 mg/100 g DW. Obecność niniejszego związku w *C. intermedia* stwierdzono zarazem po raz pierwszy w toku analiz LC-DAD i LC-ESI-MS wchodzących w zakres niniejszej pracy. Oprócz didyminy, powyższy materiał roślinny poddany fermentacji zawierał, jako jedyny, znaczne ilości flawanonu hesperetyny (ok. 100 mg/100 g DW).

Przeprowadzone analizy chromatograficzne potwierdziły niekorzystny wpływ fermentacji na zawartość związków polifenolowych w częściach nadziemnych roślin z rodzaju *Cyclopia*. Wyjątek stanowił w tym względzie fermentowany materiał gruntowy *C. genistoides* stanowiący, podobnie jak surowiec niefermentowany, bogate źródło mangiferyny i izomangiferyny.

Analizy HPLC wykazały, że wprowadzenie miódokrzewów do kultur tkankowych spowodowało wyraźną zmianę szlaków biosyntezy związków polifenolowych charakterystycznych dla badanych gatunków, zaś uzyskane biomasy *in vitro Cyclopia* sp. zachowały w różnym stopniu zdolność do akumulacji wtórnych metabolitów typowych dla roślin macierzystych. W kulturach kalusowych miódokrzewów nie stwierdzono obecności ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna), a także pochodnych benzofenonu (3-*C*- β -glukozydy iriflofenonu i makluryny), właściwych dla surowca gruntowego. Tkanka przyranna *C. subternata*, jako jedyna z wyprowadzonych kultur parenchymatycznych, wykazywała zdolność do produkcji hesperydyny, a także 3 pochodnych izoflawonowych (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nie występujących w roślinie macierzystej. W przeciwieństwie do biomas nieuorganizowanych, pędy *in vitro* wszystkich badanych gatunków akumulowały zarówno metabolity szlaku szikimowego (ksantony i benzofenony), jak i wymienione wyżej glukozydy izoflawonowe.

Kolejne etapy doświadczeń biotechnologicznych ukierunkowane były na otrzymanie roślinnych systemów *in vitro*, zdolnych do wybiórczej produkcji znacznych ilości wybranych ksantonów i bioflawonoidów, w oparciu o uzyskane kultury tkankowe miódokrzewów. Zwiększenie poziomów akumulacji poszczególnych polifenoli w biomasach *in vitro* postanowiono uzyskać na drodze modyfikacji szeroko rozumianych warunków prowadzenia hodowli. Obejmowały one zmiany parametrów fizycznych eksperymentu (oświetlenie, temperatura), modelu kultury (płynna lub stacjonarna), a także elicytację, immobilizację oraz wybrane strategie retrobiosyntetyczne (suplementacja pożywki prekursorami biosyntezy lub złożonymi substancjami odżywczymi). Do eksperymentów przeznaczono kalus *C. subternata* oraz mikropędy *C. genistoides*, charakteryzujące się najlepszymi, spośród uzyskanych biomas *in vitro*, parametrami wzrostowymi, a także zdolnością do akumulacji wybranych połączeń z grupy ksantonów, flawanonów, izoflawonów i pochodnych benzofenonu.

Doświadczenia z zakresu wpływu czynników fizycznych na wzrost biomasy i akumulację polifenoli w kulturach *in vitro Cyclopia* sp., przeprowadzono z wykorzystaniem szybko rosnącego kalusa *C. subternata*, stanowiącego bogate źródło połączeń izoflawonowych (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i

formononetyny). Powyższą kulturę prowadzono w zmiennych warunkach oświetleniowych (całkowita ciemność, oświetlenie ciągłe o spektrum dziennym, światło modyfikowane za pomocą filtrów: czerwonego, żółtego i niebieskiego), a także poddawano działaniu czynników o charakterze stresogennym w postaci promieniowania UVC oraz podwyższonej (29 °C) lub obniżonej (13 °C), w stosunku do standardowych warunków hodowlanych, temperatury.

Przeprowadzone prace doświadczalne wykazały, że warunki oświetleniowe nie wpływają w istotny sposób na tempo wzrostu i żywotność kalusa *C. subternata*, o czym świadczyły zbliżone wartości współczynników przyrostu biomas, obliczone dla poszczególnych modyfikacji eksperymentalnych ($G_i \approx 1000-1300\%$). Stwierdzono ponadto stymulujący wpływ obecności światła na biosyntezę hesperydyny oraz izoflawonów w tkance przyrannej badanego gatunku. Oznaczone zawartości wymienionego flawanonu, a także 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, wyniosły w opisywanym przypadku 85,13, 26,25, 14,71 i 8,08 mg/100 g DW. Udowodniono, że naświetlanie biomasy nie było jednak niezbędne dla zainicjowania biosyntezy badanych połączeń, o czym świadczyła ich obecność w kalusie *C. subternata* rosnącym w warunkach całkowitego zaciemnienia (stężenie hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny na poziomie odpowiednio: 16,11, 14,07, 8,63 i 4,52 mg/100 g DW). Spośród strategii eksperymentalnych, obejmujących modyfikacje oświetlenia przy użyciu filtrów barwnych, najlepsze efekty, w rozumieniu stymulowania biosyntezy polifenoli, przyniosło prowadzenie kultury przy świetle niebieskim (wzrost zawartości hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny odpowiednio o 39, 10, 30 i 28 % w stosunku do biomasy rosnącej przy świetle białym). Niezależnie od rodzaju oświetlenia, większe ilości izoflawonów w tkance przyrannej, namnażanej przy dostępie do światła, stwierdzono w 14 dniu cyklu wzrostowego, hesperydyny zaś w dniu 28. Prowadzenie kultury bez dostępu światła spowodowało natomiast wyraźną zmianę profilu produkcyjnego badanej biomasy w zakresie polifenoli, przejawiającą się przesunięciem maksimum akumulacji wszystkich metabolitów w kierunku późniejszych dni eksperymentu.

Stwierdzono, że naświetlanie kalusa *C. subternata* promieniami UVC wywiera, w zależności od momentu aplikacji wspomnianego czynnika stresowego, wyraźny wpływ na wzrost biomasy i/lub biosyntezę związków polifenolowych w tkance przyrannej. Zastosowanie promieniowania UVC w dniu inokulacji, który odpowiadał, w cyklu wzrostowym, fazie adaptacyjnej, spowodowało pogorszenie parametrów wzrostowych kalusa, jak również obniżenie zawartości badanych metabolitów wtórnych. Z drugiej strony, naświetlanie biomasy parenchymatycznej *C. subternata* promieniami UVC, w 20 dniu doświadczenia, nie hamowało w wyraźny sposób wzrostu kultury, stymulując jednocześnie biosyntezę polifenoli. Zawartości hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, w 28 dniu eksperymentu, wyniosły dla danej strategii eksperymentalnej odpowiednio: 204,16, 31,84, 18,09 i 8,32 mg/100g DW. Opisany schemat postępowania umożliwił tym samym uzyskanie znacznych ilości biomasy, przy zachowaniu wysokich poziomów akumulacji badanych bioflawonoidów.

Poddanie kalusa *C. subternata* szokowi termicznemu, w postaci obniżonej bądź podwyższonej temperatury, skutkowało silnym zahamowaniem wzrostu badanej biomasy, przy jednoczesnym podwyższeniu stężeń hesperydiny oraz izoflawonów. Kultury prowadzone w niskiej temperaturze charakteryzowały się w szczególności wysoką zawartością 7-*O*- β -glukozydu kalikozyiny (235,30 mg/100 g DW), w podwyższonej zaś – hesperydiny i 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptygeniny (odpowiednio 55,00 i 84,55 mg/100 g DW).

Eksperymenty z zakresu wpływu czynników fizycznych na metabolizm kultur kalusowych *C. subternata* wykazały, że zróżnicowanie warunków oświetleniowych lub temperatury prowadzenia hodowli, a także naświetlanie tkanki przyrannej promieniami UVC, powoduje wyraźne zmiany w obrębie zespołu polifenoli obecnych w badanej biomacie. Największą skuteczność, w rozumieniu stymulacji biosyntezy metabolitów wtórnych, stwierdzono w wyniku zastosowania bodźców stresogennych w postaci zmiany temperatury oraz promieniowania ultrafioletowego. Przydatność wymienionych strategii doświadczalnych dla realizacji podstawowego celu projektu, tj. uzyskania wysokoproduktywnego systemu *in vitro* do pozyskiwania wybranych polifenoli, była zarazem ograniczona ze względu na niekorzystny wpływ opisanego postępowania na przyrost tkanki.

Realizując kolejne zadania badawcze, z kultur kalusowych *C. subternata* wyprowadzono hodowle zawieszinowe. Umożliwiały one precyzyjne ustalenie charakterystyki pozyskanej biomasy z uwagi na pierwotny (wzrost) i wtórny metabolizm (produkcja polifenoli) oraz przeprowadzenie sterowanych procedur biotechnologicznych w zakresie elicytacji, dokarmiania i immobilizacji komórek zawiesziny w celu podwyższenia produktywności opisywanego systemu *in vitro*.

Zawiesinę miodokrzewu uzyskano techniką dyspersji, z parenchymatycznego kalusa badanej rośliny, umieszczonego w podłożu MS, suplementowanym 20,19 μ M 4-CPPU i 1,96 μ M 2,4,5-T (medium hodowlane opracowane dla niniejszej tkanki przyrannej). Dla wyprowadzonej kultury wytrząsanej wyznaczono profile wzrostowe, w oparciu o zmiany ilości świeżej (FW) i suchej (DW) masy oraz wartości współczynnika przyrostu (Gi), w cyklu wzrostowym, a także określono zawartość związków polifenolowych w biomasach zbieranych w kolejnych dniach doświadczenia.

Kultury zawieszinowe *C. subternata* charakteryzowały się szybkim i intensywnym wzrostem ($G_i \approx 1200\%$) oraz zdolnością do biosyntezy 3 glukozydów izoflawonowych, zidentyfikowanych uprzednio w kalusie badanego gatunku. Z uwagi na całkowity brak hesperydiny, uzyskana biomasa stanowiła zarazem wybiórcze źródło wymienionych połączeń. Maksymalne zawartości 7-*O*- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny, magazynowanych w całości wewnątrzkomórkowo, wynosiły dla opisywanej kultury odpowiednio: 148,00, 76,00 i 99,00 mg/100 g DW, co odpowiadało produktywnościom dla poszczególnych związków równym: 0,74, 0,31 i 0,49 mg l⁻¹ d⁻¹.

Z uwagi na istotny wpływ oświetlenia na biosyntezę izoflawonoidów w kalusie *C. subternata*, a także przewidywane zmiany natężenia światła, związane z planowaną, w późniejszych etapach prac biotechnologicznych, adaptacją zawiesziny powyższego gatunku do wzrostu w bioreaktorze (trudność doprowadzenia światła w instalacjach

wielkoskalowych), przeprowadzono eksperyment obejmujący kultywację badanej biomasy w całkowitej ciemności. Wykazał on, że kultury wytrząsane *C. subternata*, rosnące bez dostępu światła, charakteryzują się parametrami wzrostowymi zbliżonymi do biomasy namnażanej w świetle dziennym. Maksymalne stężenia 7-O- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny wynosiły w opisywanym przypadku odpowiednio: 275,00, 126,80 oraz 145,00 mg/100 g DW. Produktywności biomasy względem wymienionych izoflawonów, wynoszące 1,27, 0,58 i 0,68 mg l⁻¹ d⁻¹, były zarazem odpowiednio o ok. 72, 87 i 29 % wyższe w stosunku do kultury odniesienia.

Zastosowane strategie retrobiosyntetyczne, ukierunkowane na stymulowanie metabolizmu pierwotnego (wzrost biomasy) i wtórnego (biosynteza związków polifenolowych) w kulturach zawiesinowych *C. subternata*, obejmowały dokarmianie badanych komórek złożonymi substancjami odżywczymi (hydrolizat kazeiny i woda kokosowa), bądź dalekim prekursorem biosyntezy bioflawonoidów (fenyloalanina). Spośród wymienionych wariantów eksperymentalnych, najlepsze efekty obserwowano w wyniku suplementacji pożywki wzrostowej wodą kokosową. Rezultatem powyższego zabiegu było uzyskanie największej, w opisywanej serii doświadczeń, ilości suchej masy (ok. 16 g l⁻¹; ok. 14 % więcej w porównaniu z kulturą podstawową), przy jednoczesnym zachowaniu wysokich stężeń 7-O- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny (odpowiednio 158,96, 99,95 i 74,54 mg/100 g DW). Sumaryczna produktywność badanej kultury względem połączeń izoflawonoidowych wyniosła przy tym 1,80 mg l⁻¹ d⁻¹, co stanowi ok. 17 % wzrost w porównaniu z kulturą podstawową.

W przeciwieństwie do dokarmiania zawiesiny *C. subternata* substancjami odżywczymi, zastosowanie chitosanu oraz jasmonianu metylu (klasyczne elicytory o udokumentowanej skuteczności, względem stymulacji biosyntezy izoflawonów w kulturach *in vitro* roślin wyższych), nie spowodowało spektakularnego wzrostu produktywności biomasy z uwagi na połączenia izoflawonoidowe. Stwierdzono, że dodatek do medium eksperymentalnego chitosanu silnie hamuje wzrost zawiesiny, wywołując jednocześnie praktycznie całkowity zanik analizowanych związków w tkance. Elicytacja kultury za pomocą jasmonianu metylu nie powodowała natomiast wyraźnego pogorszenia jej parametrów wzrostowych, i co najistotniejsze stymulowała w umiarkowanym stopniu biosyntezę 7-O- β -glukozydu pseudobaptygeniny (ok. 26 % wzrost produktywności w stosunku do biomasy referencyjnej). Pozytywne efekty, w rozumieniu uzyskania znacznych ilości suchej masy (\approx 16 g l⁻¹) oraz stosunkowo wysokich stężeń izoflawonów (sumaryczna produktywność dla powyższych połączeń na poziomie 1,55 mg l⁻¹ d⁻¹), stwierdzono również w przypadku suplementacji zawiesiny *C. subternata* kwasem octowym zubożonym za pomocą wodorotlenku sodu (próba kontrolna dla elicytacji biomasy za pomocą chitosanu).

W rezultacie, spośród zastosowanych strategii stymulacji biosyntezy izoflawonów w biomasach miodokrzewu, najskuteczniejsze okazało się dokarmianie kultury zawiesinowej wodą kokosową oraz prowadzenie eksperymentu bez dostępu światła. Procedury związane z elicytacją, aczkolwiek wykazywały, zależnie od typu czynnika stresowego, pozytywne efekty w zakresie indukcji biosyntezy badanych

związków, jednak były one słabiej widoczne niż opisany powyżej zabieg dokarmiania komórek miodokrzewu wodą kokosową.

Strategia immobilizacji powierzchniowej zawiesiny *C. subternata* obejmowała dodatek do badanej kultury rozdrobnionej i oczyszczonej tkanki korkowej (*Quercus suber*) lub żywicy Amberlite™ XAD4. Wymienione zabiegi eksperymentalne miały na celu zwiększenie kontaktu między komórkami biomasy oraz imitację, w warunkach kultur *in vitro*, zróżnicowania tkankowego rośliny macierzystej. W efekcie, przeprowadzona immobilizacja miała spowodować podwyższenie poziomów akumulacji metabolitów wtórnych z grupy izoflawonów, a także zainicjować biosyntezę ksantonów i pochodnych benzofenonu, charakterystycznych dla surowca gruntowego.

Omawiane doświadczenia wykazały, że procedura immobilizacji nie wpływa w istotny sposób na przyrost zawiesiny *C. subternata*, powodując przy tym ok. 15 % wzrost produktywności kultury pod względem połączeń izoflawonoidowych. Wbrew oczekiwaniom, nie stwierdzono jednak różnic jakościowych w profilach metabolicznych biomasy immobilizowanej oraz podstawowej kultury zawiesinowej, co uzasadniałoby stosowanie opisanego zabiegu w dalszych doświadczeniach.

Podsumowując, w wyniku badań biotechnologicznych, na poziomie kultur wytrząsanych otrzymano biomasy zawiesinowe *C. subternata* o produktywności połączeń izoflawonoidowych na poziomie powyżej $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, co uzasadnia przeznaczenie niniejszego systemu roślinnego nawet do produkcji wielkoskalowej. W związku z tym, ostatni etap prac eksperymentalnych nad zawiesiną miodokrzewu stanowiło zwiększenie skali prowadzonej kultury, poprzez adaptację biomasy do wzrostu w bioreaktorze. Niniejsze zadanie badawcze było zarazem kluczowe dla realizacji podstawowego celu projektu, którym było uzyskanie roślinnego systemu *in vitro* do pozyskiwania wybranych związków polifenolowych. W ramach prowadzonych doświadczeń, opracowano instalację techniczną o charakterze bioreaktora mieszająco-napowietrzającego (*stirred-tank*), wykorzystywaną następnie do prowadzenia kultur zawiesinowych miodokrzewu. W dalszej kolejności, zoptymalizowano warunki do wzrostu zawiesiny badanego gatunku w fermentorze, dostosowując szybkość mieszania, poziom napowietrzenia kultury, a także stężenie tlenu rozpuszczonego oraz zawartość środka przeciwpiennego, do specyficznych wymagań testowanej biomasy.

Parametry wzrostowe kultur zawiesinowych *C. subternata*, prowadzonych w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, były zbliżone do biomas parenchymatycznych niniejszego gatunku rosnących w kolbach Erlenmeyera (w obydwu przypadkach maksymalna ilość DW wynosiła ok. 14 g l^{-1}). Zawiesina miodokrzewu zachowała, w opisanych warunkach, zdolność do akumulacji izoflawonów, których maksymalne stężenia (odpowiednio 154,03, 66,11 i 40,28 mg/100 g DW dla 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny) były porównywalne z zawartością wspomnianych połączeń w kulturach wytrząsanych.

W toku dalszych badań, postanowiono dodatkowo podwyższyć produktywność uzyskanego systemu względem izoflawonów (pierwotne wartości dla 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, wynosiły odpowiednio 0,70, 0,30 i 0,18 $\text{mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$), stosując wybrane strategie eksperymentalne, stymulujące wzrost biomasy i/lub biosyntezę wspomnianych połączeń w kulturach wytrząsanych

C. subternata. W tym celu, zawiesinę powyższego gatunku kultywowano w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, w warunkach całkowitej ciemności, suplementując dodatkowo pożywkę wodą kokosową. Maksymalne stężenia 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny wynosiły w opisywanym przypadku: 195,53, 90,19 i 45,48 mg/100 g DW, co odpowiadało produktywnościom wynoszącym odpowiednio 0,96, 0,44 i 0,22 mg l⁻¹ d⁻¹. Sumaryczna produktywność badanej kultury względem izoflawonów (1,62 mg l⁻¹ d⁻¹) wzrosła tym samym, na skutek zastosowanych zabiegów doświadczalnych, o ok. 37 %.

W rezultacie, opracowany system roślinny na bazie zawiesiny *C. subternata* namnażanej w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym można uznać za odpowiedni do produkcji rzadkich, metoksylowych połączeń izoflawonoidowych, metodami biotechnologicznymi.

Ze względu na całkowity brak, w kulturach parenchymatycznych *C. subternata*, połączeń z grupy ksantonów i pochodnych benzofenonu, w pracach eksperymentalnych ukierunkowanych na opracowanie systemów do pozyskiwania wybranych związków polifenolowych, wykorzystano również pędy *in vitro* *C. genistoides*, wykazujące zdolność do biosyntezy wspomnianych metabolitów szlaku szikimowego. Podobnie jak w przypadku biomas *C. subternata*, dla realizacji powyższego zadania kluczowe było uzyskanie kultur płynnych, ze względu na możliwość późniejszego zwiększenia skali doświadczenia z zastosowaniem bioreaktorów.

Jako źródło materiału biologicznego do inicjacji płynnych kultur pędowych *C. genistoides* wykorzystano mikropędy powyższego gatunku, rosnące na podłożu SH z dodatkiem 9,84 μ M 2iP, 1,0 μ M TDZ oraz 3,0 % (w/v) sacharozy. Eksplantaty roślinne umieszczano w płynnej pożywce SH, suplementowanej 4,92 μ M IBA (kwas indolilo-3-masłowy) i 1,5 % (w/v) sacharozy, wybranej w toku prac nad mikrorozmnażaniem *C. genistoides* jako optymalnej dla uzyskania żywotnych kultur o wysokiej zawartości ksantonów i pochodnych benzofenonu. Wobec całkowitego zamierania pędów opisywanego gatunku w warunkach hodowli wytrząsanych, badaną biomasę immobilizowano przy użyciu systemu LifeRaft[®], zapewniającego dobry dostęp tkanek roślinnych do składników podłoża, przy jednoczesnym ograniczeniu stresu mechanicznego.

Otrzymane płynne, stacjonarne kultury pędowe *C. genistoides* wykazywały, podobnie jak roślina macierzysta, zdolność do biosyntezy połączeń polifenolowych z grupy ksantonów, flawanonów i benzofenonów. Maksymalne zawartości mangiferyny, izomangiferyny, 3-C- β -glukozydu iriflofenonu i hesperydiny w badanej biomacie wynosiły odpowiednio: 1843,59, 712,02, 594,29 i 71,60 mg/100 g DW. Opisywane kultury akumulowały ponadto pochodne izoflawonowe (7-O- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), których stężenia obniżały się jednak w kolejnych dniach eksperymentu. Wyniki doświadczeń wskazywały tym samym na możliwość wykorzystania pędów *in vitro* *C. genistoides* do produkcji wybranych związków polifenolowych, w szczególności zaś ksantonów i pochodnych benzofenonu.

W celu zwiększenia skali kultur pędowych *C. genistoides*, badaną biomasę zaadaptowano do wzrostu w warunkach hodowli wielkolaboratoryjnych. Z uwagi na dużą wrażliwość pędów *in vitro* powyższego gatunku na stres mechaniczny,

opracowano instalację o charakterze bioreaktora okresowo-zalewowego (*temporary-immersion bioreactor*), wyposażoną w systemy immobilizacji biomasy, mieszania i napowietrzania, zapewniające prowadzenie kultur przy niskich siłach ścinających.

Pędy *in vitro* *C. genistoides*, kultywowane w bioreaktorze okresowo-zalewowym, charakteryzowały się tempem wzrostu zbliżonym do biomas rosnących w systemie LifeRaft[®], a także zwiększonymi poziomami akumulacji związków polifenolowych. Maksymalne stężenia mangiferyny, izomangiferyny, hesperydiny oraz 3-C- β -glukozydów iriflofenonu i makluryny wynosiły w danej kulturze odpowiednio 2622,70, 757,40, 344,77, 648,30 i 18,85 mg/100 g DW, co odpowiadało produktywnościom dla poszczególnych połączeń równym: 5,48, 1,58, 0,72, 3,04 oraz 0,06 mg l⁻¹ d⁻¹. W szczególności produktywności obliczone dla ksantonów (> 1 mg l⁻¹ d⁻¹), wskazują na możliwość wykorzystania opracowanego systemu hodowlanego do ciągłego pozyskiwania niniejszych metabolitów niezależnie od warunków środowiskowych.

Ze względu na wartości użytkowe roślin z rodzaju *Cyclopia*, a także trudności napotymane w czasie tradycyjnego, wegetatywnego rozmnażania omawianych gatunków, w ramach prowadzonych eksperymentów zdecydowano się na opracowanie procedury mikrorozmnażania wybranego miodokrzewu, tj. *C. genistoides*, wykorzystywanego powszechnie do produkcji herbaty „honeybush” i charakteryzującego się najwyższą spośród badanych roślin zawartością ksantonów.

Zoptymalizowana procedura mikropropagacji *C. genistoides* obejmowała multiplikację, elongację oraz ukorzenianie pędów, a także aklimatyzację zregenerowanych roślin. Na poszczególnych etapach mikrorozmnażania wykorzystano podłoża SH zmodyfikowane pod względem zawartości regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin oraz składników podstawowych, tj. sacharozy oraz soli mineralnych. Zregenerowane rośliny oraz eksplantaty uzyskane w poszczególnych fazach doświadczenia i reprezentujące różny stopień zróżnicowania morfologicznego, poddano analizom fitochemicznym pod względem zawartości polifenoli, porównując uzyskane wyniki z referencyjnym surowcem gruntowym.

Multiplikację pędów *C. genistoides* prowadzono na pożywce z dodatkiem 3,0 % (w/v) sacharozy, 9,84 μ M 2iP oraz 1,0 μ M TDZ, uzyskując przy tym wydajność 8,2 mikropędu/eksplantat. Namnożone pędy wydłużano na podłożu suplementowanym 1,5 % (w/v) sacharozy oraz 4,92 μ M IBA (kwas indolilo-3-masłowy), a następnie przenoszono na pożywkę stymulującą ryzogenezę. Największy odsetek pędów tworzących korzenie, wynoszący 54,8 %, uzyskano na podłożu z dodatkiem 1,5 % (w/v) sacharozy, 28,54 μ M IAA (kwas indolilo-3-octowy) oraz 260,25 μ M kwasu cytrynowego. Aklimatyzację zregenerowanych roślin prowadzono w warunkach szklarniowych, wykorzystując mieszaninę torfu, żwiru i perlitu (1:1:1 w/w/w), stwierdzając ich 80 % przeżywalność.

Skład jakościowy roślin zregenerowanych *C. genistoides* był pod względem połączeń polifenolowych identyczny z referencyjnym surowcem gruntowym. Uzyskane roślinki charakteryzowały się zarazem najwyższą zawartością mangiferyny i izomangiferyny (odpowiednio ok. 8300 i 2500 mg/100 g DW), spośród wszystkich badanych biomas. Analizy chromatograficzne wykazały ponadto, że stopień

zróznicowania tkankowego eksplantatów wywiera istotny wpływ na skład frakcji polifenolowej w kulturach pędowych *C. genistoides*. Mikropędy badanego gatunku zawierały niższe, w porównaniu z pędami poddanymi elongacji i roślinami zregenerowanymi, ilości ksantonów oraz hesperydiny, wykazując ponadto zdolność do akumulacji 3 połączeń izoflawonowych (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nieobecnych w roślinie macierzystej. Wyższe stężenia ksantonów i hesperydiny odnotowano z kolei w przypadku pędów poddanych elongacji oraz roślin zregenerowanych. Niezależnie od stopnia cytodyferencji, biomasy pędowe zachowały ponadto zdolność do akumulacji pochodnych benzofenonu, tj. 3-*C*- β glukozydów makluryny i iriflofenonu, charakterystycznych dla surowca gruntowego. Tym samym udowodniono bezpośredni wpływ statusu morfotycznego matrycy roślinnych z rodzaju *Cyclopia* na zawartość w nich polifenoli.

Zoptymalizowana metoda mikrorozmnażania *C. genistoides* stanowi alternatywę dla stosowanych obecnie tradycyjnych metod namnażania miodokrzewów. Z uwagi na dużą wydajność, opracowany sposób pozyskiwania wspomnianych roślin może zostać wykorzystany w celach komercyjnych, dostarczając sadzonek dla potrzeb upraw plantacyjnych. Opisany protokół namnażania miodokrzewów w warunkach *in vitro* można również stosować w celu odnowy populacji roślin z rodzaju *Cyclopia* zagrożonych wyginięciem.

Podsumowując, badania biotechnologiczne oraz fitochemiczne, przeprowadzone w ramach niniejszego projektu, umożliwiły realizację podstawowego celu pracy, którym było otrzymanie roślinnych systemów *in vitro* do pozyskiwania wybranych związków polifenolowych, w oparciu o kultury tkankowe endemicznych, południowoafrykańskich roślin z rodzaju *Cyclopia*. Opracowanie instalacji o charakterze bioreaktorów pozwoliło na wykorzystanie uzyskanych biomas do wybiórczej produkcji izoflawonów, ksantonów oraz pochodnych benzofenonu, stanowiąc zarazem kompletną realizację etapu *upstream* procesu biotechnologicznego. Kultury zawieszinowe *C. subternata*, prowadzone w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, charakteryzuje zdolność do wybiórczej produkcji 3 połączeń izoflawonowych (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nieobecnych w surowcu gruntowym powyższego gatunku. Pędy *in vitro* *C. genistoides*, rosnące w systemie okresowo-zalewowym, stanowią z kolei bogate źródło ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna) oraz pochodnych benzofenonu (3-*C*- β -glukozydy makluryny i iriflofenonu). Opracowane protokoły izolacji powyższych metabolitów, mogą być wykorzystane na etapie *downstream* procesu pozyskiwania ksantonów i bioflawonoidów w oparciu o kultury *in vitro* *Cyclopia* sp.

Summary

This doctoral thesis presented selected aspects of producing polyphenolic compounds: xanthenes, flavanones, isoflavones and benzophenone derivatives from *in vitro* cultures of endemic South African plants of the *Cyclopia* genus.

The theoretical section of this thesis consists of two chapters. The first one deals with the issues of botanical characteristics, application, chemical composition and biological activity of the investigated plants. The analysis of the literature data referred to above, made it possible to make a selection of species for the planned biotechnological research that were most valuable in terms of the accumulation of polyphenolic compounds, the general biological activity and economic viability. The second chapter presents selected problems involved in using bioreactors in the research of *in vitro* cultures of higher plants optimised for the production of secondary metabolites. This is the first compilation paper on this subject in which special attention is given to the use of bioreactors in specific experimental regimens designed to produce biologically active compounds from *in vitro* plant cultures. Emphasis was given to such aspect as species selection, culture type, type of accumulated compounds and the design of the fermentation tank. From the point of view of the biotechnological part of this work, it was particularly important to investigate the issues of choosing the right bioreactor for the given type of plant culture. Compared to microbiological cultures, *in vitro* biomasses of higher plants grown in large scale installations are highly diversified in terms of mechanical stress resistance and the required design of the growth tank, including the mixing technique and the saturation of the media with dissolved oxygen. The acquired information was key for the success of the experiments which included increasing the scale of the *in vitro* cultures of *Cyclopia* plants.

The second part of this doctoral thesis covers experiments into the accumulation of natural compounds: xanthenes, isoflavones, flavones, flavanones and benzophenone derivatives in tissue cultures of the selected honeybush plants. The overriding purpose of the project, i.e. to develop *in vitro* plant systems capable of producing the selected polyphenols, was completed by means of broadly understood biotechnological experiments including the initiation of *in vitro* cultures of *Cyclopia* species representing different morphological status, the selection of biomasses which produced highest amounts of the investigated secondary metabolites, the development of an experimental strategy ensuring high productivity of the systems and the increase of the production scale of the “super producers” by means of specially designed bioreactors.

Phytochemical research was an integral part of the scientific project, focussing on the qualitative and quantitative HPLC analyses of the polyphenolic fractions from the *Cyclopia in vitro* biomasses and intact plant materials. Using the separation conditions optimised during the experiments to identify polyphenols in the honeybush plants, biomasses were selected, and the experimental biotechnological strategies were chosen which in effect make it possible to obtain *in vitro* plant systems with the highest productivity of secondary metabolites. The planned phytochemical work also included the isolation and identification of previously unidentified polyphenolic components of

the intact plants, as well as new compounds, present only in *in vitro* cultures of *Cyclopia* plants.

Based on literature data, 3 species were selected for the experiments: *C. genistoides* (L.) Vent., *C. intermedia* E. Mey. and *C. subternata* Vogel, important from the economic point of view as the basic source of the raw material for the production of the honeybush tea, and also characterised by a rich set of polyphenolic compounds.

The first stage of the biotechnological experiments included the induction of callus and organ *in vitro* cultures of honeybush plants, optimising the conditions of continuous growth and assessment of the obtained biomasses in terms of their morphology (the level of cytodifferentiation, consistency, colour) and the rate of growth (growth index G_i). Since so far a tissue cultures of *Cyclopia* plants have not been conducted, at the initiation stage of the *in vitro* cultures it was necessary to empirically select both the *inoculum* and the growth medium resulting in vital biomasses with stable growth. The experimental media of choice were the so-called “rich” media, commonly used in the biotechnological research on higher plants, characterised with diverse content of mineral salts, carbohydrates, amino acids, vitamins (Schenk-Hildebrandt – SH and Murashige-Skoog – MS) and, depending on the purpose of the experiment (organogenesis or callus induction), differing content of growth regulators – auxins and cytokinins. Explants used to initiate *in vitro* cultures of *Cyclopia* sp. were root, hypocotyl or cotyledon sections, and top parts of sterile seedlings. The experiments covering the initiation and optimisation of the conditions for continuous biomass growth resulted in stable microshoot and callus cultures of *C. genistoides*, *C. intermedia* and *C. subternata*. The parenchymatic biomasses of honeybush plants required different composition of the optimised media: callus cultures of *C. intermedia* and *C. subternata* were grown on MS medium supplemented with 20.19 μM 4-PPU (*N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N*-phenylurea) and 1.96 μM 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid), while callus cultures of *C. genistoides* required SH medium supplemented with 20.19 μM 4-PPU and 2.27 μM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) for continued growth. Shoot cultures of all the investigated species were grown on SH medium supplemented with 9.84 μM 2iP (6- $\{\gamma\text{-}\gamma\text{-dimethylallylamino}\}$ -purine) and 1.0 μM TDZ (thidiazuron). During the experiment, there was no success in growing *de novo* roots of *Cyclopia* plants, probably due to specific requirements for symbiotic bacteria strains, needed to initiate rhizogenesis. Of all successful *in vitro* cultures, *C. subternata* callus was characterized by the best growth parameters ($G_i \approx 1200\%$) while the fastest growing organ cultures were the microshoots of *C. genistoides* ($G_i \approx 700\%$).

The *in vitro* cultures of *Cyclopia* sp. were evaluated for the accumulation of xanthenes and bioflavonoids, comparing the results with respective parts of the intact plants. It was possible to carry out this analysis thanks to the optimisation, as part of this project, of the conditions for extraction and purification of polyphenolic fractions from plant matrices of honeybush plants and the chromatographic methods for separation of all compound mixtures obtained in the experiments.

The samples for qualitative and quantitative tests were prepared by means of exhaustive extraction of plant matrices with methanol, followed by the purification of

initial extracts from non-polar ballast substances with chloroform. Considering the nature of the investigated secondary metabolites (polyphenols), the analytical technique of choice was high performance liquid chromatography. As a result of the experiments, for the first time conditions were developed for HPLC quantitative analyses of polyphenols in both intact plants and *in vitro* biomasses of *Cyclopia* sp. The complete separation of the components of the selected set of metabolites was achieved in reversed phase system, using C18 column and gradient elution, with mobile phase composed of acetonitrile, water and formic acid. Individual compounds were identified by LC-DAD and LC-ESI-MS spectra, and by co-chromatography with authentic standards. Quantitative determination was performed using an UV-DAD detector. The optimised HPLC method was validated by defining linearity ranges, limits of detection and quantification, intra- and interday precision and accuracy, for individual polyphenolic compounds. The resulting analytical procedure was successfully used in the qualitative and quantitative screening of xanthenes and bioflavonoids found in intact plants and *in vitro* cultures of *Cyclopia* plants.

The integral part of the phytochemical experiments, carried out as part of this project, were preparative works aiming to isolate and identify previously unidentified polyphenolic components of the herb and the *in vitro* biomass of honeybush plants. They included obtaining fractions that were free of ballast substances, but also extracts enriched in selected secondary metabolites. For this purpose, methanol extracts were purified with chloroform in the same way as during the screening quantitative analyses, and then they were subjected to fractional extraction with ethyl acetate. The individual components of the polyphenolic set were isolated by normal-phase, gravitational column chromatography and/or semipreparative, reversed-phase high performance liquid chromatography. During the experiment, a novel way to separate xanthenes and bioflavonoids, with the use of two serially connected semipreparative monolithic C18 columns, was used for the first time. Thanks to the procedures described here, it was possible to isolate from the individual plant matrices as many as thirteen polyphenolic compounds (including 7 previously not described in *Cyclopia* genus), whose identity was then defined by one- and two-dimensional ¹H and ¹³C NMR experiments and using combined LC-DAD and LC-ESI-MS techniques.

During the phytochemical experiments, 3 isoflavone derivatives that had never been found in *Cyclopia* plants (7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin), were isolated for the first time from *C. subternata* callus. Three polyphenolic compounds previously unidentified in honeybush plants were also obtained from unfermented intact plant material of the above species. These were: iriflophenone 3-*C*- β -glucoside, phloretin 3',5'-di-*C*- β -glucoside and isorhoifolin (apigenin 7-*O*-rutinoside). The first two of these compounds, which belong to benzophenones and dihydrochalcones, respectively, are also the first metabolites of this type identified in *Cyclopia* plants. Apart from these polyphenols, 3 rutinosides were also isolated from unfermented intact plant material of *C. subternata*: hesperidin (hesperetin 7-*O*-rutinoside), scolymoside (luteolin 7-*O*-rutinoside) and narirutin (naringenin 7-*O*-rutinoside), as well as considerable amounts of the xanthone – mangiferin.

During preparative work, a simple and efficient way of obtaining xanthenes (mangiferin and its position isomer – isomangiferin) from unfermented parts of *C. genistoides* was developed for the first time. These compounds were obtained in pure form, using only fractional extraction of the primary extracts and the differences in the solubility of the investigated compounds. Moreover, using reversed-phase semipreparative HPLC, for the first time, 2 benzophenone derivatives were obtained from the above plant: 3-*C*- β -glucosides of maclurin and iriflophenone.

The optimized method for chromatographic separation of polyphenolic compounds found in honeybush plants was used for qualitative analysis of intact plant material and *in vitro* biomasses of *Cyclopia* sp. for the presence of phenylpropane derivatives and compounds isolated during preparative work.

Initially, the content of xanthenes and bioflavonoids in the unfermented and fermented herb of *C. genistoides*, *C. subternata* and *C. intermedia* was determined. The first of these species constituted, irrespective of the status of the material, the richest source of mangiferin (ca. 5250-7000 mg/100 g DW) and isomangiferin (ca. 1450-1900 mg/100 g DW) of all the investigated plants. Unfermented intact material of *C. genistoides* had the highest concentrations of maclurin 3-*C*- β -glucoside (ca. 280 mg/100 g DW) and iriflophenone 3-*C*- β -glucoside (ca. 830 mg/100 g DW). Unfermented herb of *C. subternata*, with the highest concentration of hesperidin (ca. 1950 mg/100 g DW) of all investigated materials, also accumulated significant amounts of eriocitrin (ca. 470 mg/100 g DW), scolymoside (ca. 520 mg/100g DW) and phloretin 3',5'-di-*C*- β -glucoside (ca. 510 mg/100 g DW). The herb of *C. intermedia* was the only one to contain a flavanone didymin (isosakuranetin 7-*O*-rutoside), which was accumulated in the unfermented and fermented material at ca. 800 and 380 mg/100 g DW, respectively. The presence of this compound in *C. intermedia* was also determined for the first time during LC-DAD and LC-ESI-MS analysis which was part of this project. Apart from didymin, the above plant material after fermentation was the only one to contain significant amounts of the flavanone hesperetin (ca. 100 mg/100 g DW).

The chromatographic analysis confirmed the unfavourable effect of fermentation on the amount of polyphenolic compounds in the herb of *Cyclopia* plants. One exception was provided by fermented intact plant of *C. genistoides* which, as its unfermented form, proved to be a rich source of mangiferin and isomangiferin.

HPLC analysis showed that growing *Cyclopia* plants as tissue cultures caused a significant change in the biosynthetic pathways of polyphenolic compounds characteristic for the investigated species. The *in vitro* biomasses of *Cyclopia* sp. largely maintained the ability to accumulate secondary metabolites typical for the intact plants. In callus cultures of honeybushes no xanthenes (mangiferin and isomangiferin), or benzophenone derivatives (3-*C*- β -glucosides of iriflophenone and maclurin) were identified, which are typical for the intact plant. *C. subternata* callus was the only parenchymatic culture which was able to produce hesperidin and 3 isoflavonoid derivatives (7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin), not present in the intact plant. Unlike the unorganised biomasses, *in vitro* shoots of all the investigated species accumulated both the metabolites of the shikimate pathway (xanthenes and benzophenones), as well as the isoflavone glucosides.

Further stages of the biotechnological experiments were focussed on obtaining *in vitro* plant systems capable of selective production of significant amounts of the selected xanthenes and bioflavonoids, based on the honeybush plant cultures. To increase the accumulation of the various polyphenols in the *in vitro* biomasses, the broadly understood growth conditions were modified. The modifications included changing the physical parameters of the experiment (lighting, temperature), the culture models (liquid or stationary) as well as elicitation, immobilisation and other retrobiosynthetic strategies (supplementing the media with biosynthesis precursors or nutrient complexes). The experiments used *C. subternata* callus and *C. genistoides* microshoots, characterised with the best growth parameters among the obtained *in vitro* biomasses, as well as the ability to accumulate the selected compounds of the xanthone, flavanone and isoflavone group and benzophenone derivatives.

The experiments on the effect of physical factors on biomass growth and the accumulation of polyphenols in *Cyclopia* sp. *in vitro* cultures used the fast growing *C. subternata* callus which was a rich source of isoflavones (7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin). This culture was grown under varied lighting regimes (total darkness, constant lighting with daylight spectrum and filter-modified light: red, yellow and blue), and subjected to stress inducing factors, such as UVC radiation and higher (29 °C) or lower (13 °C) temperature, compared to standard growth conditions.

The experiments demonstrated that the lighting conditions did not have a significant effect on growth rate or vitality of the *C. subternata* callus, as shown by the similar biomass growth index values calculated for the various experimental modifications ($G_i \approx 1000$ -1300 %). It was found that the presence of light stimulated the biosynthesis of hesperidin and isoflavones in the callus culture of the investigated species. The identified amounts of this flavanone, as well as 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin were 85.13, 26.25, 14.71 and 8.08 mg/100 g DW in this case. It was proved, however, that exposure of the biomass to light was not necessary for the initiation of the biosynthesis of the investigated compounds, as demonstrated by their presence in the *C. subternata* callus grown in total darkness (concentration of hesperidin and 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin respectively: 16.11, 14.07, 8.63 and 4.52 mg/100 g DW). Of the experimental strategies which involved using colour filters, the best results in terms of polyphenols biosynthesis stimulation was under blue light (increased concentration of hesperidin and 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin respectively by 39, 10, 30 and 28 % compared to biomass grown under unfiltered light). Irrespective of the type of lighting, larger concentrations of isoflavones in callus cultures exposed to light were observed on the 14th day of the growth cycle, hesperidin on the 28th day. Growing cultures in darkness caused a clear change in the production profile of the biomass in terms of polyphenols, in that the maximum accumulation of all metabolites occurred later in the experimental cycle.

It was found that the exposition of *C. subternata* callus to UVC, depending on the moment of application of this stress factor, had a clear effect on the biomass growth and the biosynthesis of polyphenolic compounds. The use of UVC on inoculations day,

which in terms of the growth cycle was the adaptation phase, deteriorated the callus growth parameters and decreased the concentration of the investigated secondary metabolites. On the other hand, exposing the parenchymatic biomass of *C. subternata* to UVC on day 20 of the experiment did not have any detrimental effect on culture growth, while it stimulated the biosynthesis of polyphenols. The concentrations of hesperidin and 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin on day 28 of the experiment were respectively: 204.16, 31.84, 18.09 and 8.32 mg/100g DW. The above procedure led to the production of large amounts of biomass with high accumulation of the investigated bioflavonoids.

Exposing *C. subternata* callus to thermal shock by lowering or increasing the temperature resulted in strong inhibition of biomass growth and higher concentrations of hesperidin and isoflavones. Cultures grown in low temperature had especially high concentration of calycosin 7-*O*- β -glucoside (235.30 mg/100 g DW), while those grown in high temperature – hesperidin and pseudobaptigenin 7-*O*- β -glucoside (55.00 and 84.55 mg/100 g DW, respectively).

The experiments into the effect of physical factors on the metabolism of *C. subternata* callus cultures showed that the diversified lighting or temperature and exposure of callus cultures to UVC results in significant changes in the polyphenolic set found in the given biomass. The most effective stimulation of the biosynthesis of secondary metabolites was by the application of stress factors in the form of temperature changes and ultraviolet radiation. The practical application of these experimental strategies for achieving the primary goal of this project, i.e. developing a highly productive *in vitro* system producing selected polyphenols was, however, limited due to their detrimental effect on tissue growth.

The following experimental task was to establish suspension cultures from *C. subternata* callus biomass. This was done to make a precise identification of the characteristics of the produced biomass in terms of primary (growth) and secondary metabolism (polyphenols production) and carry out controlled biotechnological procedures on elicitation, supplementation and immobilization of suspension cells in order to enhance the productivity of the *in vitro* system.

The honeybush suspension was established by means of mechanical dispersion of parenchymatic callus of the investigated plant, placed in MS medium supplemented with 20,19 μ M 4-CPPU and 1.96 μ M 2,4,5-T (growth medium developed for this particular callus). Growth profiles were determined for the liquid suspension culture, based on the changes in fresh (FW) and dry weight (DW) and the growth index (Gi) in the growth cycle. Concentrations of polyphenolic compounds were determined in the biomasses collected on the subsequent days of the experiment.

Suspension cultures of *C. subternata* had fast and intensive growth (Gi \approx 1200 %) and they were able to biosynthesize 3 isoflavone glucosides, previously identified in the callus of this species. Due to the complete absence of hesperidin, this biomass constituted a selective source of these compounds. The maximum concentrations of 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin, stored entirely intracellularly, was respectively: 148.00, 76.00 and 99.00 mg/100 g DW,

which corresponded to respective productivity of these compounds of: 0.74, 0.31 and 0.49 mg l⁻¹ d⁻¹.

Given the significant role of lighting in the biosynthesis of isoflavonoids in *C. subternata* callus, and the expected change in light intensity after the suspension is later adapted to grow in a bioreactor (difficulties in providing light in large scale installations), an experiment was carried out where the biomass was grown in total darkness. The experiment showed that liquid cultures of *C. subternata*, grown in the dark, have similar growth parameters as the biomass grown in daylight. Maximum concentrations of 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin were respectively: 275.00, 126.80 and 145.00 mg/100 g DW. The productivity of the above isoflavones in this biomass at 1.27, 0.58 and 0.68 mg l⁻¹ d⁻¹, were also higher than in the reference culture, respectively by ca. 72, 87 and 29 %.

The retrobiosynthetic strategies applied to stimulate primary (biomass growth) and secondary metabolism (biosynthesis of polyphenolic compounds) in *C. subternata* suspension cultures included supplementing the investigated cells with nutrients (casein hydrolysate and coconut water) or a distant precursor of the biosynthesis of bioflavonoids (phenylalanine) Of the above experimental variants, the best results were observed after supplementing the media with coconut water. The result of this procedure was a higher dry weight (ca. 16 g l⁻¹; ca. 14 % more than in the base culture), with high concentrations of 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin (158.96, 99.95 and 74.54 mg/100 g DW respectively). The total productivity of isoflavonoids was 1.80 mg l⁻¹ d⁻¹, which constitutes a ca. 17 % increase from the base culture.

Unlike nutrient supplementation, using chitosan or methyl jasmonate (classic elicitors with documented effectiveness in stimulating the biosynthesis of isoflavones in *in vitro* cultures of higher plants) in *C. subternata* suspension culture failed to cause spectacular increase of biomass productivity in terms of isoflavonoids. It was found that the addition of chitosan to the media strongly inhibited suspension growth, causing almost complete disappearance of the analysed compounds from the tissue. Culture elicitation by methyl jasmonate, on the other hand, did not visibly deteriorate its growth parameters and, what is important, mildly stimulated the biosynthesis of pseudobaptigenin 7-*O*- β -glucoside (ca. 26 % higher productivity compared to the reference biomass). Positive effects in the form of high amounts of dry weight (\approx 16 g l⁻¹) and relatively high concentrations of isoflavones (total production of these compounds at 1,55 mg l⁻¹ d⁻¹), was also seen after the *C. subternata* suspension was supplemented with acetic acid neutralised with sodium hydroxide (control procedure for the elicitation of the biomass with chitosan).

In effect, of the strategies applied to stimulate the biosynthesis of isoflavones in honeybush biomass, the most effective proved to be the supplementation of the suspension with coconut water and the total darkness regime. The procedures involving elicitation, even though they showed, depending on the stress factor, some positive biosynthesis induction effect, were less prominent than feeding the *C. subternata* cells with coconut water.

The strategy of surface immobilization of the *C. subternata* suspension involved adding ground cork tissue (*Quercus suber*) or Amberlite™ XAD4 resin to the investigated culture. The purpose of these experimental procedures was to increase contact between the cells in the biomass and to imitate *in vitro* the tissue diversity of the intact plant. The immobilization was expected to increase the accumulation of isoflavones and to initiate the biosynthesis of xanthenes and benzophenone derivatives, typical for the intact plant.

The experiments showed that immobilization had no significant effect on the growth of *C. subternata* suspension but caused a ca. 15 % higher isoflavonoids productivity. Contrary to the expectations, no qualitative differences in the metabolic profiles were seen between the immobilized biomass and the base suspension culture, that would justify the use of this procedure in further experiments.

In summary, as a result of the biotechnological experiments at the level of liquid cultures, suspension biomasses of *C. subternata* were obtained which produced isoflavonoids in amounts exceeding $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, which justifies upgrading this plant system to large scale production. In view of the above, the last stage of the experiments on the honeybush suspension culture focussed on upgrading the scale of the culture by adapting the biomass for growth in a bioreactor. This research task was also key for the main goal of the project, which was to develop a plant *in vitro* system to produce selected polyphenolic compounds. In the course of the experiments, a technical installation was developed in the form of a stirred-tank bioreactor, which was then used to grow honeybush suspension cultures. Next, the conditions for suspension growth in the fermentation tank such as stirring speed, aeration level and the concentrations of dissolved oxygen and anti-foaming agent, were optimised by adjusting them to the specific requirements of the tested biomass.

The growth parameters of *C. subternata* suspension cultures in the stirred-tank bioreactor were similar to the parenchymatic biomasses of this species grown in Erlenmeyer flasks (in both cases maximum DW was ca. 14 g l^{-1}). The honeybush suspension maintained in these conditions its ability to accumulate isoflavones, with maximum concentrations (154.03, 66.11 and 40.28 mg/100 g DW respectively for 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin) comparable with the accumulation of these compounds in liquid suspension cultures.

During further experiments, to increase isoflavone productivity of the system (original values for 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin, were respectively 0.70, 0.30 and 0.18 $\text{mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$), selected experimental strategies were used to stimulate biomass growth and/or the biosynthesis of these compounds in *C. subternata* suspension cultures. The suspension was cultivated in a stirred-tank bioreactor under total darkness and the medium was supplemented with coconut water. Maximum concentrations of 7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin were in this case respectively: 195.53, 90.19 and 45.48 mg/100 g DW, which corresponded to respective productivity of 0.96, 0.44 and 0.22 $\text{mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Thus, the total isoflavones productivity ($1.62 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) increased, as a result of the experimental procedures, by ca. 37 %.

In effect, the plant system based on *C. subternata* suspension cultures grown in a stirred-tank bioreactor can be considered as an appropriate biotechnological method for the production of rare methoxylated isoflavonoids.

Given the complete absence of xanthenes and benzophenone derivatives in parenchymatic cultures of *C. subternata*, the experiments aiming to develop systems producing selected polyphenolic compounds also used *in vitro* cultures of *C. genistoides* shoots which demonstrate the capability of producing metabolites of the shikimate pathway. As was the case with *C. subternata* biomasses, the key task here was to develop liquid cultures which would be upgradable for use in large scale bioreactors.

To initiate liquid shoot cultures of *C. genistoides*, microshoots were used as the source of biological material and these were grown on SH media supplemented with 9.84 μM 2iP, 1.0 μM TDZ and 3.0 % (w/v) sucrose. Plant explants were placed in liquid SH medium supplemented with 4.92 μM IBA (indole-3-butyric acid) and 1.5 % (w/v) sucrose, selected in the course of research into the micropropagation of *C. genistoides* as the optimum medium to obtain vital cultures with high concentration of xanthenes and benzophenone derivatives. Given the total necrosis of the shoots of this species in typical liquid cultures, the biomass was immobilized with LifeRaft[®] system, giving plant tissues good access to medium components, while limiting mechanical stress.

The obtained liquid stationary shoot cultures of *C. genistoides* demonstrated, like the intact plant, the capability to biosynthesise polyphenolic compounds – xanthenes, flavanones and benzophenones. Maximum concentrations of mangiferin, isomangiferin, iriflophenone 3-*C*- β -glucoside and hesperidin in the investigated biomass were respectively: 1843.59, 712.02, 594.29 and 71.60 mg/100 g DW. The described cultures also accumulated isoflavone derivatives (7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin), however, their concentrations lowered with subsequent days of the experiment. Thus the results indicated that *in vitro* cultures of *C. genistoides* shoots could be used to produce the selected polyphenolic compounds, and in particular xanthenes and benzophenone derivatives.

In order to upgrade the scale of *C. genistoides* shoot cultures, the investigated biomass was adapted to grow in large scale laboratory conditions. Given the high sensitivity of *in vitro* shoots of this species to mechanical stress, an installation was designed in the form of a temporary-immersion bioreactor, fitted with biomass immobilization, stirring and aeration systems that ensure low shearing forces.

In vitro shoots of *C. genistoides* cultivated in the temporary-immersion bioreactor had similar growth rates as the biomasses grown in the LifeRaft[®] system and had increased accumulation of polyphenolic compounds. Maximum concentration of mangiferin, isomangiferin, hesperidin and 3-*C*- β -glucosides of iriflophenone and maclurin in this culture were respectively 2622.70, 757.40, 344.77, 648.30 and 18.85 mg/100 g DW, which corresponded to respective productivity of: 5.48, 1.58, 0.72, 3.04 and 0.06 mg l⁻¹ d⁻¹. In particular, the productivity calculated for xanthenes (> 1 mg l⁻¹ d⁻¹) indicate the potential to use this growth system for continued production of these metabolites, independently of environmental conditions.

Given the utility value of *Cyclopia* plants and the difficulties encountered in traditional, vegetative reproduction of these species, during the project a

micropropagation procedure was developed for the selected *Cyclopia* species, i.e. *C. genistoides*, a plant which is commonly used to produce the honeybush tea and is characterized by the highest concentration of xanthenes among all the investigated plants.

The optimised micropropagation procedure of *C. genistoides* included shoot multiplication, elongation, root formation, and later acclimatization of the regenerated plants. At various stages in the micropropagation process, SH medium was used that was modified in terms of the content of growth regulators – auxins and cytokinins, and the base components, i.e. sucrose and mineral salts. The regenerated plants and the explants obtained at various phases of the experiment, representing different level of morphological differentiation, underwent phytochemical analyses to determine the concentrations of the respective polyphenols. The obtained results were compared with the reference intact plant material.

The *C. genistoides* shoots were multiplied on the medium supplemented with 3.0 % (w/v) sucrose, 9.84 μM 2iP and 1.0 μM TDZ, with the productivity of 8.2 microshoot per explant. The multiplied shoots were elongated on medium supplemented with 1.5 % (w/v) sucrose and 4.92 μM IBA, and then transferred onto rhizogenesis stimulating medium. The highest ratio of root formation (54.8 %) was achieved on medium supplemented with 1.5 % (w/v) sucrose, 28.54 μM IAA (indole-3-acetic acid) and 260.25 μM citric acid. The acclimatization of the regenerated plants was conducted in greenhouse conditions, using a mixture of peat, gravel and perlite (1:1:1 w/w/w) with recorded 80 % survival rate.

The qualitative content of polyphenolic compounds in the regenerated *C. genistoides* plants was identical to reference intact plant material. The plantlets had the highest concentration of mangiferin and isomangiferin (ca. 8300 and 2500 mg/100 g DW respectively), among all investigated biomasses. Moreover, chromatographic analysis indicated that the level of tissue differentiation of the explants had a significant effect on the composition of the polyphenolic fraction in *C. genistoides* shoot cultures. The microshoots of this species had lower concentrations of xanthenes and hesperidin, compared to elongated shoots and regenerated plants, and they also demonstrated the capability to accumulate 3 isoflavones (7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin), which were absent in the intact plant. On the other hand, higher concentrations of xanthenes and hesperidin, were noted in elongated shoots and regenerated plants. Irrespective of the degree of cytodifferentiation, shoot biomasses maintained the ability to accumulate benzophenone derivatives, i.e. 3-*C*- β glucosides of maclurin and iriflophenone, characteristic for the intact plant material. This demonstrated a direct effect of the morphological status of *Cyclopia* biomasses on the concentration of polyphenols they accumulate.

The micropropagation method optimised for *C. genistoides* is an alternative for traditional methods of honeybush propagation that are currently used. Given the high productivity, this method may be used commercially to produce plantlets for agricultural plantations. The protocol of micropropagating honeybush plants *in vitro* described here can also be used to rebuild *Cyclopia* plant populations that are endangered with extinction.

Summing up, the biotechnological and phytochemical research carried out under this project resulted in achieving its main goal, namely, the development of *in vitro* plant system to produce selected polyphenolic compounds, using tissue cultures of endemic, South African plants of the *Cyclopia* genus. The development of bioreactor installations resulted in using the previously obtained biomasses to selectively produce isoflavones, xanthenes and benzophenone derivatives, constituting at the same time a complete *upstream* implementation of the biotechnological process. Suspension cultures of *C. subternata* grown in a stirred-tank bioreactor are characterised by the capability of selectively producing 3 isoflavones (7-*O*- β -glucosides of calycosin, pseudobaptigenin and formononetin) absent in the intact plant material of this species. *In vitro* shoots of *C. genistoides* grown in a temporary-immersion bioreactor constitute a rich source of xanthenes (mangiferin and isomangiferin) and benzophenone derivatives (3-*C*- β -glucosides of maclurin and iriflophenone). The protocols for isolating secondary metabolites developed here, can be used at the *downstream* stage in the process of producing xanthenes and bioflavonoids from *in vitro* cultures of *Cyclopia* sp.

Wyniki i wnioski

Poniżej przedstawiono, w formie numerowanej listy, zestawienie najistotniejszych wyników badań wchodzących w zakres niniejszej pracy doktorskiej. Rezultaty doświadczeń biotechnologicznych oraz prowadzonych równolegle analiz fitochemicznych, pozwoliły na sformułowanie wniosków końcowych (oznaczonych punktami), dotyczących poszczególnych etapów prac eksperymentalnych.

Badania biotechnologiczne

1. Wyprowadzono, po raz pierwszy, kultury *in vitro* trzech gatunków endemicznych, południowoafrykańskich krzewów: *Cyclopia intermedia* E. Mey., *Cyclopia subternata* Vogel i *Cyclopia genistoides* (L.) Vent.
2. Testowanie, na etapie inicjacji kultur tkankowych, mediów hodowlanych różniących się zawartością makro- i mikroelementów, aminokwasów, witamin, oraz regulatorów wzrostu, wskazało na zindywidualizowane wymagania poszczególnych gatunków miodokrzewów co do składu podłoża wzrostowego.
3. W zoptymalizowanych warunkach wyprowadzono, a następnie dostosowano do hodowli ciągłej kultury kalusowe oraz pędowe wszystkich objętych projektem gatunków. W zastosowanych schematach eksperymentalnych nie udało się otrzymać korzeni odciętych badanych miodokrzewów. W ostatecznej wersji stabilne mikropędy wybranych do doświadczeń roślin kultywowano na pożywce Schenk-Hildebrandta (SH) suplementowanej 9,84 μM 2iP ((6- γ,γ -dimetyloallilo)-aminopuryna) i 1,0 μM TDZ (tidiazuron), kultury kalusowe *C. genistoides* – na podłożu SH z dodatkiem 20,19 μM 4-PPU (N-(2-chloro-4-pirydylo)-N'-fenyloamocznik) i 2,27 μM 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy), zaś tkanki przyranne *C. intermedia* i *C. subternata* – na pożywce Murashige'a-Skooga (MS), wzbogaconej 20,19 μM 4-PPU i 1,96 μM 2,4,5-T (kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy).
4. Spośród kultur parenchymatycznych, najszybszym przyrostem charakteryzował się kalus *C. subternata* (współczynnik $G_i \approx 1200\%$), biomasą organową o najlepszych parametrach wzrostowych były zaś mikropędy *C. genistoides* ($G_i \approx 700\%$).
5. Otrzymane kultury *in vitro* roślin z rodzaju *Cyclopia* zachowały w różnym stopniu zdolność do biosyntezy wtórnych metabolitów szlaku fenylopropanoidowego, charakterystycznych dla gatunków macierzystych. W wyniku introdukcji poszczególnych roślin do kultur tkankowych doszło do zmiany szlaków metabolicznych połączeń polifenolowych występujących w warunkach gruntowych. W biomasach kalusowych miodokrzewów nie stwierdzono obecności ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna), a także pochodnych benzofenonu (3-C- β -glukozydy iriflofenonu i makluryny), charakterystycznych dla roślin macierzystych. Kalus *C. subternata* zachował zdolność do akumulacji hesperydyny, a także jako jedyny wyróżniał się biosyntezą trzech nowych połączeń izoflawonowych (7-O- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nie występujących w

surowcu gruntowym. Kultury pędowe *in vitro* wszystkich badanych gatunków wykazywały natomiast zdolność do produkcji typowych dla roślin macierzystych ksantonów oraz benzofenonów, a także pochodnych izoflawonoidowych właściwych dla szlaków metabolicznych występujących jedynie w kulturach *in vitro* miodokrzewów.

- Na podstawie przeprowadzonych badań można uznać, że rośliny z rodzaju *Cyclopia* wyjątkowo trudno wprowadzić do kultur *in vitro* (ponad roczny cykl eksperymentów biotechnologicznych; brak sukcesu w zakresie otrzymania biomas korzeniowych). Jedynie żmudne badania empiryczne, obejmujące dobór eksplantatów inicjalnych oraz dziesiątki przetestowanych podłoży wzrostowych, charakteryzujących się zmienną kompozycją regulatorów wzrostu, pozwoliły na wyprowadzenie kultur pędowych oraz kalusowych miodokrzewów zdolnych do ciągłego wzrostu i tym samym stanowiących pulę materiału biologicznego do prowadzenia szeroko pojętych eksperymentów biotechnologicznych.
- Wyniki doświadczeń dowiodły, że odmienne wymagania poszczególnych biomas *in vitro* *Cyclopia* sp., dotyczące podstawowego składu pożywek hodowlanych oraz regulatorów wzrostu, wynikają zarówno ze specyficznych cech gatunkowych badanych roślin, jak i stopnia zróżnicowania morfologicznego prowadzonej kultury.
- W wyniku przeprowadzonych fitochemicznych badań skryningowych stwierdzono, że uzyskane kultury *in vitro* miodokrzewów, ze względu na szeroki profil metaboliczny w zakresie produkcji związków polifenolowych, w tym unikalnych izoflawonów, stanowią odpowiednie matryce roślinne do prowadzenia eksperymentów biotechnologicznych mających na celu otrzymanie systemów *in vitro* do produkcji wybranych wtórnych metabolitów.
- Udowodniono, że akumulacja związków polifenolowych w wyprowadzonych kulturach tkankowych *Cyclopia* sp. uzależniona jest od stopnia cytodyferencjacji badanych biomas, a także od indywidualnych cech gatunkowych poszczególnych roślin (brak produkcji ksantonów i benzofenonów w kulturach parenchymatycznych miodokrzewów). Rezultaty doświadczeń wskazują jednoznacznie na zmianę szlaków biosyntezy polifenoli, spowodowaną wprowadzeniem miodokrzewów do kultur *in vitro*, co przejawiało się produkcją nieobecnych w roślinach macierzystych glukozydów izoflawonowych. Jeżeli by introdukcję roślin do kultur *in vitro* uznać jako zaistnienie warunków stresowych (wyjaławianie i cięcie roślin), to pojawienie się w profilu metabolicznym kalusów *C. subternata* połączeń izoflawonoidowych (uznane fitoaleksyny lub fitoantycypiny) należałoby rozpatrywać nie tylko jako skutek braku właściwego statusu morfologicznego w badanych biomasach, ale również jako efekt zastosowania specyficznej formy elicytacji.
- Wyniki przeprowadzonych eksperymentów, w zakresie wzrostu biomas oraz akumulacji związków polifenolowych, pozwoliły na wyselekcjonowanie kalusa *C. subternata* oraz mikropędów *C. genistoides*, do dalszych etapów prac doświadczalnych. Ze względu na szybki wzrost oraz obecność trzech unikatowych

połączeń izoflawonoidowych, obydwie kultury są wyjątkowo korzystne do prowadzenia eksperymentów biotechnologicznych, ukierunkowanych na otrzymanie cennych metabolitów roślinnych w warunkach całkowicie niezależnych od środowiska. W przypadku mikropędów *C. genistoides*, do wspomnianych powyżej cech dochodzi jeszcze zdolność badanej biomasy do produkcji ksantonów i benzofenonów, charakterystycznych dla rośliny macierzystej. Różnorodność metaboliczna wyselekcjonowanych kultur uzasadnia więc stosowanie w doświadczeniach szeregu strategii hodowlanych, dedykowanych wybiórczo dla biomas o zróżnicowanym statusie morfotycznym i pozwalających ostatecznie na uzyskanie systemów *in vitro* o znacznie zwiększonej produktywności w zakresie wybranych połączeń polifenolowych.

6. Cykl doświadczeń biotechnologicznych, mających na celu określenie wpływu zmiennych warunków hodowli na profil metaboliczny kalusa *C. subternata* wykazał, że biomasy miodokrzewu charakteryzują się, niezależnie od zastosowanego schematu oświetlenia (całkowita ciemność oraz światło o spektrum dziennym lub modyfikowanym za pomocą filtrów barwnych), dużą żywotnością (rozumianą jako brak zmian nekrotycznych) i dobrymi parametrami wzrostowymi ($G_i > 1000\%$).
7. Kultury kalusowe *C. subternata* wykazywały, niezależnie od zastosowanych warunków oświetleniowych, zdolność do akumulacji flawanonu hesperydyny oraz połączeń izoflawonowych. Stwierdzono natomiast wpływ wymienionych strategii eksperymentalnych, na ilościową zawartość poszczególnych metabolitów wtórnych. Maksymalne stężenia hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, w biomacie rosnącej przy świetle białym (odpowiednio 85,13, 26,25, 14,71 i 8,08 mg/100 g DW), były wyższe od poziomów akumulacji danych połączeń w kulturze kalusowej prowadzonej w całkowitej ciemności (odpowiednio 16,11, 14,07, 8,63 i 4,52 mg/100 g DW). Ponadto, największą, w opisywanym cyklu doświadczeń, zawartość hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny (odpowiednio 118,01, 28,74, 19,26 i 10,32 mg/100g DW), odnotowano w przypadku tkanki przyrannej *C. subternata* kultywowanej w warunkach światła niebieskiego.
8. Przy dostępie do światła (spektrum dzienne lub modyfikowane filtrami barwnymi), izoflawony biosyntezywane były intensywnie w pierwszym etapie cyklu wzrostowego biomas *C. subternata* (maksymalna zawartość – 14 dzień eksperymentu) zaś hesperydyna w końcowej fazie doświadczenia (maksymalne stężenie – 28 dzień hodowli). W przypadku całkowitej ciemności wszystkie oznaczane metabolity polifenolowe akumulowane były w największych ilościach w 28 dniu doświadczenia.
9. Naświetlanie kalusa *C. subternata* promieniami UVC w fazie adaptacyjnej (dzień inokulacji), spowodowało wyraźne zahamowanie wzrostu badanej biomasy. Nasilenie powyższego zjawiska było mniejsze w przypadku aplikacji promieniowania ultrafioletowego w 10 lub 20 dniu cyklu wzrostowego.

10. Aplikacja promieniowania ultrafioletowego w fazie adaptacyjnej wiązała się z obniżeniem poziomów akumulacji polifenoli w kalusie *C. subternata*, zaś naświetlanie tkanki przyrannej w dniu 20 spowodowało wyraźny wzrost ich zawartości (maksymalne stężenia hesperydyny oraz 7-O- β -glukozydów kalikozyiny, pseudobaptygeniny i formononetyny wynosiły odpowiednio 204,16, 31,84, 18,09 i 8,32 mg/100g DW).
 11. Poddanie kalusa *C. subternata* szokowi termicznemu, w postaci niskiej, bądź podwyższonej temperatury, silnie zahamowało wzrost badanej biomasy, co w przypadku wysokiej temperatury łączyło się z wystąpieniem wyraźnie zaznaczonych zmian nekrotycznych.
 12. Podwyższenie, bądź obniżenie temperatury prowadzenia eksperymentu, spowodowało wyraźny wzrost poziomów akumulacji izoflawonów oraz hesperydyny, w kalusie *C. subternata*. Niska temperatura stymulowała w szczególności biosyntezę 7-O- β -glukozydu kalikozyiny (zawartość związku na poziomie 235,30 mg/100 g DW), podwyższona zaś – hesperydyny i 7-O- β -glukozydu pseudobaptygeniny (stężenia połączeń wynosiły odpowiednio 55,00 i 84,55 mg/100 g DW).
- Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują, że możliwe jest regulowanie pierwotnego (wzrost) i wtórnego (biosynteza polifenoli) metabolizmu biomas kalusowych *C. subternata* poprzez modyfikacje warunków oświetleniowych oraz temperatury prowadzenia eksperymentu.
 - Wykazano, że jedynie zabiegi doświadczalne obejmujące aplikację czynników stresowych (naświetlanie tkanki przyrannej promieniami UVC lub poddanie kultury szokowi termicznemu), wywierają wyraźnie niekorzystny wpływ na wzrost kalusa *C. subternata*.
 - Stwierdzono, że obecność światła nie jest czynnikiem niezbędnym do zapoczątkowania biosyntezy izoflawonów oraz hesperydyny w kalusie *C. subternata*, jednak istotnie stymuluje ich produkcję. Wykazano jednocześnie, że poziomy akumulacji poszczególnych połączeń polifenolowych w biomasie miodokrzewu są uzależnione od długości fali użytego promieniowania, ze szczególnym uwzględnieniem filtra niebieskiego indukującego najsilniej produkcję badanych metabolitów.
 - Udowodniono, że wpływ promieniowania UVC na przyrost kalusa *C. subternata*, a także biosyntezę izoflawonów i hesperydyny w badanej biomasie, jest wyraźnie uzależniony od momentu aplikacji czynnika stresowego w określonej fazie cyklu wzrostowego. Otrzymane wyniki pokazują, że dla uzyskania korzystnych efektów (w rozumieniu dużych ilości tkanki przyrannej przy jednoczesnej stymulacji biosyntezy związków polifenolowych), celowe jest naświetlanie kalusów parenchymatycznych w drugiej połowie cyklu wzrostowego (20 dzień eksperymentu).

- Niekorzystny wpływ stresu temperaturowego, na wzrost kalusa *C. subternata*, wykazuje, że pomimo jednoczesnego podwyższenia poziomów akumulacji izoflawonów w badanej biomacie, wymienione zabiegi eksperymentalne mają ograniczoną przydatność dla pozyskiwania 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, w oparciu o kultury parenchymatyczne powyższego gatunku.
 - Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń wskazują na możliwość wykorzystania kalusa *C. subternata* w badaniach reakcji obronnych roślin z rodziny Fabaceae, na czynniki stresowe w postaci promieniowania ultrafioletowego i szoku termicznego.
13. Stosując jako *inoculum* wyjściowe parenchymatyczne kultury kalusowe miodokrzewu, uzyskano techniką dyspersji, po raz pierwszy, szybko rosnącą ($Gi \approx 1200\%$) zawiesinę *C. subternata*. Biomase namnażano w systemie ciągłym w pożywce MS suplementowanej 20,19 μM 4-CPPU i 1,96 μM 2,4,5-T. Wyprowadzona zawiesina zachowała zdolność do biosyntezy 3 połączeń izoflawonoidowych, zidentyfikowanych uprzednio w kalusie powyższego gatunku, nie stwierdzono w niej natomiast obecności hesperydyny. Maksymalne stężenia 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, magazynowanych w całości wewnątrzkomórkowo, wynosiły odpowiednio 148,00, 76,00 i 99,00 mg/100g DW (produktywności dla poszczególnych związków równe 0,74, 0,31 i 0,49 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$).
 14. Zawiesina *C. subternata*, rosnąca w warunkach całkowitej ciemności, charakteryzowała się parametrami wzrostowymi zbliżonymi do kultury prowadzonej przy oświetleniu ciągłym. Maksymalne stężenia 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, wynosiły w opisywanym przypadku odpowiednio 275,00, 126,80 oraz 145,00 mg/100 g DW, zaś produktywności biomasy względem powyższych połączeń 1,27, 0,58 i 0,68 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$, tj. odpowiednio o ok. 72, 87 i 29 % więcej w stosunku do kultury naświetlanej.
 15. Spośród zastosowanych strategii retrobiosyntetycznych, obejmujących dokarmianie zawiesiny *C. subternata* substancjami odżywczymi (hydrolizat kazeiny i woda kokosowa) bądź prekursorem biosyntezy (fenyloalanina), najlepsze efekty, w zakresie stymulowania przyrostu biomasy oraz akumulacji metabolitów wtórnych, uzyskano na drodze suplementacji badanej kultury wodą kokosową. Powyższy zabieg eksperymentalny skutkowało największą, uzyskaną w opisywanej serii doświadczeń, ilością suchej masy ($\approx 16 \text{ g l}^{-1}$; ok. 14 % więcej w porównaniu z kulturą podstawową), przy zachowaniu wysokich stężeń izoflawonów (odpowiednio 158,96, 99,95 i 74,54 mg/100 g DW dla 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny). Sumaryczna produktywność względem połączeń izoflawonoidowych wynosiła przy tym 1,80 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$, tj. ok. 17 % więcej w porównaniu z kulturą podstawową.
 16. Stwierdzono niekorzystny wpływ elicytacji chitosanem na wzrost biomasy i akumulację izoflawonów w kulturach zawiesinowych *C. subternata*. Pozytywne

efekty, w rozumieniu znacznych ilości suchej masy ($\approx 16 \text{ g l}^{-1}$) oraz stosunkowo wysokich stężeń izoflawonów, utrzymujących się na względnie stałym poziomie, w drugiej połowie cyklu wzrostowego (zawartości 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny wynoszące odpowiednio ok. 90, 60 i 40 mg/100 g DW; sumaryczna produktywność dla izoflawonów na poziomie $1,55 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, zbliżona do kultury podstawowej), uzyskano natomiast w przypadku suplementacji kultury kwasem octowym zobojętnionym za pomocą wodorotlenku sodu (rozpuszczalnik dla chitosanu). Dodatek jasmonianu metylu nie hamował w istotny sposób metabolizmu pierwotnego zawiesiny *C. subternata*, stymulując jednocześnie w umiarkowanym stopniu biosyntezę 7-*O*- β -glukozydu pseudobaptygeniny (produktywność na poziomie $0,39 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$; 26 % wzrost zawartości w stosunku do zawiesiny podstawowej).

17. Wykazano, że immobilizacja komórek zawiesiny *C. subternata* przy użyciu rozdrobnionej, oczyszczonej tkanki korkowej (*Q. suber*) lub żywicy Amberlite™ XAD4, nie wpływa w istotny sposób na tempo wzrostu badanej biomasy. Opisany zabieg eksperymentalny nie spowodował również zmian jakościowych frakcji polifenolowej w kulturach zawiesinowych powyższego gatunku, ani zmiany profilu magazynowania metabolitów wtórnych. Immobilizacja komórek badanej zawiesiny skutkowała przy tym stosunkowo nieznacznym, ok. 15 % podwyższeniem produktywności kultury pod względem izoflawonów.
18. Opracowano instalację techniczną o charakterze bioreaktora mieszająco-napowietrzającego (*stirred-tank*), wykorzystywaną następnie do prowadzenia kultur zawiesinowych *C. subternata*. W toku dalszych prac, zoptymalizowano warunki do wzrostu zawiesiny badanego gatunku w fermentorze, dostosowując szybkość mieszania, poziom napowietrzenia kultury, stężenie tlenu rozpuszczonego oraz zawartość środka przeciwpiennego, do specyficznych wymagań testowanej biomasy.
19. Kultury zawiesinowe *C. subternata*, prowadzone w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, charakteryzowały się parametrami wzrostowymi zbliżonymi do biomas rosnących w kolbach Erlenmeyera (maksymalna ilość DW wynosząca ok. 14 g l^{-1}), zachowując przy tym zdolność do akumulacji wszystkich izoflawonów. Maksymalne stężenia 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny (odpowiednio 154,03, 66,11 i 40,28 mg/100 g DW) były w opisywanym przypadku porównywalne z zawartością wspomnianych połączeń w kulturach wytrząsanych. Produktywność uzyskanego systemu z uwagi na powyższe związki wynosiła odpowiednio $0,70$, $0,30$ i $0,18 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.
20. Zastosowanie strategii eksperymentalnej, obejmującej prowadzenie kultur zawiesinowych *C. subternata* w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, w warunkach całkowitej ciemności, oraz dokarmianie powyższej biomasy wodą kokosową, skutkowało uzyskaniem maksymalnych stężeń 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, równych 195,53, 90,19 i 45,48 mg/100 g DW, co odpowiadało produktywnościom wynoszącym odpowiednio $0,96$, $0,44$ i $0,22 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

- Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że możliwe jest otrzymanie szybko rosnących, wytrząsanych kultur zawiesinowych *C. subternata*, w oparciu o kalus parenchymatyczny powyższego gatunku, zachowując zdolność badanej biomasy do biosyntezy połączeń izoflawonoidowych. Ze względu na brak hesperydyny, zawiesina *C. subternata* może być uznana za bogate i wybiórcze źródło 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny.
- Udowodniono, że możliwe jest stymulowanie metabolizmu pierwotnego (w rozumieniu wzrostu biomasy) i wtórnego (biosynteza połączeń izoflawonoidowych) w kulturach zawiesinowych *C. subternata*, na drodze wybranych zabiegów eksperymentalnych, obejmujących modyfikację warunków oświetleniowych, oraz dokarmianie biomasy prekursorami biosyntezy polifenoli bądź złożonymi substancjami odżywczymi.
- Nie potwierdzono, w przypadku zawiesiny *C. subternata*, szeroko opisywanej w literaturze konieczności zapewnienia biomase dostępu do światła, celem indukcji biosyntezy związków bioflawonoidowych.
- Spośród zastosowanych strategii retrobiosyntetycznych, jedynie suplementacja pożywki wodą kokosową w istotny sposób stymulowała jednocześnie wzrost zawiesiny *C. subternata* oraz akumulację związków izoflawonoidowych. Uzyskane wyniki wskazują tym samym, że produktywność badanej kultury, pod względem wspomnianych metabolitów wtórnych, uzależniona jest w znacznym stopniu od podaży węglowodanów.
- Rezultaty badań wskazują, że zastosowanie klasycznej elicytacji przy pomocy chitosanu lub jasmonianu metylu nie wywiera, w kulturach zawiesinowych *C. subternata*, oczekiwanego efektu w postaci znaczącego podwyższenia zawartości 7-O- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny. Brak skuteczności powyższych zabiegów eksperymentalnych może wynikać zarówno z niekorzystnego wpływu elicytora na metabolizm pierwotny badanych komórek (w przypadku dodatku chitosanu), jak również z faktu, że wymienione związki nie należą do typowych fitoaleksyn, produkowanych przez rośliny z rodziny Fabaceae, w przebiegu reakcji obronnej.
- Immobilizacja powierzchniowa, w przypadku zawiesiny *C. subternata*, nie służy jako czynnik imitujący zróżnicowanie histologiczne rośliny macierzystej, a tym samym nie stymuluje biosyntezy metabolitów charakterystycznych dla surowca gruntowego. Poczynione spostrzeżenia wskazują więc pośrednio, że blokada biosyntezy ksantonów, benzofenonów i flawanonów, w zawiesinie powyższego gatunku, nie jest spowodowana odmienną lokalizacją mediatorów biosyntezy oraz odpowiadających im produktów w innych kompartmentach tkankowych.
- Udowodniono, że możliwe jest dostosowanie warunków do prowadzenia kultur zawiesinowych *C. subternata* w prototypowym bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym (*stirred-tank bioreactor*). Rezultaty doświadczeń pokazują tym samym, że powyższa biomasa może być z powodzeniem namnażana w instalacjach

wielkoskalowych, stanowiąc względnie wydajne i wybiórcze źródło wybranych połączeń izoflawonowych.

- Wyniki doświadczeń dowodzą, że brak oświetlenia oraz dokarmianie zawiesiny *C. subternata* wodą kokosową, stymuluje wzrost biomasy i produkcję izoflawonów niezależnie od skali kultury. Nie stwierdzono jednak synergistycznego wpływu obydwu wymienionych strategii doświadczalnych na produktywność systemu względem badanych połączeń.
21. Opracowano, po raz pierwszy, wydajną procedurę mikrorozmnażania endemicznego, południowoafrykańskiego krzewu *C. genistoides* o znaczeniu komercyjnym, wykorzystywanego do produkcji herbaty ziołowej „honeybush”.
 22. Poprzez modyfikacje zawartości regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin, a także podstawowych składników medium wzrostowego (węglowodany i sole mineralne), zoptymalizowano składy podłoży wykorzystywanych na poszczególnych etapach procedury mikrorozmnażania badanego gatunku, obejmującej multiplikację, elongację i ukorzenianie pędów.
 23. Etap multiplikacji pędów *C. genistoides* prowadzono, z wykorzystaniem primordialnych kultur pędowych (bezpośrednie eksplantaty), na pożywce SH, suplementowanej 3,0 % (w/v) sacharozy, 9,84 μM 2iP oraz 1,0 μM TDZ, uzyskując przy tym wydajność 8,2 mikropędu/eksplantat.
 24. Namnożone w warunkach *in vitro* mikropędy *C. genistoides* wydłużono przez 60 dni na pożywce SH suplementowanej 1,5 % (w/v) sacharozy oraz 4,92 μM IBA (kwas indolilo-3-masłowy).
 25. Eksplantaty ukorzeniono na podłożu SH o obniżonej o połowę zawartości azotanów amonu i potasu, suplementowanym 1,5 % (w/v) sacharozy, 28,54 μM IAA (kwas indolilo-3-octowy oraz 260,25 μM kwasu cytrynowego. Odsetek pędów tworzących korzenie wynosił 54,8 %.
 26. Zregenerowane rośliny *C. genistoides* aklimatyzowano w warunkach szklarniowych, po uprzednim umieszczeniu ich w mieszaninie torfu, żwiru i perlitu (1:1:1 w/w/w). Przeżywalność roślin na powyższym etapie wynosiła 80 %.
 27. Skład jakościowy roślin zregenerowanych, pod względem połączeń polifenolowych, był identyczny z referencyjnym surowcem gruntowym *C. genistoides*. Części nadziemne roślin pozyskanych w wyniku procedury mikrorozmnażania charakteryzowały się zarazem najwyższą zawartością mangiferyny i izomangiferyny (odpowiednio ok. 8300 i 2500 mg/100 g DW), spośród wszystkich biomas badanych w ramach niniejszej pracy.
 28. Analizy chromatograficzne wykazały, że mikropędy *C. genistoides* charakteryzowały się niższą, w porównaniu z pędami poddanymi elongacji i roślinami zregenerowanymi, zawartością ksantonów i flawanonu hesperydyny, a także obecnością 3 połączeń izoflawonowych (7-O- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny). Wszystkie biomasy pędowe zachowały ponadto zdolność do akumulacji pochodnych benzofenonu, tj. 3-C- β glukozydów makturyny i iriflofenonu, charakterystycznych dla rośliny macierzystej.

- Udowodniono, że możliwe jest namnażanie endemicznego, południowoafrykańskiego krzewu *C. genistoides*, w warunkach kultur *in vitro*. Opracowany protokół mikrorozmnażania ma duże znaczenie praktyczne, badany gatunek został bowiem wyselekcjonowany do upraw plantacyjnych, co wiąże się z koniecznością dostarczenia dużej ilości sadzonek. Należy przy tym zaznaczyć, że *C. genistoides*, z uwagi na największą spośród miodokrzewów zawartość ksantonów i związany z tym potencjał prozdrowotny przygotowywanych ekstraktów, jest szczególnie wartościowa dla rozwijającego się przemysłu nutraceutycznego. Ze względu na powyższe, w nadchodzących latach, można spodziewać się zwiększonego popytu na badany surowiec. Zoptymalizowana procedura mikrorozmnażania, z uwagi na dużą wydajność, stanowi alternatywę dla stosowanych obecnie zabiegów agrotechnicznych.
- Opracowana procedura mikrorozmnażania może zostać w przyszłości wykorzystana do odnowy populacji miodokrzewów zagrożonych wyginięciem, jak również szybkiej odbudowy plantacji gatunków komercyjnych niszczonej częstymi pożarami fynbosu.
- Stwierdzono, że obecność TDZ w pożywce wzrostowej jest kluczowa dla wydajnego namnażania pędów *C. genistoides* w warunkach *in vitro*. Wyniki doświadczeń wskazują jednocześnie na synergistyczny, stymulujący wpływ jednoczesnej suplementacji podłoża dwoma cytokininami (TDZ i 2iP), na ilość powstających primordiów pędowych.
- Wykazano, że dla powodzenia mikrorozmnażania *C. genistoides* kluczowy jest etap elongacji pędów na podłożu suplementowanym IBA, który umożliwia uzyskanie eksplantatów o cechach morfologicznych rośliny macierzystej, warunkując tym samym skuteczność dalszej procedury ich ukorzenia.
- Stwierdzono, że skuteczność ukorzenia eksplantatów pędowych *C. genistoides* na podłożu suplementowanym IAA, uzależniona jest od obecności kwasu cytrynowego, co wynika najprawdopodobniej z jego ochronnego wpływu na powyższą auksynę.
- Opracowana procedura mikrorozmnażania *C. genistoides* nie powoduje wyraźnych zmian w profilu metabolicznym badanego gatunku, o czym świadczy identyczny skład frakcji polifenolowej roślin zregenerowanych i referencyjnego surowca gruntowego.
- Wykazano, że zróżnicowanie tkankowe biomasy wywiera istotny wpływ na akumulację połączeń polifenolowych w kulturach pędowych *C. genistoides*. Stwierdzono w szczególności, że wzrost stopnia cytodyferencjacji stymuluje produkcję ksantonów i flawanonów w pędach powyższego gatunku, hamując jednocześnie powstawanie pochodnych izoflawonowych. Rezultaty doświadczeń dowodzą tym samym, że zastosowanie regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin umożliwia pośrednio, poprzez wywołanie określonych zmian w

morfologii biomasy, modelowanie metabolizmu wtórnego badanych kultur w zakresie biosyntezy polifenoli.

29. Zoptymalizowano warunki do prowadzenia płynnych kultur pędowych *C. genistoides* w systemie LifeRaft[®], z użyciem pożywki SH suplementowanej 1,5 % (w/v) sacharozy oraz 4,92 μM IBA.
 30. Otrzymane płynne kultury pędowe *C. genistoides* wykazywały zdolność do biosyntezy połączeń polifenolowych z grupy ksantonów, flawanonów i benzofenonów, charakterystycznych dla rośliny macierzystej. Oznaczone maksymalne zawartości mangiferyny (1843,59 mg/100 g DW), izomangiferyny (712,02 mg/100 g DW), 3-*C*-β-glukozydu iriflofenonu (594,29 mg/100 g DW) i hesperydyny (71,60 mg/100 g DW) w biomasach były, za wyjątkiem pochodnej benzofenonu, niższe niż w roślinie macierzystej. Opisywane kultury akumulowały ponadto połączenia o budowie izoflawonoidowej (7-*O*-β-glukozydy kalikozy, pseudobaptygeniny i formononetyny), których stężenia obniżały się w kolejnych dniach eksperymentu, wraz z postępującą cytodyferencją.
 31. Opracowano instalację o charakterze bioreaktora okresowo-zalewowego (*temporary-immersion bioreactor*), wyposażoną w system immobilizacji biomasy i wykorzystywaną do prowadzenia płynnych kultur pędowych *C. genistoides*.
 32. Pędy *C. genistoides*, rosnące w bioreaktorze okresowo-zalewowym, charakteryzowały się tempem wzrostu zbliżonym do kultur prowadzonych w systemie LifeRaft[®], a także wyższą, w stosunku do nich, zawartością związków polifenolowych. Maksymalne stężenia mangiferyny, izomangiferyny, hesperydyny oraz 3-*C*-β-glukozydów iriflofenonu i makturyny wynosiły w opisywanym przypadku odpowiednio 2622,70, 757,40, 344,77, 648,30 i 18,85 mg/100 g DW, co odpowiadało produktywnościom dla poszczególnych połączeń równym 5,48, 1,58, 0,72, 3,04 oraz 0,06 mg l⁻¹ d⁻¹.
- Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że możliwe jest prowadzenie płynnych kultur pędowych *C. genistoides* w warunkach *in vitro*, konieczna jest jednak immobilizacja badanej biomasy przy użyciu systemu Liferaft[®].
 - Stwierdzono, że zastosowanie pożywki SH wzbogaconej IBA, pozwala na uzyskanie kultur pędowych o wysokiej zawartości ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna) oraz pochodnej benzofenonu (3-*C*-β-glukozyd iriflofenonu).
 - Dowiedziono, że możliwe jest zwiększenie skali kultur pędowych *C. genistoides* poprzez optymalizację warunków ich wzrostu w systemie okresowo-zalewowym. Wysokie poziomy zawartości związków polifenolowych w badanej biomacie wskazują jednocześnie, że może być ona wykorzystana jako bogate, niezależne od warunków środowiskowych, źródło połączeń z grupy ksantonów oraz pochodnych benzofenonu.

Badania fitochemiczne

1. Zoptymalizowano metodę ekstrakcji i oczyszczania frakcji polifenolowych z kultur *in vitro* i części nadziemnych roślin gruntowych *Cyclopia* sp., wykorzystywaną do przygotowywania wyciągów do badań jakościowych i ilościowych polifenoli w wymienionych surowcach, a także prac preparatywnych ukierunkowanych na izolację wybranych metabolitów wtórnych. Opracowana procedura obejmowała wyczerpującą ekstrakcję surowca metanolem, oczyszczanie wyciągu od niepolarnych substancji balastowych za pomocą chloroformu oraz, w przypadku prac izolacyjnych, frakcjonowaną ekstrakcję ciecz-ciecz z użyciem octanu etylu.
2. Opracowano protokoły izolacji wybranych związków polifenolowych z kultur parenchymatycznych i surowca gruntowego *C. subternata* oraz części nadziemnych *C. genistoides*, obejmujące frakcjonowaną ekstrakcję, precypitację, grawitacyjną chromatografię kolumnową i/lub semipreparatywną, wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych, z użyciem dwóch seryjnie połączonych kolumn monolitycznych RP-18.
3. Struktury otrzymanych związków polifenolowych określono jednoznacznie na drodze jedno- (^1H i ^{13}C) i dwukierunkowych (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^1H DQF-COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C gHSQC oraz ^1H - ^{13}C gHMBC) eksperymentów NMR, a także przy użyciu technik łączonych LC-DAD i LC-ESI-MS.
4. Wyizolowano oraz zidentyfikowano, po raz pierwszy, w kalusie *C. subternata* 3 połączenia izoflawonowe (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), których obecności nie stwierdzono uprzednio w częściach nadziemnych powyższego gatunku kulturowanych w warunkach gruntowych.
5. Wyizolowano oraz określono, po raz pierwszy, w niefermentowanych częściach nadziemnych *C. subternata* strukturę związku o charakterze dihydrochalkonu (3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny), pochodną benzofenonu (3-*C*- β -glukozyd iriflofenonu) oraz flawon izoroifolinę (7-*O*-rutynozyd apigeniny). Dodatkowo, w ramach prac preparatywnych otrzymano z badanego surowca skolimozyd (7-*O*-rutynozyd luteoliny), a także znaczne ilości mangiferyny i hesperydyny.
6. Opracowano, po raz pierwszy, prostą i wydajną metodę pozyskiwania izomangiferyny z niefermentowanych części nadziemnych *C. genistoides*. W oparciu o technikę frakcjonowanej ekstrakcji oraz wykorzystując zjawisko precypitacji, oddzielono powyższy ksanton od jego położeniowego izomeru mangiferyny, a także flawanonu hesperydyny. Wykorzystując zoptymalizowany protokół izolacji, uwzględniający rozdzielanie polifenoli metodą semipreparatywnej HPLC, otrzymano ponadto, po raz pierwszy, z powyższego surowca 2 pochodne benzofenonu (3-*C*- β -glukozydy iriflofenonu i makluryny).
7. Zoptymalizowano warunki rozdzielania składników zespołu polifenolowego, z biomas *in vitro* oraz niefermentowanych i fermentowanych surowców gruntowych *Cyclopia* sp., metodą HPLC w układzie faz odwróconych, z wykorzystaniem elucji gradientowej oraz detekcji UV-DAD i ESI-MS, w trybie jonów ujemnych. W wyniku przeprowadzonej walidacji, obejmującej określenie dokładności, zakresów liniowości, limitów detekcji i oznaczalności oraz precyzji wewnątrz- i

międzygrupowej, dla poszczególnych związków, wykazano, że użyta metoda może być stosowana do celów skryningowych analiz jakościowych i ilościowych biomas roślinnych z rodzaju *Cyclopia* pochodzących z kultur *in vitro* oraz upraw gruntowych.

8. Przy użyciu zoptymalizowanej metody HPLC, oznaczono ilościowo zawartość związków polifenolowych w niefermentowanych i fermentowanych częściach nadziemnych *C. genistoides*, *C. subternata* oraz *C. intermedia*, z uwzględnieniem połączeń wyizolowanych w ramach niniejszej pracy.
 9. Analizy ilościowe HPLC wykazały, że niefermentowany oraz fermentowany surowiec *C. genistoides* stanowi najbogatsze, spośród badanych gatunków, źródło mangiferyny (zawartość na poziomie odpowiednio ok. 5250 i 7000 mg/100 g DW) oraz izomangiferyny (stężenia wynoszące odpowiednio ok. 1900 i 1450 mg/100 g DW). Dodatkowo, nie poddane fermentacji części nadziemne badanego gatunku zawierały największe ilości pochodnych benzofenonu: 3-*C*- β -glukozydów iriflofenonu i makluryny (odpowiednio ok. 830 i 280 mg/100 g DW).
 10. Niefermentowane części nadziemne *C. subternata* zawierały największe, spośród badanych roślin, ilości hesperydyny (ok. 1950 mg/100 g DW), ericytryny (ok. 470 mg/100 g DW), skolimozynu (ok. 520 mg/100 g DW) oraz 3',5'-di-*C*- β -glukozydu floretyny (ok. 510 mg/100 g DW).
 11. Surowiec gruntowy *C. intermedia* charakteryzował się, jako jedyny spośród analizowanych biomas, obecnością flawanonu didyminy (7-*O*-rutynozyd izosakuranetyny), zidentyfikowanej w badanej roślinie po raz pierwszy w toku prezentowanych badań, przy użyciu technik LC-DAD i LC-ESI-MS. Stężenie powyższego metabolitu w materiale niefermentowanym i fermentowanym *C. intermedia* wynosiło odpowiednio ok. 800 i 380 mg/100 g DW. Dodatkowo, biomasa poddana fermentacji zawierała, jako jedyna, znaczne ilości flawanonu hesperetyny (ok. 100 mg/100 g DW).
 12. Analizy HPLC wykazały, że fermentowane części nadziemne badanych miodokrzewów charakteryzują się, w porównaniu z surowcami nie poddanymi oksydacji, niższą zawartością związków polifenolowych z grupy ksantonów, benzofenonów, flawanonów, flawonów oraz dihydrochalkonów. Wyjątek stanowił w tym względzie materiał gruntowy *C. genistoides* stanowiący, zarówno w formie niefermentowanej, jak i fermentowanej, bogate źródło mangiferyny i izomangiferyny.
- Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń dowodzą, że kluczowym elementem procedury przygotowania wyciągów z matryc roślinnych rodzaju *Cyclopia*, do badań fitochemicznych, były etapy frakcjonowanej ekstrakcji ciecz-ciecz ekstraktów pierwotnych, umożliwiające z jednej strony oczyszczenie roztworu od niepolarnych substancji balastowych (w przypadku użycia chloroformu), z drugiej zaś uzyskanie frakcji wzbogaconych w analizowane związki polifenolowe (zastosowanie octanu etylu w czasie prac preparatywnych).
 - Wykazano, że surowiec gruntowy *C. subternata* oraz biomasa parenchymatyczna powyższego gatunku, a także niefermentowane części nadziemne *C. genistoides*,

mogą być wykorzystane jako bogate źródło związków polienolowych z grupy ksantonów, flawanonów, flawonów, izoflawonów, a także pochodnych benzofenonu i dihydrochalkonu.

- Opracowany po raz pierwszy, w ramach niniejszej pracy, sposób preparatywnego rozdzielania związków polifenolowych z surowców gruntowych oraz biomas *in vitro* *Cyclopia* sp., obejmujący użycie 2 seryjnie połączonych kolumn monolitycznych RP-18, może być z powodzeniem wykorzystany do izolacji wybranych metabolitów wtórnych ze skomplikowanych matryc roślinnych.
- Stwierdzono, że niefermentowany surowiec gruntowy *C. genistoides* należy uznać za wydajne źródło trudno dostępnej izomangiferyny, a także 3-*C*- β -glukozydów makluryny i iriflofenonu.
- Opracowany protokół pozyskiwania polifenoli z części nadziemnych *C. genistoides* może być zastosowany do celów ich izolacji z mikropędów badanego gatunku, rosnących w bioreaktorze okresowo-zalewowym, stanowiąc tym samym etap *downstream* biotechnologicznej produkcji ksantonów i benzofenonów w oparciu o kultury *in vitro* *Cyclopia* sp.
- Zaproponowany protokół izolacji 7-*O*- β -glukozydów kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny, z biomasy parenchymatycznej *C. subternata*, można wykorzystać w procedurze *downstream* biotechnologicznej produkcji izoflawonów, w oparciu o kultury zawieszinowe powyższego gatunku prowadzone w bioreaktorze mieszająco- napowietrzającym.
- Identyfikacja, po raz pierwszy, w surowcach gruntowych *Cyclopia* sp. pochodnych benzofenonu (3-*C*- β -glukozydy iriflofenonu i makluryny), a także związku o charakterze dihydrochalkonu (3',5'-di-*C*- β -glukozyd floretyny), jest szczególnie istotna z punktu widzenia badań aktywności biologicznej miodokrzewów. Związki te mogą tłumaczyć, przynajmniej częściowo, niezwykle silne działanie antyoksydacyjne oraz fitoestrogenne wyciągów z *Cyclopia* sp.
- Wykazano, że możliwe jest zoptymalizowanie metody HPLC z detekcją UV-DAD i ESI-MS, pozwalającej na prowadzenie jednoczesnych oznaczeń ilościowych ksantonów, flawanonów, flawonów, izoflawonów, benzofenonów oraz pochodnej dihydrochalkonu (16 związków) zarówno w biomasach *in vitro* wszystkich badanych gatunków miodokrzewów, jak i w odpowiadających im surowcach gruntowych, w formie niefermentowanej oraz poddanej oksydacji.
- Wyniki oznaczeń ilościowych HPLC związków polifenolowych w częściach nadziemnych badanych roślin z rodzaju *Cyclopia*, wskazują na surowce niefermentowane jako bardziej odpowiednie do celów izolacji wybranych ksantonów i bioflawonoidów, a także do prowadzenia badań szeroko rozumianej aktywności biologicznej.

- Eksperymenty biotechnologiczne oraz badania fitochemiczne, wchodzące w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej, pozwoliły na realizację podstawowego celu pracy, którym było otrzymanie kultur *in vitro* endemicznych, południowoafrykańskich roślin z rodzaju *Cyclopia*, ukierunkowanych na biosyntezę bioflawonoidów oraz ksantonów o udokumentowanej aktywności biologicznej.
- W oparciu o biomasy *in vitro* *Cyclopia* sp., otrzymano 2 systemy do pozyskiwania wybranych związków polifenolowych. Opracowanie instalacji o charakterze bioreaktorów umożliwiło wybiórczą produkcję izoflawonów, ksantonów oraz benzofenonów na skalę półtechniczną, stanowiąc zarazem kompletną realizację etapu *upstream* zaproponowanego procesu biotechnologicznego. Kultury zawieszinowe *C. subternata*, prowadzone w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym, są bogatym, wybiórczym źródłem 3 połączeń izoflawonowych (7-*O*- β -glukozydy kalikozyny, pseudobaptygeniny i formononetyny), nieobecnych w surowcu gruntowym powyższego gatunku. Pędy *in vitro* *C. genistoides*, rosnące w systemie okresowo-zalewowym, mogą być natomiast wykorzystane do pozyskiwania ksantonów (mangiferyna i izomangiferyna) oraz pochodnych benzofenonu (3-*C*- β -glukozydy makluryny i iriflofenonu).
- Opracowano procedury izolacji izoflawonów, a także ksantonów oraz pochodnych benzofenonu z biomas *Cyclopia* sp. Tym samym, możliwa jest pełna realizacja etapu *downstream* procesu biotechnologicznego pozyskiwania powyższych połączeń w oparciu o obydwa systemy *in vitro* miodokrzewów.

Piśmiennictwo

- Abdullah, M. A., Ariff, A. B., Marziah, M., Ali, A. M., Lajis, N. H. (2000). Strategies to overcome foaming and wall-growth during the cultivation of *Morinda elliptica* cell suspension culture in a stirred-tank bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 205-212.
- Ahmed, S., Hahn, E.-J., Paek, K.-Y. (2008). Aeration volume and photosynthetic photon flux affect cell growth and secondary metabolite contents in bioreactor cultures of *Morinda citrifolia*. *Journal of Plant Biology*, 51, 209-212.
- Al-Khayri, J. M., Huang, F. H., Morelock, T. E., Busharar, T. A. (1992). Spinach tissue culture improved with coconut water. *Hortscience*, 27, 357-358.
- Almagro, L., Sabater-Jara, A. B., Belchí-Navarro, S., Fernández-Pérez, F., Bru, R., Pedreño, M. A. (2011). Effect of UV light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cultures elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. W: *Plants and Environment* (Vasanthaiah, H. K. N., Kambiranda, D., ed.). Rijeka: InTech, str. 115-136.
- Ames, T. T., Worden, R. M. (1997). Continuous production of daidzein and genistein from soybean in a magnetofluidized bed bioreactor. *Biotechnology Progress*, 13, 336-339.
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., Biondi, S. (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, 78, 345-352.
- Apers, S., Naessens, T., Van Den Steen, K., Cuyckens, F., Claeys, M., Pieters, L., Vlietinck, A. (2004). Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. *Journal of Chromatography A*, 1038, 107-112.
- Archambault, J., Williams, R. D., Perrier, M., Chavarie, C. (1996). Production of sanguinarine by elicited plant cell culture III. Immobilized bioreactor cultures. *Journal of Biotechnology*, 46, 121-129.
- Arisawa, M., Morita, N., Kondo, Y., Takemoto, T. (1973). Studies on constituents of *Iris* genus plants. IV. The constituents of *Iris freorentina* L. (2¹). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 21, 2323-2328.
- Aritomi, M., Kawasaki, T. (1970). A new xanthone C-glucoside, position isomer of mangiferin, from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 18, 2327-2333.
- Arroo, R. R. J., Alfermann, A. W., Medarde, M., Petersen, M., Pras, N., Woolley, J. G. (2002). Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochemistry Reviews*, 1, 27-35.
- Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Krisa, S., Mérillon, J.-M. (2004). Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Journal of Biotechnology*, 109, 287-294.
- Bairu, M. W., Stirk, W. A., Van Staden, J. (2009). Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98, 239-248.
- Bais, H. P., Suresh, B., Raghavarao, K. S. M. S., Ravishankar, G. A. (2002). Performance of hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. in bioreactors of different configurations. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 38, 573-580.
- Baldi, A., Srivastava, A. K., Bisaria, V. S. (2008). Effect of aeration on production of anticancer lignans by cell suspension cultures of *Linum album*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 547-555.
- Bálványos, I., Kursinszki, L., Bányai, P., Szóke, É. (2004). Analysis of polyacetylenes by HPLC in hairy root cultures of *Lobelia inflata* cultivated in bioreactor. *Chromatographia, Supplement*, 60, S235-S238.
- Bányai, P., Kuzovkina, I. N., Kursinszki, L., Szóke, É. (2006). HPLC analysis of alizarin and purpurin produced by *Rubia tinctorum* L. hairy root cultures. *Chromatographia, Supplement*, 63, S111-S114.
- Barik, D. P., Naik, S. K., Mudgal, A., Chand, P. K. (2007). Rapid plant regeneration through *in vitro* axillary shoot proliferation of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) – a twinning legume. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 43, 144-148.
- Baque, Md. A., Moh, S.-H., Lee, E.-J., Zhong, J.-J., Paek, K.-Y. (2012). Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, 30, 1255-1267.
- Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalter, B., Owen, R. W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5599-5610.
- Barthe, G. A., Jourdan, P. S., McIntosh, C. A., Mansell, R. L. (1987). Naringin and limonin production in callus cultures and regenerated shoots from *Citrus* sp. *Journal of Plant Physiology*, 127, 55-65.
- Baskaran, P., Jayabalan, N. (2008). Effect of growth regulators on rapid micropropagation and psoralen production in *Psoralea corylifolia* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 345-351.
- Beck, S. L., Dunlop, R. W. (2001). Micropropagation of the *Acacia* species – a review. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 37, 531-538.
- Benavente-García, O., Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6185-6205.
- Beerhues, L., Berger, U. (1994). Xanthones in cell suspension cultures of two *Centaurium* species. *Phytochemistry*, 35, 1227-1231.
- Beerhues, L., Berger, U. (1995). Differential accumulation of xanthones in methyl-jasmonate- and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaurium erythraea* and *Centaurium littorale*. *Planta*, 197, 608-612.
- Bentebibel, S., Moyano, E., Palazón, Cusidó, R. M., Bonfill, M., Eibl, R., Piñol, M. T. (2005). Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 647-655.
- Bhojwani, S. S., Razdan, M. K. (1996). *Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition*. Amsterdam: Elsevier.

- Bo, T., Liu, H.** (2004). Separation methods for pharmacologically active xanthenes. *Journal of Chromatography B*, 812, 165-174.
- Bock, C., Ternes, W.** (2010). The phenolic acids from bacterial degradation of the mangiferin aglycone are quantified in the feces of pigs after oral ingestion of an extract of *Cyclopia genistoides* (honeybush tea). *Nutrition Research*, 30, 348-357.
- Bock, C., Waldmann, K. H., Ternes, W.** (2008). Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of *Cyclopia genistoides* (honeybush tea) extract. *Nutrition Research*, 28, 879-891.
- Boonsongcheep, P., Korsangruang, S., Soonthornchareonnon, N., Chintapakorn, Y., Saralamp, P., Prathanururug, S.** (2010). Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101, 119-126.
- Bouque, V., Bourgaud, F., Nguyen, C., Guckert, A.** (1998). Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea species* and comparison with plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 35-40.
- Buendia-Gonzales, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chavez-Avila, V. M., Vernon-Carter, E. J.** (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston.) I. Via cotyledonary nodes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 43, 260-266.
- Buitelaar, R. M., Langenhoff, A. A. M., Heidstra, R., Tramper, J.** (1991). Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 487-494.
- Buitelaar, R. M., Tramper, J.** (1992). Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *Journal of Biotechnology*, 23, 111-141.
- Busto, V. D., Rodríguez-Talou, J., Giulietti, A. M., Merchuk, J. C.** (2008). Effect of shear stress on antraquinones production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnology Progress*, 24, 175-181.
- Cardillo, A. B., Otálvaro, A. Á. M., Busto, V. D., Talou, J. R., Velásquez, L. M. E., Giulietti, A. M.** (2010). Scopolamine, anisodamine and hyoscyamine production by *Brugmansia candida* hairy root cultures in bioreactors. *Process Biochemistry*, 45, 1577-1581.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R.** (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32, 1199-1205.
- Chattopadhyay, S., Bisaria, V. S., Srivastava, A. K.** (2003). Enhanced production of podophyllotoxin by *Podophyllum hexandrum* using *in situ* cell retention bioreactor. *Biotechnology Progress*, 19, 1026-1028.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., Bisaria, V. S.** (2002a). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 138-149.
- Chattopadhyay, S., Srivastava, A. K., Bhojwani, S. S., Bisaria, V. S.** (2002b). Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 215-220.
- Chattopadhyay, S., Srivastava, A. K., Bisaria, V. S.** (2004). Production of phytochemicals in plant cell bioreactors. W: *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. New Delhi: Anayama Publishers, str. 117-128.
- Chen, G., Li, L.** (2007). Nutrient consumption and production of isoflavones in bioreactor cultures of *Pueraria lobata* (Willd). *Journal of Environmental Biology*, 28, 321-326.
- Chen, J., Liu, L., Hou, R., Shao, Z., Wu, Y., Chen, X., Zhou, L.** (2011a). Calycosin promotes proliferation of estrogen receptor-positive cells via estrogen receptors and ERK1/2 activation *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Letters*, 308, 144-151.
- Chen, L., Li, Z., Tang, Y., Cui, X., Luo, R., Guo, S., Zheng, Y., Huang, C.** (2011b). Isolation, identification and antiviral activities of metabolites of calycosin 7-*O*- β -D-glucopyranoside. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 382-389.
- Chen, S. Y., Huang, S. Y.** (2000). Shear stress effects on cell growth and L-DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 22, 5-12.
- Cheong, E., Pooler, M. R.** (2003). Micropropagation of chinese redbud (*Cercis yunnanensis*) through axillary bud breaking and induction of adventitious shoots from leaf pieces. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39, 455-458.
- Choi, S. I., Heo, T. R., Min, B.-H., Cui, J. H., Choi, B. H., Park, S. R.** (2007). Alleviation of osteoarthritis by calycosin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (CG) isolated from *Astragalii radix* (AR) in rabbit osteoarthritis (OA) model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, 1086-1092.
- Choi, Y.-E., Kim, Y.-S., Paek, K.-Y.** (2008). Types and designs of bioreactors for hairy root culture. W: *Plant Tissue Culture Engineering* (Gupta, S. D., Ibaraki, Y., ed.). Dordrecht: Springer-Verlag, str. 161-172.
- Clifford, M., Brown, J. E.** (2006). Dietary flavonoids and health – broadening the perspective. W: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (Andersen, Ø. M., Markham, K. R., ed.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, str. 319-370.
- Coetzee, G., Marx, I. J., Pengilly, M., Bushula, V. S., Joubert, E., Bloom, M.** (2008). Effect of rooibos and honeybush tea extracts against *Botrytis cinerea*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, 33-38.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbio, R., Samperi, R., Lagana, A.** (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25, 469-495.
- Cronquist, A.** (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Cuello, J. L., Yue, L. C.** (2008). Ebb-and-flow bioreactor regime and electrical elicitation: novel strategies for hairy root biochemical production. *Electronic Journal of Integrative Biosciences*, 3, 45-56.
- Cui, X.-H., Murthy, H. N., Jin, Y.-X., Yim, Y.-H., Kim, J.-Y., Paek, K.-Y.** (2011). Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift reactor. *Bioresource Technology*, 102, 10072-10079.
- Curtin, M. E.** (1983). Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotechnology*, 1, 649-657.
- Curtis, W. R.** (1993). Cultivation of roots in bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 205-210.

- Cusido, R. M., Palazón, J., Piñol, M. T., Bonfill, M., Morales, C.** (1999). *Datura metel*: in vitro production of tropane alkaloids. *Planta Medica*, 65, 144-148.
- Cuyckens, F., Claeys, M.** (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15.
- De Beer, D., Jerz, G., Joubert, E., Wray, V., Winterhalter, P.** (2009). Isolation of isomangiferin from honeybush (*Cyclopia subternata*) using high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4282-4289.
- De Beer, D., Joubert, E.** (2010). Development of HPLC method for *Cyclopia subternata* phenolic compound analysis and application to other *Cyclopia* spp. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 289-297.
- De Klerk, G.-J., Van der Krieken, W., De Jong, J. C.** (1999). The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 35, 189-199.
- De Nysschen, A.-M., van Wyk, B., van Heerden, F. R.** (1998). Seed flavonoids of the *Podalyriaceae* and *Lipariaceae* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 212, 1-11.
- De Nysschen, A.-M., van Wyk, B., van Heerden, F.-R., Schutte, A.-L.** (1996). The major phenolic compounds in the leaves of *Cyclopia* species (honeybush tea). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24, 243-246.
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.-M.-A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.-A.-Th.** (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
- De Souza, J. R. R., De Carvalho, J. I. X., Trevisan, M. T. S., De Paula, R. C. M., Ricardo, N. M. P. S., Feitosa, J. P. A.** (2009). Chitosan-coated pectin beads: characterization and in vitro release of mangiferin. *Food Hydrocolloids*, 23, 2278-2286.
- Dear, G. J., Mallett, D. N., Highton, D. M., Roberts, A. D., Bird, S. A., Young, H., Plumb, R. S., Ismail, I. M.** (2002). The potential of serially coupled alkyl-bonded silica monolithic columns for high resolution separations of pharmaceutical compounds in biological fluids. *Chromatographia*, 55, 177-184.
- Debnath, M., Malik, C. P., Bisen, P. S.** (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 33-49.
- Decendit, A., Ramawat, K. G., Waffo, P., Deffieux, G., Badoc, A., Mérillon, J.-M.** (1996). Anthocyanins, catechins, condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnology Letters*, 18, 659-662.
- Del Río, J. A., Ortuño, A., Martín, F. R., García Puig, D., Sabater, F.** (1992). Bioproduction of neohesperidin and naringin in callus cultures of *Citrus aurantium*. *Plant Cell Reports*, 11, 592-596.
- Dias, A.-C.-P., Seabra, R.-M., Andrade, P.-B., Ferreres, F., Fernandes-Ferreira, M.** (2000). Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. *Plant Science*, 150, 93-101.
- Dias, A.-C.-P., Seabra, R.-M., Andrade, P.-B., Ferreres, F., Ferreira, M.-F.** (2001). Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *Journal of Plant Physiology*, 158, 821-827.
- DiCosmo, F., Misawa, M.** (1995). Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13, 425-453.
- Dixon R.-A.** (1999). Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology, and biological functions. W: *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1: Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives* (Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Sankawa, U., ed.). Oxford: Pergamon, Elsevier Science Imprint, str. 773-822.
- Dixon, R. A., Steele, C.** (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4, 394-400.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., Courrot, E.** (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 27, 706-713.
- Donnez, D., Kim, K.-H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément, C., Courrot, E.** (2011). Biodistribution of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, 46, 1056-1062.
- Doran, P. M.** (2000). Bioreactors, stirred tank. W: *Encyclopedia of Cell Technology* (Spier, R. E., ed.). New York: John Wiley & Sons, str. 249-275.
- Doran, P. M.** (2010). Bioreactors, stirred tank for culture of plant cells. W: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (Flickinger, M. C., ed.). New York: John Wiley & Sons, str. 1-35.
- Dörnenburg, H., Knorr, D.** (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 674-684.
- Du, M., Wu, X. J., Ding, J., Hu, Z. B., White, K. N., Branford-White, C. J.** (2003). Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of *Astragalus membranaceus* in bioreactors. *Biotechnology Letters*, 25, 1853-1856.
- Du, X., Bai, Y., Liang, H., Wang, Z., Zhao, Y., Zhang, Q., Huang, L.** (2006). Solvent effect in ¹H NMR spectra of 3'-hydroxy-4'-methoxy isoflavonoids from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44, 708-712.
- Du Toit, J., Joubert, E.** (1998a). The effect of pretreatment on the fermentation of honeybush tea (*Cyclopia maculata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 537-545.
- Du Toit, J., Joubert, E.** (1998b). Effect of drying conditions on the quality of honeybush tea (*Cyclopia*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, 493-507.
- Du Toit, J., Joubert, E.** (1999). Optimization of the fermentation parameters of honeybush tea (*Cyclopia*). *Journal of Food Quality*, 22, 241-256.
- Du Toit, J., Joubert, E., Britz, T. J.** (1998). Honeybush tea – a rediscovered indigenous South African herbal tea. *Journal of Sustainable Agriculture*, 12, 67-84.
- Du Toit, J., Joubert, E., Britz, T. J.** (1999). Identification of microbial contaminants present during the curing of honeybush tea (*Cyclopia*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 2040-2044.
- Du Toit, R., Volstedt, T., Apostolides, Z.** (2001). Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology*, 166, 63-69.

- Duque, A.-S., Pires, A.-S., Dos Santos, D.-M., Fevereiro, P.** (2006). Efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from long-term cell suspension cultures of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 42, 270–273.
- Ehltling, J., Hamberger, B., Million-Rousseau, R., Werck-Reichhart, D.** (2006). Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 5, 239-270.
- Eibl, R., Eibl, D.** (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*, 7, 593-598.
- Eibl, R., Werner, S., Eibl, D.** (2009a). Bag bioreactor based on wave-induced motion: characteristics and applications. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 115, 55-87.
- Eibl, R., Werner, S., Eibl, D.** (2009b). Disposable bioreactors for plant liquid cultures at litre-scale. *Engineering in Life Sciences*, 9, 156-164.
- Ekiert, H.** (2009). Farmaceutyczne aspekty biotechnologii roślin. Część I. Wprowadzenie – metodyka i główne kierunki badawcze. *Farmacja Polska*, 65, 69-77.
- Ekiert, H., Choloniewska, M., Gomółka, E.** (2001). Accumulation of furanocoumarins in *Ruta graveolens* L. shoot culture. *Biotechnology Letters*, 23, 543-545.
- Ekiert, H., Czygan, F.-Ch.** (2005). Accumulation of biologically active furanocoumarins in agitated cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. *Pharmazie*, 60, 623-626.
- El Alfy, T. S., El Sawi, S. A., Sleem, A., Moawad, D. M.** (2010). Investigation of flavonoid content and biological activities of *Chorisia insignis* Hbk. leaves. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, 1334-1348.
- El-Seedi, H. R., El-Barbary, M. A., El-Ghorab, D. M. H., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.-K., Göransson, U., Verpoorte, R.** (2010). Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthenes. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 854-901.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A.** (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68, 2986-3008.
- Faisal, M., Anis, M.** (2006). Thidiazuron induced high frequency axillary shoot multiplication in *Psoralea corylifolia*. *Biologia Plantarum*, 50, 437-440.
- Faisal, M., Siddique, I., Anis, M.** (2006). An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L. (DC.) using cotyledonary node explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 42, 59-64.
- Farkya, S., Bisaria, V. S., Srivastava, A. K.** (2004). Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 504-519.
- Federici, E., Touché, A., Choquart, S., Avanti, O., Fay, L., Offord, E., Courtois, D.** (2003). High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures. *Phytochemistry*, 64, 717-724.
- Fedoreyev, S. A., Bulgakov, V. P., Grishchenko, O. V., Veselova, M. V., Krivoschekova, O. E., Kulesh, N. I., Denisenko, V. A., Tchernoded, G. K., Zhuravlev, Y. N.** (2008). Isoflavonoid composition of a callus culture of the relic tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7023-7031.
- Ferrari, J., Terreaux, C., Sahpaz, S., Msonthi, J. D., Wolfender, J.-L., Hostettmann, K.** (2000). Benzophenone glycosides from *Gnidia involucrata*. *Phytochemistry*, 54, 883-889.
- Ferreira, D., Kamara, B. I., Brandt, E. V., Joubert, E.** (1998). Phenolic compounds from *Cyclopia intermedia* (honeybush tea). 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3406-3410.
- Ferri, M., Dipalo, S. C. F., Bagni, N., Tassoni, A.** (2011). Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food chemistry*, 124, 1473-1479.
- Fecka, I., Turek, S.** (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108, 1039-1053.
- Fossen, T., Andersen, Ø. M.** (2006). Spectroscopic techniques applied to flavonoids. W: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (Andersen, Ø. M., Markham, K. R., ed.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, str. 37-142.
- Frense, D.** (2007). Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1233-1240.
- Fritzemeier, K.-H., Rolfs, C.-H., Pfau, J., Kindl, H.** (1983). Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta*, 159, 25-29.
- Fujita, M., Inoue, T.** (1980a). Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. I. The origin of the xanthon nucleus¹⁾. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2476-2481.
- Fujita, M., Inoue, T.** (1980b). Biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. II. ¹⁾ C-Glucosylation of mangiferin²⁾. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2482-2486.
- Fujita, M., Inoue, T.** (1981). Further studies on the biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*: hydroxylation of the shikimate-derived ring. *Phytochemistry*, 20, 2183-2185.
- Fujita, M., Inoue, T.** (1982). Studies on the constituents of *Iris florentina* L. II. C-glucosides of xanthenes and flavones from the leaves. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 2342-2348.
- Fulzele, D., Kreis, W., Reinhard, E.** (1992). Cardenolide biotransformation by cultured *Digitalis lanata* cells: semi-continuous cell growth and production of deacetyllanatoside C in a 40-l stirred-tank bioreactor. *Planta Medica, Supplement Issue*, 58, A601-A602.
- Gagnon, H., Thibault, J., Cormier, F., Do, C. B.** (1999). *Vitis vinifera* culture in a non-conventional bioreactor: the reciprocating plate bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 21, 405-413.
- Ganapathi, T.-R., Sunil Kumar, G.-B., Srinivas, L., Revathi, C.-J., Bapat, V.-A.** (2007). Analysis of the limitations of hepatitis B surface antigen expression in soybean cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 26, 1575–1584.
- Gangopadhyay, M., Dewanjee, S., Bhattacharya, S.** (2011). Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 706-710.
- Gao, W. Y., Fan, L., Paek, K. Y.** (2000). Yellow and red pigment production by cell cultures of *Carthamus tinctorius* in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 95-100.

- Gao, J., Sanchez-Medina, A., Pendry, B. A., Hughes, M. J., Webb, G. P., Corcoran, O.** (2008). Validation of HPLC method for flavonoid biomarkers in skullcap (*Scutellaria*) and its use to illustrate wide variability in the quality of commercial tinctures. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 11, 77-87.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., Singla, A. K.** (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15, 655-669.
- Ge, F., Yuan, X., Wang, X., Zhao, B., Wang, Y.** (2006). Cell growth and shikonin production of *Arnebia euchroma* in a periodically submerged airlift bioreactor. *Biotechnology Letters*, 28, 525-529.
- Georgiev, M., Ludwig-Müller, J., Weber, J., Stancheva, N., Bley, T.** (2011). Bioactive metabolite production and stress-related hormones in Devil's claw cell suspension cultures grown in bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1683-1691.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., Bley, T.** (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1175-1185.
- Georgiev, M. I., Weber, J., Maciuk, A.** (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 809-823.
- Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., Pavlov, A.** (2008). Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 581-593.
- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P., Narasu, M. L.** (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, 19, 175-199.
- Giri, A., Narasu, M. L.** (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology advances*, 18, 1-22.
- Goldblatt, P.** (1997). Floristic diversity in the Cape Flora of South Africa. *Biodiversity and Conservation*, 6, 359-377.
- Gou, W., Li, Y., Gong, L., Li, F., Dong, Y., Liu, B.** (2006). Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84, 343-351.
- Gounaris, Y.** (2010). Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 367-386.
- Goyal, S., Ramawat, K. G.** (2008). Synergistic effect of morphactin on cytokinin-induced production of isoflavonoids in cell cultures of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex. Willd.) DC. *Plant Growth Regulation*, 55, 175-181.
- Grohmann, K., Manthey, J. A., Cameron, R. G.** (2000). Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydrate research*, 328, 141-146.
- Grzegorzczuk, I., Wysokińska, H.** (2010). Antioxidant compounds in *Salvia officinalis* L. shoot and hairy root cultures in the nutrient sprinkle bioreactor. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 79, 7-10.
- Gu, L., Gu, W.** (2001). Characterisation of soy isoflavones and screening for novel malonyl glycosides using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 12, 377-382.
- Gueven, A., Knorr, D.** (2011). Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *Journal of Food Engineering*, 103, 237-243.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., Gantet, P.** (2006). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology*, 24, 403-409.
- Guiochon, G.** (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1168, 101-168.
- Guo, B., Liu, Y.-G., Yan, Q., Liu, C.-Z.** (2007). Spectral composition of irradiation regulates the cell growth and flavonoid biosynthesis in callus cultures of *Saussurea medusa* Maxim. *Plant Growth Regulation*, 52, 259-263.
- Ha, H., Lee, H. Y., Lee, J.-H., Jung, D., Choi, J., Song, K.-Y., Jung, H. J., Choi, J. S., Chang, S.-I., Kim, C.** (2010). Formononetin prevents ovariectomy-induced bone loss in rats. *Archives of Pharmacol Research*, 33, 626-632.
- Han, J., Zhong, J.-J.** (2002). High-density cell culture of *Panax notoginseng* for production of ginseng saponin and polysaccharide in an airlift bioreactor. *Biotechnology Letters*, 24, 1927-1930.
- Hao, G., Du, X., Zhao, F., Shi, R., Wang, J.** (2009). Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97, 175-185.
- Harada, Y., Sakata, K., Sato, S., Takayama, S.** (1997). Fermentation pilot plant. W: *Fermentation and biochemical engineering handbook* (Vogel, H. C., Todaro, C. L., ed.). Westwood, New Jersey: Noyes Publications, str 1-25.
- Heinrich, M., Prieto, J. M.** (2008). Diet and healthy ageing 2100: Will we globalise local knowledge systems? *Ageing Research Reviews*, 7, 249-274.
- Hilton, M. G., Jay, A., Rhodes, M. J. C., Wilson, P. D. G.** (1995). Growth and monoterpene production by transformed shoot cultures of *Mentha citrata* and *Mentha piperita* in flasks and fermenters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 452-459.
- Hilton, M. G., Rhodes, M. J. C.** (1990). Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 132-138.
- Hilton, M. G., Rhodes, M. J. C.** (1994). The effect of varying levels of Gamborg's B5 salts and temperature on the accumulation of starch and hyoscyamine in batch cultures of transformed roots of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 45-51.
- Hollósy, F.** (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33, 179-197.
- Homova, V., Weber, J., Schulze, J., Alipieva, K., Bley, T., Georgiev, M.** (2010). Devil's claw hairy root culture in flasks and in a 3-L bioreactor: bioactive metabolite accumulation and flow cytometry. *Zeitschrift für Naturforschung C: a Journal of Biosciences*, 65, 472-478.
- Honda, H., Hiraoka, K., Nagamori, E., Omote, M., Kato, Y., Hiraoka, S., Kobayashi, T.** (2002). Enhanced anthocyanin production from grape callus in an air-lift type bioreactor using a viscous additive-supplemented medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 135-139.
- Huang, S.-Y., Chen, S.-Y.** (1998). Efficient L-DOPA production by *Stizolobium hassjoo* cell culture in a two stage configuration. *Journal of Biotechnology*, 62, 95-103.
- Huang, S.-Y., Shen, Y.-W., Chan, H.-S.** (2002). Development of a bioreactor operation strategy for L-DOPA production using *Stizolobium hassjoo* suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 779-791.

- Huang, T.-K., McDonald, K. A. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 45, 168-184.
- Huh, J.-E., Seo, D.-M., Baek, Y.-H., Choi, D.-Y., Park, D.-S., Lee, J.-D. (2010). Biphasic positive effect of formononetin on metabolic activity of human normal and osteoarthritic subchondral osteoblasts. *International Immunopharmacology*, 10, 500-507.
- Husain, M. K., Anis, M., Shahzad, A. (2007). *In vitro* propagation of Indian kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 43, 59-64.
- Inomata, S., Yokoyama, M., Seto, S., Yanagi, M. (1991). High-level production of arbutin from hydroquinone in suspension cultures of *Catharanthus roseus* plant cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 315-319.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.
- Iwase, Y., Takahashi, M., Takemura, Y., Ju-Ichi, M., Ito, C., Furukawa, H., Yano, M. (2001). Isolation and identification of two new flavanones and a chalcone from *Citrus kinokuni*¹. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49, 1356-1358.
- Jaganath, I. B., Crozier, A. (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds. W: *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology* (Fraga, C. G., ed.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, str. 1-49.
- Jeong, G.-T., Park, D.-H. (2005). Comparative evaluation of modified bioreactors for enhancement of growth and secondary metabolite biosynthesis using *Panax ginseng* hairy roots. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 528-534.
- Jeong, G.-T., Park, D.-H., Hwang, B., Park, K., Kim, S.-W., Woo, J.-C. (2002). Studies on mass production of transformed *Panax ginseng* hairy roots in bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100, 1115-1127.
- Jeong, J.-A., Wu, C.-H., Murthy, H. N., Hahn, E.-J., Paek, K.-Y. (2009). Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 91-98.
- Jones L. (2004) *An Introduction to Sustainable Harvesting of Some Commercially Utilized Indigenous Plant Species in Cape Floristic Region*. A booklet funded by Critical Ecosystems Partnership Fund.
- Joubert, E., Gelderblom, W. C., De Beer, D. (2009). Phenolic contribution of South African herbal teas to a healthy diet. *Natural Product Communications*, 4, 701-718.
- Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., Louw, A., de Beer, D. (2008a). South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides* – a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 376-412.
- Joubert, E., Joubert, M. E., Bester, C., de Beer, D., De Lange, J. H. (2011). Honeybush (*Cyclopia* spp.): from local cottage industry to global markets – the catalytic and supporting role of research. *South African Journal of Botany*, 77, 887-907.
- Joubert, E., Manley, M., Botha, M. (2006). Use of NIRS for quantification of mangiferin and hesperidin contents of dried green honeybush (*Cyclopia genistoides*) plant material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5279-5283.
- Joubert, E., Manley, M., Botha, M. (2008b). Evaluation of spectrophotometric methods for screening of green rooibos (*Aspalathus linearis*) and green honeybush (*Cyclopia genistoides*) extracts for high levels of bio-active compounds. *Phytochemical Analysis*, 19, 169-178.
- Joubert, E., Manley, M., Maicu, C., de Beer, D. (2010). Effect of pre-drying treatments and storage on color and phenolic composition of green honeybush (*Cyclopia subternata*) herbal tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 338-344.
- Joubert, E., Otto, F., Grüner, S., Weinreich, B. (2003). Reversed-phase HPLC determination of mangiferin, isomangiferin and hesperidin in *Cyclopia* and the effect of harvesting date on the phenolic composition of *C. genistoides*. *European Food Research and Technology*, 216, 270-273.
- Joubert, E., Richards, E. S., Van der Merwe, J. D., De Beer, D., Manley, M., Gelderblom, W. C. A. (2008c). Effect of species variation and processing on phenolic composition and *in vitro* antioxidant activity of aqueous extracts of *Cyclopia* spp. (honeybush tea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 954-963.
- Joubert, M. E., Kotze, W. A. G., Wooldridge, J. (2007). Effect of liming and mineral nutrition on growth of honeybush (*Cyclopia* spp.) plants. *South African Journal of Plant and Soil*, 24, 161-165.
- Jung, H. A., Nurul Islam, M. D., Kwon, Y. S., Jin, S. E., Son, Y. K., Park, J. J., Sohn, H. S., Choi, J. S. (2011). Extraction and identification of three major aldose reductase inhibitors from *Artemisia montana*. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 376-384.
- Junker, B. (2007). Foam and its mitigation in fermentation systems. *Biotechnology Progress*, 23, 767-784.
- Kamara, B. I., Brand, D. J., Brandt, E. V., Joubert, E. (2004). Phenolic metabolites from honeybush tea (*Cyclopia subternata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5391-5395.
- Kamara, B. I., Brandt, E. V., Ferreira, D., Joubert, E. (2003). Polyphenols from honeybush tea (*Cyclopia intermedia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3874-3879.
- Karwasara, V. S., Dixit, V. K. (2012). Culture medium optimization for improved puerarin production by cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex Willd.) DC. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 48, 189-199.
- Kasaj, D., Krenn, L., Reznicek, G., Prinz, S., Hüfner, A., Kopp, B. (2001). Flavonoids in *Achillea collina*. *Scientia Pharmaceutica*, 69, 75-83.
- Kašparová, M., Siatka, T., Dušek, J. (2009). Production of isoflavonoids in the *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Česká a Slovenská Farmacie*, 58, 66-69.
- Kawamura, M., Shigeoka, T., Akita, M., Kobayashi, Y. (1996). Newly developed apparatus for inoculating plant organs into large-scale fermentor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 618-619.
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., Malone, D. M. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59, 39-52.

- Kieran, P. M., Malone, D. M., MacLoughlin, P. F.** (2000). Effect of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 67, 139-177.
- Kim, D.-J., Chang, H.-N.** (1990). Bioreactor cultures of *Lithospermum erythrorhizon* for shikonin production with *in situ* extraction. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18, 525-529.
- Kim, J. A., Baek, K.-H., Son, Y. M., Son, S. H., Shin, H.** (2009). Hairy root cultures of *Taxus cuspidata* for enhanced production of paclitaxel. *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52, 144-150.
- Kim, J. H., Lee, E. S., Lee, C. H.** (2011). Melanin biosynthesis inhibitory effects of calycosin 7-O- β -D-glucoside isolated from *Astragalus (Astragalus membranaceus)*. *Food Science and Biotechnology*, 20, 1481-1485.
- Kim, N. M., Kim, J., Chung, H. Y., Choi, J. S.** (2000). Isolation of luteolin 7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *Artemisia montana*. *Archives of Pharmacal research*, 23, 237-239.
- Kim, Y., Wyslouzil, B. E., Weathers, P.** (2002a). A comparative study of mist and bubble column reactors in the *in vitro* production of artemisinin. *Plant Cell Reports*, 20, 451-455.
- Kim, Y., Wyslouzil, B. E., Weathers, P.** (2002b). Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 38, 1-10.
- Kintzios, S., Makri, O., Pistola, E., Matakidiadis, T., Shi, H. P., Economou, A.** (2004). Scale-up production of puerarin from hairy roots of *Pueraria phaseoloides* in an airlift bioreactor. *Biotechnology Letters*, 26, 1057-1059.
- Kobayashi, Y., Akita, M., Sakamoto, K., Liu, H., Shigeoka, T., Koyano, T., Kawamura, M., Furuya, T.** (1993). Large-scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 215-218.
- Kobayashi, Y., Fukui, H., Tabata, M.** (1987). An immobilized cell culture system for berberine production by *Thalictrum minus* cells. *Plant Cell Reports*, 6, 185-186.
- Kobayashi, Y., Fukui, H., Tabata, M.** (1988). Berberine production by batch and semi-continuous cultures of immobilized *Thalictrum* cells in an improved bioreactor. *Plant Cell Reports*, 7, 249-252.
- Koerner, J. L., Hsu, V. L., Lee, J., Kennedy, J. A.** (2009). Determination of proanthocyanidin A2 content in phenolic polymer isolates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1403-1409.
- Kokotkiewicz, A., Łuczkiwicz, M., Hering, A., Ochocka, R., Goryński, K., Buciuński, A., Sowiński, P.** (2012). Micropropagation of *Cyclopia genistoides*, an endemic South African plant of economic importance. *Zeitschrift für Naturforschung C – a Journal of Biosciences*, 67, 65-76.
- Kokotkiewicz, A., Wnuk, M., Buciuński, A., Łuczkiwicz, M.** (2009). *In vitro* cultures of *Cyclopia* plants (honeybush) as a source of bioactive xanthenes and flavanones. *Zeitschrift für Naturforschung C – a Journal of Biosciences*, 64, 533-540.
- Komaraiah, P., Naga Amrutha, R., Kavi Kishor, P. B., Ramakrishna, S. V.** (2002). Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 634-639.
- Kononowicz, H., Janick, J.** (1988). Changes in nucleus, nucleolus and cell size accompanying somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. I. Relationship between DNA and total protein content and size of nucleus, nucleolus and cell. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 26, 237-247.
- Kreis, W., Reinhard, E.** (1990). Two-stage cultivation of *Digitalis lanata* cells: semicontinuous production of deacetyllanatoside C in 20-litre airlift bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 16, 123-136.
- Kreis, W., Reinhard, E.** (1992). 12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: Production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 26, 257-273.
- Kumar, V., Gururaj, H. B., Narasimha Prasad, B. C., Giridhar, P., Ravishankar, G. A.** (2005). Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annum* L. *Scientia Horticulturae*, 106, 237-246.
- Kuźma, Ł., Bruchajzer, E., Wysokińska, H.** (2009). Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 406-410.
- Le Roux, J. J., Brown, N. A. C., Leivers, S.** (1992). Micropropagation of *Aspalathus linearis* through bud multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 225-227.
- Le Roux, M., Cronje, J. C., Joubert, E., Burger, B. V.** (2008). Chemical characterization of the constituents of the aroma of honeybush, *Cyclopia genistoides*. *South African Journal of Botany*, 74, 139-143.
- Lee, E.-J., Moh, S.-H., Paek, K.-Y.** (2011). Influence of inoculum density and aeration volume on biomass and bioactive compound production in bulb-type bubble bioreactor of *Eleutherococcus koreanum* Nakai. *Bioresource Technology*, 102, 7165-7170.
- Lee, K.-T., Suzuki, T., Yamakawa, T., Kodama, T., Igarashi, Y., Shimomura, K.** (1999). Production of tropane alkaloids by transformed root cultures of *Atropa belladonna* in stirred bioreactors with a stainless steel net. *Plant Cell Reports*, 18, 567-571.
- Lewinsohn, E., Berman, E., Mazur, Y., Gressel, J.** (1989). (7) Glucosylation and (1-6) rhamnosylation of exogenous flavanones by undifferentiated *Citrus* cell cultures. *Plant Science*, 61, 23-28.
- Lewis, P., Kaltia, S., & Wähälä, K.** (1998). The phase transfer catalysed synthesis of isoflavone-O-glucosides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2481-2484.
- Li, L., Zhang, C. R.** (2006). Production of puerarin and isoflavones in cell suspension cultures of *Pueraria lobata* (Willd.): effects of medium supplementation with casein hydrolysate and coconut milk. *Journal of Environmental Biology*, 27, 21-26.
- Lin, L.-Z., Harnly, J. M.** (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1084-1096.
- Lindsey, K. L., Motsei, M. L., Jäger, A. K.** (2002). Screening of South African food plants for antioxidant activity. *Journal of Food Science*, 67, 2129-2131.
- Liu, C., Zhao, Y., Wang, Y.** (2006). Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 11-20.

- Liu, C.-Z., Guo, C., Wang, Y.-C., Ouyang, F. (2003). Comparison of various bioreactors on growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. shoot cultures. *Process Biochemistry*, 39, 45-49.
- Liu, C.-Z., Wang, Y.-C., Guo, C., Ouyang, F., Ye, H.-C., Li, G.-F. (1998). Production of artemisinin by shoot cultures of *Artemisia annua* L. in a modified inner-loop mist bioreactor. *Plant Science*, 135, 211-217.
- Liu, C. Z., Wang, Y. C., Zhao, B., Guo, C., Ouyang, F., Ye, H. C., Li, G. F. (1999). Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 35, 271-274.
- Liu, W., Liu, C., Yang, C., Wang, L., Li, S. (2010). Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation. *Food Chemistry*, 122, 475-481.
- Lucchesini, M., Bertoli, A., Mensuali-Sodi, A., Cappelli, E., Noccioli, C., Luciardi, L., Pistelli, L. (2010). *Cytisus aeolicus* Guss. ex Lindl. *in vitro* cultures and genistin production. *Central European Journal of Biology*, 5, 111-120.
- Łomnicki, A. (2007). *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*. Warszawa: PWN.
- Łuczkiwicz, M. (2006). *Badania nad akumulacją aktywnych leczniczo izoflawonów w kulturach in vitro wybranych gatunków z rodzaju Genista*. Rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna w Gdańsku.
- Łuczkiwicz, M. (2008). Research into isoflavonoid phytoestrogens in plant cell cultures. W: *Bioactive molecules and medicinal plants* (Ramawat, K.G., Merillon, J.-M., ed.). Heidelberg: Springer-Verlag, str. 55-84.
- Łuczkiwicz, M., Cisowski, W. (2001). Optimization of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 57-68.
- Łuczkiwicz, M., Głód, D. (2003). Callus cultures of *Genista* plants – *in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Science*, 165, 1101-1108.
- Łuczkiwicz, M., Głód, D. (2005). Morphogenesis-dependent accumulation of phytoestrogens in *Genista tinctoria* *in vitro* cultures. *Plant Science*, 168, 967-979.
- Łuczkiwicz, M., Głód, D., Bączek, T., Buciuński, A. (2004). LC-DAD UV and LC-MS for the analysis of isoflavones and flavones from *in vitro* and *in vivo* biomass of *Genista tinctoria* L. *Chromatographia*, 60, 179-185.
- Łuczkiwicz, M., Kokotkiewicz, A. (2005a). Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Science*, 169, 862-871.
- Łuczkiwicz, M., Kokotkiewicz, A. (2005b). *Genista tinctoria* hairy root cultures for selective production of isoliquiritigenin. *Zeitschrift für Naturforschung C – a Journal of Biosciences*, 60, 867-875.
- Łuczkiwicz, M., Kokotkiewicz, A. (2012). Elicitation and permeabilisation affect the accumulation and storage profile of phytoestrogens in high productive suspension cultures of *Genista tinctoria*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1-16.
- Łuczkiwicz, M., Piotrowski, A. (2005). Two-stage system for micropropagation of several *Genista* plants producing large amounts of phytoestrogens. *Zeitschrift für Naturforschung C – a Journal of Biosciences*, 60, 557-566.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Maity, S., Ray, S., Banerjee, N. (2005). The role of plant growth regulators on direct and indirect plant regeneration from various organ of *Laucaena leucocephala*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 473-280.
- Malek, S. N. A., Lee, G. S., Hong, S. L., Yaacob, H., Wahab, N.A., Weber, J.-F. F., Ali Shah, S.A. (2011). Phytochemical and cytotoxic investigations of *Curcuma mangga* rhizomes. *Molecules*, 16, 4539-4548.
- Malik, J., Szakova, J., Drabek, O., Balik, J., Kokoska, L. (2008). Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. *Food Chemistry*, 111, 520-525.
- Malik, S., Cusidó, R. M., Mirjalili, M. H., Moyano, E., Palazón, J., Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochemistry*, 46, 23-34.
- Malinowska, E., Inkielewicz, I., Czarnowski, W., Szefer, P. (2008). Assessment of fluoride concentration and daily intake by human from tea and herbal infusions. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1055-1061.
- Marnewick, J. L., Batenburg, W., Swart, P., Joubert, E., Swanevelder, S., Gelderblom, W. C. A. (2004). *Ex vivo* modulation of chemical-induced mutagenesis by subcellular liver fractions of rats treated with rooibos (*Aspalathus linearis*) tea, honeybush (*Cyclopia intermedia*) tea, as well as green and black (*Camelia sinensis*) teas. *Mutation Research*, 558, 145-154.
- Marnewick, J. L., Gelderblom, W. C. A., Joubert, E. (2000). An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. *Mutation Research*, 471, 157-166.
- Marnewick, J., Joubert, E., Joseph, S., Swanevelder, S., Swart, P., Gelderblom, W. (2005). Inhibition of tumour promotion in mouse skin by extracts of rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*), unique South African herbal teas. *Cancer Letters*, 224, 193-202.
- Marnewick, J. L., Joubert, E., Swart, P., Van der Westhuizen, F., Gelderblom, W. C. (2003). Modulation of hepatic drug metabolizing enzymes and oxidative status by rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*), green and black (*Camelia sinensis*) teas in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8113-8119.
- Marnewick, J. L., Van der Westhuizen, F. H., Joubert, E., Swanevelder, S., Swart, P., Gelderblom, W. C. A. (2009). Chemoprotective properties of rooibos (*Aspalathus linearis*), honeybush (*Cyclopia intermedia*) herbal and green and black (*Camelia sinensis*) teas against cancer promotion induced by fumonisin B₁ in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 220-229.
- Marston, A., Hostettmann, K. (2006). Separation and quantification of flavonoids. W: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* (Andersen, Ø. M., Markham, K. R., ed.). Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, str. 1-36.
- Martín, J. P., Pintos, B., Rebordinos, I., Villalobos, N., Guerra, H., Martín, L. (2000). Embryogenic response in different *Medicago arborea* L. explants depending on cytokinin/auxin balances. *Journal of Plant Physiology*, 156, 801-804.
- Martinez, B. C., Park, C.-H. (1994). Immobilization of *Coleus blumei* cells in a column reactor using a spray feeding system. *Biotechnology Techniques*, 8, 301-306.
- Maruška, A., Kornýšova, O. (2006). Application of monolithic (continuous bed) chromatographic columns in phytochemical analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112, 319-330.

- Masibo, M., He, Q.** (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 309-319.
- Mathew, A. J., Jayachandran, K.** (2009). Production of scopadulic acid B from *Scoparia dulcis* Linn. using a *Luffa* sponge bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98, 197-203.
- Matkowski, A.** (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – a review. *Biotechnology Advances*, 26, 548-560.
- Matsubara, K., Kitani, S., Yoshioka, T., Morimoto, T., Fujita, Y., Yamada, Y.** (1989). High density culture of *Coptis japonica* cell increases berberine production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 46, 61-69.
- Mbangcolo, M. M.** (2008). *Aspects of honeybush tea (Cyclopia species) propagation*. MSc thesis, Stellenbosch University.
- McKay, D. L., Blumberg, J. B.** (2007). A review of the bioactivity of South African herbal teas: rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phytotherapy Research*, 21, 1-16.
- Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A. M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S. F., Bennett, S., Dolan, M. C.** (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, 68, 1992-2003.
- Mfenyana, C., de Beer, D., Joubert, E., Louw, A.** (2008). Selective extraction of *Cyclopia* for enhanced *in vitro* phytoestrogenicity and benchmarking against commercial phytoestrogen extracts. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 112, 74-86.
- Min, J. Y., Jung, H. Y., Kang, S. M., Kim, Y. D., Kang, Y. M., Park, D. J., Prasad, D. T., Choi, M. S.** (2007). Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresource Technology*, 98, 1748-1753.
- Misawa, M.** (1994). Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 108, 1-87.
- Mishra, B. N., Ranjan, R.** (2008). Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 49, 1-10.
- Mohamed, M. F., Read, P. E., Coyne, D. P.** (1992). Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 117, 668-672.
- Monthakantirat, O., De-Eknamkul, W., Umehara, K., Yoshinaga, Y., Miyase, T., Warashina, T., Noguchi, H.** (2005). Phenolic constituents of the rhizomes of the Thai medicinal plant *Belamcanda chinensis* with proliferative activity for two breast cancer cell lines. *Journal of Natural Products*, 68, 361-364.
- Moreno, D. A., García-Viguera, C., Gil, J. I., Gil-Izquierdo, A.** (2008). Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 261-280.
- Moyo, M., Bairu, M. W., Amoo, S. O., Van Staden, J.** (2011). Plant biotechnology in South Africa: micropropagation research endeavours, prospects and challenges. *South African Journal of Botany*, 77, 996-1011.
- Mučaji, P., Nagy, M., Liptaj, T., Prónayová, N., Švajdlenka, E.** (2009). Separation of a mixture of luteolin-7-rutinoside and luteolin-7-neohesperidoside isolated from *Ligustrum vulgare* L. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 22, 301-304.
- Mulinacci, N., Giaccherini, C., Santamaria, A. R., Caniato, R., Ferrari, F., Valletta, A., Vincieri, F.-F., Pasqua, G.** (2008). Anthocyanins and xanthenes in the calli and regenerated shoots of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 414-420.
- Mundhara, R., Rashid, A.** (2006). Recalcitrant grain legume *Vigna radiata*, mung bean, made to regenerate on change of hormonal and cultural conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 265-270.
- Murakami, T., Tanaka, N., Wada, H., Saiki, Y., Chen, C.-M.** (1986). Chemical and chemotaxonomical studies on filices. LXIII.¹⁾ Xanthone derivatives of *Hypodematium fauriei* Tagawa, *H. crenatum* Kuhn and *Gymnocarpium robertianum* Newm. (*G. jessoense* Koidz.). *Yakugaku Zasshi*, 106, 378-382.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murthy, H. N., Hahn, E. J., Paek, K. Y.** (2008). Adventitious roots and secondary metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24, 711-716.
- Mühlbach, H.-P.** (1998). Use of plant cell cultures in biotechnology. W: *Biotechnology Annual Review, Volume 4* (El-Gewely, M. R., ed.). Amsterdam: Elsevier, str. 113-176.
- Nagl, W., Ignacimuthu, S., Becker, J.** (1997). Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. *Journal of Plant Physiology*, 150, 525-644.
- Neelwarne, B., Thimmaraju, R.** (2009). Bioreactor for cultivation of red beet hairy roots and *in situ* recovery of primary and secondary metabolites. *Engineering in Life Sciences*, 9, 227-238.
- Neves, L. O., Tomaz, L., Feveriero, M. P. S.** (2001). Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. Cv. Jemalong and *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 81-84.
- Ogawa, K., Kawasaki, A., Omura, M., Yoshida, T., Ikoma, Y., Yano, M.** (2001). 3',5'-Di-C-glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochemistry*, 57, 737-742.
- Ouyang, J., Wang, X., Zhao, B., Wang, Y.** (2003). Light intensity and spectral quality influencing the callus growth of *Cistanche deserticola* and biosynthesis of phenylethanoid glycosides. *Plant Science*, 165, 657-661.
- Ouyang, J., Wang, X.-D., Zhao, B., Wang, Y.-C.** (2005a). Improved production of phenylethanoid glycosides by *Cistanche deserticola* cells cultured in an internal loop airlift bioreactor with sifter riser. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 982-988.
- Ouyang, J., Wang, X.-D., Zhao, B., Wang, Y.-C.** (2005b). Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola*. *Process Biochemistry*, 40, 3480-3484.
- Oyama, K., Yoshida, K., Kondo, T.** (2011). Recent progress in the synthesis of flavonoids: from monomers to supra-complex molecules. *Current Organic Chemistry*, 15, 2567-2607.

- Qian, Z.-G., Zhao, Z.-J., Xu, Y., Qian, X., Zhong, J.-J.** (2005). Highly efficient strategy for enhancing taxoid production by repeated elicitation with a newly synthesized jasmonate in fed-batch cultivation of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 90, 516-521.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységou, L.** (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 586-621.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D., Hahn, E. J.** (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 287-300.
- Paek, K.-Y., Hahn, E.-J., Son, S.-H.** (2001). Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 37, 149-157.
- Paek, K.-Y., Murthy, H. N., Hahn, E.-J., Zhong, J. –J.** (2009). Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 113, 151-176.
- Palazón, J., Mallol, A., Eibl, R., Lettenbauer, C., Cusidó, R. M., Piñol, M. T.** (2003). Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor. *Planta Medica*, 69, 344-349.
- Palazón, J., Navarro-Ocaña, A., Hernandez-Vazquez, L., Mirjalili, M. H.** (2008). Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. *Molecules*, 13, 1722-1742.
- Pan, H., Fang, C., Zhou, T., Wang, Q., Chen, J.** (2007). Accumulation of calycosin and its 7-O-β-D-glucoside and related gene expression in seedlings of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao induced by low temperature stress. *Plant Cell Reports*, 26, 1111-1120.
- Panaia, M., Senaratna, T., Bunn, E., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K.** (2000). Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 23-29.
- Panda, A. K., Mishra, S., Bisaria, V. S., Bhojwani, S. S.** (1989). Plant cell reactors – a perspective. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 386-397.
- Park, S. U., Uddin, Md R., Xu, H., Kim, Y. K., Lee, S. Y.** (2008). Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4959-4965.
- Pasqua, G., Avato, P., Monacelli, B., Santamaria, A.-R., Argentieri, M.-P.** (2003). Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, 165, 977-982.
- Patisaul, H. B., Jefferson, W.** (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31, 400-419.
- Pavlov, A., Georgiev, M., Bley, T.** (2007). Batch and fed-batch production of betalains by red beet (*Beta vulgaris*) hairy roots in a bubble column reactor. *Zeitschrift für Naturforschung C: a Journal of Biosciences*, 62, 439-446.
- Pavlov, A. I., Georgiev, M. I., Panchev, I. N., Ilieva, M. P.** (2005). Optimization of rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM plant cell suspension in a laboratory bioreactor. *Biotechnology Progress*, 21, 394-396.
- Pavlov, A., Ilieva, M., Mincheva, M.** (2001). Release of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in two-phase culture systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 417-421.
- Peraza-Luna, F., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Bessiere, J.-M., Calva-Calva, G.** (2001). Sotolone production by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* in airlift with mesh bioreactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6012-6019.
- Pérez-Alonso, N., Wilken, D., Gerth, A., Jähn, A., Nitzsche, H.-M., Kerns, G., Capote-Perez, A., Jiménez, E.** (2009). Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 99, 151-156.
- Pernice, R., Borriello, G., Ferracane, R., Borrelli, R. C., Cennamo, F., Ritieni, A.** (2009). Bergamot: a source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. *Food Chemistry*, 112, 545-550.
- Petrova, A., Davids, L. M., Rautenbach, F., Marnewick, J.** (2011). Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103, 126-139.
- Piąteczak, E., Chmiel, A., Wysokińska, H.** (2005a). Mist trickling bioreactor for *Centaurium erythraea* Rafn growth of shoots and production of secoiridoids. *Biotechnology Letters*, 27, 721-724.
- Piąteczak, E., Wielanek, M., Wysokińska, H.** (2005b). Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurium erythraea* Rafn. *Plant Science*, 168, 431-437.
- Pietrosiuk, A., Furmanowa, M., Lata, B.** (2007). *Catharanthus roseus*: micropropagation and *in vitro* techniques. *Phytochemistry Reviews*, 6, 459-473.
- Pintos, B., Martín, J.-P., Centeno, M.-L., Villalobos, N., Guerra, H., Martín, L.** (2002). Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. *Plant Science*, 163, 955-960.
- Pistelli, L., Giovannini, A., Ruffoni, B., Bertoli, A., Pistelli, L.** (2010). Hairy root cultures for secondary metabolites production. W: *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors* (Giardi, M. T., Rea, G., Berra, B., ed). New York: Landes Bioscience and Springer Bioscience+Business Media, str. 167-184.
- Pniewski, T., Kapusta, J., Legocki, A. B.** (2002). *In vitro* micropropagation of four lupin species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24, 417-424.
- Polasek, J., Queiroz, E. F., Hostettmann, K.** (2007). On-line identification of phenolic compounds of trifolium species using HPLC-UV-MS and post-column UV-derivatisation. *Phytochemical Analysis*, 18, 13-23.
- Prakash, E., Sha Valli Khan, P. S., Sreenivasa Rao, T. J. V., Meru, E. S.** (2006). Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants. *Journal of Forest Research*, 11, 329-335.
- Prakash, G., Srivastava, A. K.** (2008). Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 218-226.
- Qi, L.-W., Li, P., Ren, M.-T., Yu, Q.-T., Wen, X.-D., Wang, Y.-X.** (2009). Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of *Radix Astragali* and its preparations. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2087-2097.
- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G. A.** (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.

- Ramakrishna, A., Ravishankar, G. A.** (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 1720-1731.
- Ramakrishnan, D., Curtis, W. R.** (2004). Trickle-bed root culture bioreactor design and scale-up: growth, fluid dynamics, and oxygen mass transfer. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 248-260.
- Rath, G., Touré, A., Nianga, M., Wolfender, J. L., Hostettmann, K.** (1995). Characterization of C-glycosylflavones from *Dissotis rotundifolia* by liquid chromatography – UV diode array detection – tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 41, 332-342.
- Rathore, J. S., Rathore, V., Shekhawat, N. S., Singh, R. P., Liler, G., Phulwaria, M., Dagla, H. R.** (2004). Micropropagation of woody plants. W: *Plant Biotechnology and Molecular Markers* (Srivastava, P. S., Narula, A., Srivastava, S., ed.). New Delhi: Anamaya Publishers, str. 195-205.
- Reed, B. M., Abdelnour-Esquivel, A.** (1991). The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience*, 26, 1320-1322.
- Reinhard, E., Kreis, W., Barthlen, U., Helmbold, U.** (1989). Semicontinuous cultivation of *Digitalis lanata* cells: production of β -methylidigoxin in a 300-L airlift bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 502-508.
- Roberts, S. C., Shuler, M.** (1997). Large-scale plant cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 154-159.
- Rodríguez-Mendiola, M. A., Stafford, A., Cresswell, R., Arias-Castro, C.** (1991). Bioreactors for growth of plant roots. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 697-702.
- Roowi, S., Crozier, A.** (2011). Flavonoids in tropical citrus species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12217-12225.
- Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G.** (2007). Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns. *Analytica Chimica Acta*, 582, 243-249.
- Rouf, S. A., Moo-Young, M., Scharer, J. M., Douglas, P. L.** (2000). Single versus multiple bioreactor scale-up: economy for high-value products. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 25-31.
- Rout, G. R.** (2005). Micropropagation of *Clitoria ternatea* Linn. (Fabaceae) – an important medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 41, 516-519.
- Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P.** (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18, 91-120.
- Ruffoni, B., Pistelli, L., Bertoli, A., Pistelli, L.** (2010). Plant cell cultures: bioreactors for industrial production. W: *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors* (Giardi, M. T., Rea, G., Berra, B., ed.). New York: Landes Bioscience and Springer Bioscience+Business Media, str. 203-221.
- Sagare, A. P., Suhasini, K., Krishnamurthy, K. V.** (1995). Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Science*, 109, 87-93.
- Sairam, R. V., Franklin, G., Hassel, R., Smith, B., Meeker, K., Kashikar, N., Parani, M., Abed, D. Al., Ismail, S., Berry, K., Goldman, S. L.** (2003). A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75, 79-85.
- Saafi, H., Borthakur, D.** (2002). *In vitro* plantlet regeneration from cotyledon of the tree legume *Leucaena leucocephala*. *Plant Growth Regulation*, 38, 279-285.
- Sasson, A.** (1992). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. W: *Biotechnology: economic and social aspects: issues for developing countries* (DaSilva, E. J., Ratledge, C., Sasson, A., ed.). Cambridge: University Press, str. 81-109.
- Sato, S., Akiya, T., Nishizawa, H., Suzuki, T.** (2006). Total synthesis of three naturally occurring 6,8-di-C-glycosylflavonoids: phloretin, naringenin, and apigenin bis-C- β -D-glucosides. *Carbohydrate Research*, 341, 964-970.
- Savitha, B. C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Ravishankar, G. A.** (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41, 50-60.
- Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C.** (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50, 199-204.
- Schutte-Vlok, A. L.** (1998). Not all milk and honeybush tea. One of the fynbos' characteristic genera, *Cyclopia*, faces several threats. *Veld & Flora*, 84, 90-91.
- Sequeda, Á., Tapia, E., Ortega, M., Zamora, P., Castro, Á., Montes, C., Zúñiga, G. E., Prieto, H.** (2012). Production of phenolic metabolites by *Deschampsia antarctica* shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15. DOI: 10.2225/vol15-issue4-fulltext-7
- Sharma, V., Goyal, S., Ramawat, K. G.** (2009). Scale up production of isoflavonoids in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* grown in shake flasks and bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 9, 267-271.
- Sharma, V., Goyal, S., Ramawat, K. G.** (2011). Increased puerarin biosynthesis during *in vitro* shoot formation in *Pueraria tuberosa* grown in growtek bioreactor with aeration. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17, 87-92.
- Shekhawat, N. S., Rathore, T. S., Singh, R. P., Deora, N. S., Rao, S. R.** (1993). Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. *Plant Growth Regulation*, 12, 273-280.
- Shimamura, N., Miyase, T., Umehara, K., Warashina, T., Fujii, S.** (2006). Phytoestrogens from *Aspalathus linearis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 1271-1274.
- Shimomura, K., Sudo, H., Saga, H., Kamada, H.** (1991). Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports*, 10, 282-285.
- Shinde, A. N., Malpathak, N., Fulzele, D. P.** (2009a). Studied enhancement strategies for phytoestrogens production in shake flasks by suspension culture of *Psoralea corylifolia*. *Bioresource Technology*, 100, 1833-1839.
- Shinde, A. N., Malpathak, N., Fulzele, D. P.** (2009b). Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 612-618.
- Silva, A. M. S., Pinto, D. C. G. A.** (2005). Structure elucidation of xanthone derivatives: studies of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2481-2497.

- Sim, S. J., Chang, H. N. (1993). Increased shikonin production by hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* in two phase bubble column reactor. *Biotechnology Letters*, 15, 145-150.
- Sissing, L., Marnewick, J., de Kock, M., Svanevelde, S., Joubert, E., Gelderblom, W. (2011). Modulating effects of rooibos and honeybush herbal teas on the development of esophageal papillomas in rats. *Nutrition and Cancer*, 63, 600-610.
- Sivakumar, G. (2006). Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. *Biotechnology Journal*, 1, 1419-1427.
- Sivakumar, G., Liu, C., Towler, M. J., Weathers, P. J. (2010). Biomass production of hairy roots of *Artemisia annua* and *Arachis hypogaea* in a scaled-up mist bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 107, 802-813.
- Sivakumar, G., Medina-Bolivar, F., Lay Jr., J. O., Dolan, M. C., Condori, J., Grubbs, S. K., Wright, S. M., Baque, M. A., Lee, E. J., Paek, K. Y. (2011). Bioprocess and bioreactor: next generation technology for production of potential plant-based antidiabetic and antioxidant molecules. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 79-90.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Szewczyk, A., Piekoszewska, A., Ekiert, H. (2005). Biotransformation of hydroquinone to arbutin in plant *in vitro* cultures – preliminary results. *Acta Physiologiae plantarum*, 27, 79-87.
- Slimestad, R., Fossen, T., Verheul, M. J. (2008). The flavonoids of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2436-2441.
- Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 187-228.
- Son, S. H., Choi, S. M., Lee, Y. H., Choi, K. B., Yun, S. R., Kim, J. K., Park, H. J., Kwon, O. W., Noh, E. W., Seon, J. H., Park, Y. G. (2000). Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Reports*, 19, 628-633.
- Spieler, H., Alfermann, A. W., Reinhard, E. (1985). Biotransformation of β -methylidigoxin by cell cultures of *Digitalis lanata* in airlift and stirred tank reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 1-4.
- Sprent, J. I., Odee, D. W., Dakora, F. D. (2010). African legumes: a vital but under-utilized resource. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1257-1265.
- Spriggs, A. C., Dakora, F. D. (2007). Competitive ability of selected *Cyclopia* Vent. Rhizobia under glasshouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 58-67.
- Spriggs, A. C., Dakora, F. D. (2009a). Field assessment of symbiotic N_2 fixation in wild and cultivated *Cyclopia* species in the South African fynbos by ^{15}N natural abundance. *Tree Physiology*, 29, 239-247.
- Spriggs, A. C., Dakora, F. D. (2009b). Symbiotic performance of selected *Cyclopia* Vent. (honeybush) rhizobia under nursery and field conditions. *Symbiosis*, 48, 143-153.
- Srivastava, S., Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 29-43.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.
- Steenkamp, V., Fernandes, A. C., Van Rensburg, C. E. J. (2004). Antioxidant scavenging potential of South African export herbal teas. *South African Journal of Botany*, 70, 660-663.
- Su, W. W. (1995). Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 50, 189-230.
- Su, W. W., Humphrey, A. E. (1991). Production of rosmarinic acid from perfusion culture of *Anchusa officinalis* in a membrane-aerated bioreactor. *Biotechnology Letters*, 13, 889-892.
- Su, W. W., Lei, F., Kao, N. P. (1995). High density cultivation of *Anchusa officinalis* in a stirred-tank bioreactor with *in situ* filtration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 293-299.
- Sudo, H., Yamakawa, T., Yamazaki, M., Aimi, N., Saito, K. (2002). Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila*. *Biotechnology Letters*, 24, 359-363.
- Sung, L.-S., Huang, S.-Y. (2006). Lateral root bridging as a strategy to enhance L-DOPA production in *Stizolobium hassjoo* hairy root cultures by using a mesh hindrance mist trickling bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 441-447.
- Suresh, B., Bais, H. P., Raghavarao, K. S. M. S., Ravishankar, G. A., Ghildyal, N. P. (2005). Comparative evaluation of bioreactor design using *Tagetes patula* L. hairy roots as a model system. *Process Biochemistry*, 40, 1509-1515.
- Sutcliffe, M. A., Whitehead, C. S. (1994). Role of ethylene and short-chain saturated fatty acids in the smoke-stimulated germination of *Cyclopia* seed. *Journal of Plant Physiology*, 145, 271-276.
- Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S. (2005). Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 9-17.
- Swedlund, B., Locy, R. D. (1993). Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiology*, 103, 1339-1346.
- Sydlowska-Baranek, K., Furmanowa, M. (2005). Taxane production in suspension culture of *Taxus × media* var. *Hicksii* carried out in flasks and bioreactor. *Biotechnology Letters*, 27, 1301-1304.
- Szopa, A., Ekiert, H., Szewczyk, A., Fugas, E. (2012). Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110, 329-336.
- Tabata, H. (2004). Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 87, 1-23.
- Talamond, P., Conejero, G., Verdeil, J.-L., Poëssel, J.-L. (2011). Isolation of C-glycosyl xanthenes from *Coffea pseudozanguebariae* and their location. *Natural Product Communications*, 6, 1885-1888.
- Tanaka, T., Sueyasu, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I. (1984). Tannins and related compounds. XXI.¹⁾ Isolation and characterization of galloyl and p-hydroxybenzoyl esters of benzophenone and xanthone C-glucosides from *Mangifera indica* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 2676-2686.

- Terrier, B., Courtois, D., Hénault, N., Cuvier, A., Bastin, M., Aknin, A., Dubreuil, J., Pétiard, V.** (2007). Two new disposable bioreactors for plant cell culture: the wave and undertow bioreactor and the slug bubble bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 914-923.
- Thanonkeo, S., Panichajakul, S.** (2006). Production of isoflavones, daidzein and genistein in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica*. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 28, 45-53.
- Thiem, B.** (2003). *In vitro* propagation of isoflavone-producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Science*, 165, 1123-112.
- Thomas, B.** (2011). The Death of Honeybush? *World Tea News*, 01 Mar 2011, www.worldteanews.com
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R.** (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 835-855.
- Tiwari, S., Verma, P. C., Singh, P. K., Tuli, R.** (2009). Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances*, 27, 449-467.
- Treutter, D.** (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 147-157.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M.** (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chemistry*, 104, 466-479.
- Tűmová, L., Tűma, J.** (2011). The effect of UV light on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 635-640.
- Turpie, J. K., Heydenrych, B. J., Lamberth, S. J.** (2003). Economic value of terrestrial and marine biodiversity in the Cape Floristic Region: implications for defining effective and socially optimal conservation strategies. *Biological Conservation*, 112, 233-251.
- Udomsuk, L., Juengwattanarakul, T., Jarukamjorn, K., Putalun, W.** (2012). Increased miroestrol, deoxymiroestrol and isoflavonoid accumulation in callus and cell suspension cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1093-1100.
- Unger, K. K., Skudas, R., Schulte, M. M.** (2008). Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A*, 1184, 393-415.
- Uozumi, N.** (2004). Large-scale production of hairy root. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 91, 75-103.
- Vágner, M., Vondráková, Z., Fischerová, L., Opatrná, J.** (2005). Norway spruce somatic embryogenesis: membrane rafts as a compromise between liquid and solidified media. W: *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation* (Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W., ed.). Dordrecht: Springer-Verlag, str. 295-302.
- Van der Bank, M., Chase, M. W., Van Wyk, B.-E., Fay, M. F., Van der Bank, F. H., Reeves, G., Hulme, A.** (2002). Systematics of the tribe Podalyrieae (Fabaceae) based on DNA, morphological and chemical data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 139, 159-170.
- Van der Merwe, J. D., Joubert, E., Richards, E. S., Manley, M., Snijman, P. W., Marnewick, J. L., Gelderblom, W. C. A.** (2006). A comparative study on the antimutagenic properties of aqueous extracts of *Aspalathus linearis* (rooibos), different *Cyclopia* spp. (honeybush) and *Camelia sinensis* teas. *Mutation Research*, 611, 42-53.
- Van Gulik, W. M., Ten Hoopen, H. J. G., Heijnen, J. J.** (2001). The application of continuous culture for plant cell suspensions. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 796-805.
- Van Nederkassel, A. M., Vijverman, V., Massart, D. L., Vander Heyden, Y.** (2005). Development of a *Ginkgo biloba* fingerprint chromatogram with UV and evaporative light scattering detection and optimization of the evaporative light scattering detector operating conditions. *Journal of Chromatography A*, 1085, 230-239.
- Van Wyk, B.-E.** (2008). A broad review of commercially important Southern African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 342-355.
- Van Wyk, B.-E.** (2011a). The potential of South-African plants in the development of new food and beverage products. *South African Journal of Botany*, 77, 857-868.
- Van Wyk, B.-E.** (2011b). The potential of South-African plants in the development of new medicinal products. *South African Journal of Botany*, 77, 812-829.
- Vandercook, C. E., Tisserat, B.** (1989). Flavonoid changes in developing lemons grown *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry*, 28, 799-803.
- Verhoog, N. J. D., Joubert, E., Louw, A.** (2007a). Screening of four *Cyclopia* (honeybush) species for putative phyto-oestrogenic activity by oestrogen receptor binding assays. *South African Journal of Science*, 103, 13-21.
- Verhoog, N. J. D., Joubert, E., Louw, A.** (2007b). Evaluation of the phytoestrogenic activity of *Cyclopia genistoides* (honeybush) methanol extracts and relevant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4371-4381.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J.** (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1, 13-25.
- Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Hoge, J. H. C., Ten Hoopen, H. J. G.** (1994). Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 2307-2310.
- Villarreal, Ma. L., Arias, C., Vega, J., Feria-Velasco, A., Ramírez, O. T., Nicasio, P., Rojas, G., Quintero, R.** (1997). Large-scale cultivation of *Solanum chrysotrichum* cells: production of the antifungal saponin SC-1 in 10-l airlift bioreactors. *Plant Cell Reports*, 16, 653-656.
- Vyas, A., Syeda, K., Ahmad, A., Padhye, S., Sarkar, F. H.** (2012). Perspectives on medicinal properties of mangiferin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 412-425.
- Wang, J., Chung, M. H., Xue, B., Ma, H., Ma, C., Hattori, M.** (2010). Estrogenic and antiestrogenic activities of phloridzin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 592-597.
- Wang, Y.** (2008). Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. *Phytochemistry Reviews*, 7, 395-406.
- Wang, Y., Li, L., Wang, Q., Li, Y.** (2001). An improved phase transfer catalyzed synthetic method for ononin and rothindin. *Synthetic Communications*, 31, 3423-3427.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., ed.). San Diego, California: Academic Press Inc., str. 315-322.

- Wink, M., Alfermann, A. W., Franke, R., Wetterauer, B., Distl, M., Windhövel, J., Krohn, O., Fuss, E., Garden, H., Mohagheghzadeh, A., Wildi, E., Ripplinger, P. (2005). Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resources*, 3, 90-100.
- Wu, J., Zhong, J.-J. (1999). Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. *Journal of biotechnology*, 68, 89-99.
- Wu, S. Q., Lian, M. L., Gao, R., Park, S. Y., Piao, X. C. (2011). Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 47, 719-724.
- Xu, C. M., Ou, Y., Zhao, B., Wang, X. D., Yuan, X. F., Wang, Y. C. (2008). Syringin production by *Saussurea medusa* cell cultures in a novel bioreactor. *Biologia Plantarum*, 52, 377-380.
- Xu, F., Zhang, Y., Xiao, S., Lu, S., Yang, D., Yang, X., Li, C., Shang, M., Tu, P., Cai, S. (2006). Absorption and metabolism of *Astragal radix* decoction: *in silico*, *in vitro*, and a case study *in vivo*. *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 913-924.
- Xu, R.-Y., Nan, P., Yang, Y., Pan, H., Zhou, T., Chen, J. (2011). Ultraviolet irradiation induces accumulation of isoflavonoids and transcription of genes of enzymes involved in the calycosin 7-*O*- β -D-glucoside pathway in *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao. *Physiologia Plantarum*, 142, 265-273.
- Yang, R. Y. K., Bayraktar, O., Pu, H. T. (2003). Plant-cell bioreactors with simultaneous electropermeabilization and electrophoresis. *Journal of Biotechnology*, 100, 13-22.
- Yeoman, M. M., Yeoman, C. L. (1996). Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*, 134, 553-569.
- Yong, J. W. H., Ge, L., Ng, Y. F., Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14, 5144-5164.
- Yu, D. H., Bao, Y. M., Wei, C. L., An, L. J. (2005a). Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from *Astragalus mongholicus* Bunge. *Biomedical and Environmental Sciences*, 18, 297-301.
- Yu, F., Zhang, D., Bai, F., An, L. (2005b). The accumulation of isocampthoecetin A and B in suspension cell culture of *Campthoeca acuminata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 159-163.
- Yuldashev, M. P., Batirov, É. Kh., Vdovin, A. D., Malikov, V. M., Yagudaev, M. R. (1989). Flavonoids of *Thermopsis alterniflora*. *Chemistry of Natural Compounds*, 25, 303-308.
- Zagoskina, N. V., Dubravina, G. A., Alyavina, A. K., Goncharuk, E. A. (2003). Effect of ultraviolet radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant callus cultures. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50, 270-275.
- Zenkteler, M. (1984). Hodowle komórek. W: *Hodowle komórek i tkanek roślinnych* (Zenkteler, M., ed.). Warszawa: PWN, str. 285.
- Zhang, Q., Di, Y.-T., He, H.-P., Fang, X., Chen, D.-L., Yan, X.-H., Zhu, F., Yang, T.-Q., Liu, L.-L., Hao, X.-J. (2011). Phragmalin- and mexicanolide-type limonoids from the leaves of *Trichilia connaroides*. *Journal of Natural Products*, 74, 152-157.
- Zhang, W., Furusaki, S. (1999). Production of anthocyanins by plant cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 4, 231-252.
- Zhang, Z.-Y., Zhong, J.-J. (2004). Scale-up of centrifugal impeller bioreactor for hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high-density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Biotechnology Progress*, 20, 1076-1081.
- Zhao, D., Xing, J., Li, M., Lu, D., Zhao, Q. (2001). Optimization of growth and jaceosidin production in callus and cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 227-234.
- Zhao, D. L., Gou, G. Q., Wang, X. Y., Zheng, G. C. (2003/4). *In vitro* micropropagation of a medicinal plant species *Sophora flavescens*. *Biologia Plantarum*, 47, 117-120.
- Zhao, P., Hamada, C., Inoue, K., Yamamoto, H. (2003). Efficient production and capture of 8-prenylnaringenin and leachianone G – biosynthetic intermediates of sophoraflavanone G – by the addition of cork tissue to cell suspension cultures of *Sophora flavescens*. *Phytochemistry*, 62, 1093-1099.
- Zhao, J., Verpoorte, R. (2007). Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. *Phytochemistry Reviews*, 6, 435-457.
- Zhong, J.-J. (2001). Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 72, 1-26.
- Zhong, J.-J. (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 591-599.
- Zhong, J.-J., Chen, F., Hu, W.-W. (1999). High density cultivation of *Panax notoginseng* cells in stirred bioreactors for the production of ginseng biomass and ginseng saponin. *Process Biochemistry*, 35, 491-496.
- Zhong, J.-J., Fujiyama, K., Seki, T., Yoshida, T. (1994). A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 649-654.
- Zhong, J.-J., Yoshida, M., Fujiyama, K., Seki, T., Yoshida, T. (1993). Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in a stirred bioreactor with internal light irradiation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 299-303.
- Zobayed, S. M. A., Murch, S. J., Rupasinghe, H. P. V., De Boer, J. G., Glickman, B. W., Saxena, P. K. (2004). Optimized system for biomass production, chemical characterization and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Plant Science*, 167, 439-446.
- Zobayed, S. M. A., Murch, S. J., Rupasinghe, H. P. V., Saxena, P. K. (2003). Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75, 143-149.