



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2017, 8, 68-79
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

ROŚLINNE METABOLITY JAKO KLUCZOWY BIOPRODUKT BIOTECHNOLOGII ROŚLIN

Mateusz Kawka^{1,2}, Maciej Pilarek¹, Katarzyna Sykłowska-Baranek^{2,*}, Agnieszka Pietrosiuk²

¹Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska
ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa

²Zakład Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

* autorka korespondująca, tel: + 48 22 572 0982, e-mail: katarzyna.syklowska-baranek@wum.edu.pl

Otrzymano 2.08.2017, zaakceptowany 27.09.2017, zamieszczony 13.12.2017

STRESZCZENIE

Produkcja farmaceutycznie wartościowych metabolitów wtórnych z wykorzystaniem biomasy roślinnej hodowanej *in vitro* pozwala na ścisłą kontrolę warunków układu hodowlanego. Ta metoda może stanowić ekonomicznie uzasadnioną alternatywę wobec metod konwencjonalnych pod warunkiem odpowiednio wysokiej wydajności otrzymywanych związków. Obecnie wiele uwagi poświęca się badaniom nad optymalizacją warunków hodowli *in vitro*, dążąc do intensyfikacji procesów biosyntezy i wzrostu biomasy pożądaných roślinnych metabolitów wtórnych.

SŁOWA KLUCZOWE: biotechnologia roślin, roślinne metabolity wtórne, hodowle *in vitro*.

ABSTRACT

PLANT SECONDARY METABOLITES AS AN ESSENTIAL BIOPRODUCT OF PLANT BIOTECHNOLOGY

Tight control of culture conditions is possible if pharmaceutically valuable secondary metabolites are derived from plant biomass cultured *in vitro*. This approach can be economically attractive compared to conventional methods, provided the yields of the desired compounds are sufficiently high. Currently, considerable attention is focused on the optimization of *in vitro* culture conditions, with the aim of promoting the growth of biomass and facilitating the biosynthesis of the desired plant secondary metabolites.

KEYWORDS: plant biotechnology, plant secondary metabolites, *in vitro* cultures.

1. Wstęp

Aktywność biologiczna roślinnych metabolitów wtórnych determinuje funkcjonalność tych substancji jako wartościowych bioproduktów dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego. Rosnące zapotrzebowanie rynku oraz ograniczenia konwencjonalnych metod pozyskiwania bioproduktów pochodzenia roślinnego motywują do poszukiwania alternatywnych, wydajniejszych sposobów produkcji użytecznych związków biologicznie czynnych z biomasy roślinnej. Szansę taką stanowią aplikacje hodowli komórek i tkanek roślinnych prowadzonych w warunkach *in vitro*. Zamiana środowiska naturalnego na podlegające ścisłej kontroli syntetyczne warunki określające specyfikę hodowli *in vitro* pozwala na uzyskiwanie większych wydajności biosyntezy metabolitów w biomase otrzymanej z izolowanych eksplantatów roślinnych. Możliwość wyboru metody optymalizacji hodowli *in vitro* pozwala na dobranie ścieżki postępowania odpowiedniej dla danego gatunku rośliny oraz pożądanego metabolitu [1].

2. Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w hodowlach *in vitro* biomasy roślinnej

Obecność w biomase roślinnej związków odżywczych bądź biologicznie aktywnych decyduje o wykorzystaniu roślin w badaniach naukowych oraz w licznych gałęziach przemysłu. Postęp naukowy w zakresie biotechnologii roślin

determinuje wdrażanie nowych, wydajnych metod hodowli roślin, ich organów, tkanek i komórek oraz izolacji z biomasy roślinnej cennych związków chemicznych.

Poznanie biochemicznych podstaw funkcjonowania roślin pozwoliło wyróżnić dwa poziomy metabolizmu tej grupy organizmów. Metabolizm podstawowy definiuje się jako ogół wewnątrzkomórkowych procesów biochemicznych, koniecznych do zachowania przez daną komórkę elementarnych funkcji życiowych. Produkty tych procesów mogą zostać wykorzystane przez komórkę do metabolizmu wtórnego, stanowiąc substraty do biosyntezy roślinnych metabolitów wtórnych. Należące do tej grupy związki chemiczne cechuje złożona struktura chemiczna i aktywność biologiczna wykorzystywana przez roślinę w przystosowaniu się do bytowania w danych warunkach środowiskowych [2]. Szacuje się, że spośród dotychczas poznanych związków chemicznych pochodzenia naturalnego aż 80% jest biosyntezowane przez rośliny [3]. Poznanie funkcjonalnych właściwości biologicznych i chemicznych wielu metabolitów wtórnych pozwoliło na zastosowanie ich jako wartościowych bioproduktów m. in. w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

Otrzymywanie metabolitów wtórnych z roślin pochodzących ze środowiska naturalnego i tradycyjnych upraw ma istotne ograniczenia. Na biosyntezę metabolitów wtórnych ma wpływ zdolność przystosowania się do zmiennych warunków temperaturowych i fotoperiodu, a także działa-

nie abiotycznych i biotycznych czynników stresogennych [4]. W konsekwencji wydajność bioproduktów zależy od sezonowości upraw oraz warunków klimatycznych bezpośrednio związanych z ich występowaniem geograficznym [5].

Alternatywnym sposobem otrzymywania roślinnych metabolitów wtórnych jest wykorzystanie metod hodowli *in vitro* w celu namnożenia biomasy roślinnej. Hodowle *in vitro* komórek i tkanek roślinnych charakteryzuje możliwość ścisłej kontroli warunków panujących wewnątrz układu hodowlanego, np. w bioreaktorze.

Poza zapewnieniem optymalnych warunków, tj. temperatury oraz intensywności i periodyczności naświetlenia dla danego typu biomasy, konieczne jest ustalenie właściwego składu medium hodowlanego oraz utrzymanie warunków jakości w czasie trwania hodowli. Odizolowanie i uniezależnienie układu hodowlanego od zmiennych warunków środowiska naturalnego prowadzi do poprawy wydajności i powtarzalności wyników kolejnych poziomów hodowlanych [6].

Podstawowym kryterium klasyfikacji metod roślinnych hodowli *in vitro* jest rodzaj hodowanej biomasy. W zależności od celu hodowli, typu układu hodowlanego, gatunku rośliny oraz postaci biomasy (kalus, izolowane komórki, organy, całe osobniki), dobierane są odpowiednie parametry środowiska hodowli i protokoły postępowania [7].

2.1. Hodowle wglębne komórek tkanki kalusowej

Jednym z głównych typów biomasy roślinnej hodowanej w warunkach *in vitro* jest tkanka kalusowa (tzw. kalus; ang. *callus*). Jest ona zbudowana z komórek parenchymatycznych oraz merystematycznych i cechuje się niewielkim stopniem lub brakiem zróżnicowania. Powstawanie kalusa *in vivo* indukowane jest przez zranienie rośliny i ma na celu zabliźnienie rany. W warunkach *in vitro* tkankę kalusową otrzymuje się na drodze dedyferencjacji (czyli odróżnicowania) zróżnicowanej tkanki roślinnej w wyniku działania na pobrany do doświadczenia fragment rośliny (eksplantat pierwotny) odpowiednią mieszaniną roślinnych regulatorów wzrostu. Poza ich dodatkiem do medium hodowlanego, dla poprawy efektywności procesu dedyferencjacji istotną okazuje się również podwyższona temperatura, zapewnienie właściwego fotoperiodu oraz młody wiek pobranego z rośliny macierzystej eksplantatu pierwotnego [8].

Otrzymany kalus bądź inny fragment eksplantatu można wykorzystać do uzyskania zawiesiny komórek roślinnych. W tym celu konieczne jest rozdzielenie komórek kalusa lub ich agregatów i następnie rozproszenie ich w ciekłym medium hodowlanym, na przykład przy użyciu mieszadła układu hodowlanego z wykorzystaniem wstrząsarki laboratoryjnej [9]. W efekcie otrzymujemy hodowle wglębne zawiesiny ustabilizowanych metabolicznie komórek roślinnych. Niezróżnicowana funkcjonalnie postać tkanki kalusowej jak i wyprowadzonych z nich zawiesin komórek kalusa ma dwie zasadnicze konsekwencje: (i) komórki kalusa cechują się brakiem stabilności genetycznej przejawiającej się w postaci aberracji chromosomowych (poliploidia), które nasilają się wraz z wiekiem hodowli [9], a w ich efekcie obserwowane mogą być losowe wahania wydajności biosyntezy metabolitów; (ii) w przypadku wielu gatunków roślin obserwujemy spadek wydajności biosyntezy metabolitów w zawieszynie komórkowej, w porównaniu z hodowlą całych roślin - zjawisko to jest związane z różnicą w ekspresji genów odpowiedzialnych za szlaki biosyntezy [10]. Jednakże wykazano, że przynajmniej dla części roślinnych metabolitów wtórnych o interesujących właściwościach, dzięki użyciu zawiesiny komórek możliwe jest uzyskanie wielokrotnie większej wydajności biosyntezy od obserwowanej w roślinie badanego gatunku hodowanej *in vivo* [9]. Jest to efekt selekcji genetycznej mutantów komórek przy odpowiednio dobranych parametrach hodowli.

Przykłady gatunków roślin, dla których zastosowanie hodowli wglębnych zawiesin komórek tkanki kalusowej charakteryzowało się zwiększoną wydajnością biosyntezy metabolitów wtórnych, przedstawione zostały w tabeli 1.

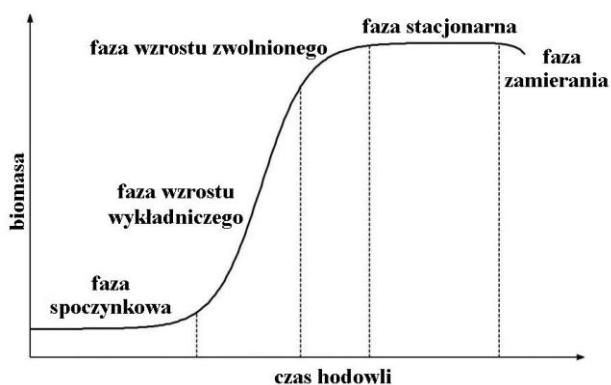
Z punktu widzenia potencjalnej komercjalizacji hodowli *in vitro*, stosowanej w produkcji roślinnych metabolitów wtórnych, hodowle zawiesin komórek roślinnych wykazują szereg zalet w porównaniu do hodowli kalusa prowadzonych na podłożach stałych. Jedną z nich jest sama postać zawiesiny komórek i względnie prosta do uzyskania homogeniczność zawiesiny, co sprawia, że operacje wymiany lub sterylizacji pożywki, dobrania naczynia hodowlanego czy jego czyszczenia są mniej kłopotliwe technologicznie niż to ma miejsce w przypadku hodowli wykorzystujących media zestalone. Postać zawiesiny wiąże się z łatwiejszym dostępem składników medium hodowlanego do komórek, które w hodowlach zawiesin rosną i dzielą się znacznie intensywniej niż w agregatach tkanki kalusowej [20].

Tabela 1. Przykłady hodowli wglębnych zawiesin komórek tkanki kalusowej, charakteryzujących się zwiększoną wydajnością biosyntezy metabolitów wtórnych [9].

Metabolit	Gatunek rośliny	Wydajność (% suchej masy)	Bibliografia
kwask rozmarynowy	<i>Salvia officinalis</i>	36,0	[11]
szikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	12,4	[12]
antrachinony	<i>Morinda citrifolia</i>	18,0	[13]
berberylna	<i>Tropaeolum minus</i>	10,6	[14]
jatrorozyna	<i>Berberis wilsonae</i>	10,0	[15]
antocyjaniny	<i>Perilla frutescens</i>	8,9	[16]
diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	3,8	[17]
sanguinaryna	<i>Papaver somniferum</i>	2,5	[18]
serpentylna	<i>Catharanthus roseus</i>	2,2	[19]
ajmalicyna	<i>Catharanthus roseus</i>	1,0	[9]

Biosynteza roślinnych metabolitów wtórnych jest ściśle uzależniona od metabolizmu pierwotnego, a to przekłada się na niższą wydajność roślinnych metabolitów wtórnych w czasie wzrostu i podziałów komórek. Zjawisko to jest konsekwencją dominującego wykorzystania substratów na potrzeby metabolizmu pierwotnego związanego ze wzrostem i oddychaniem komórkowym. Nie dotyczy ono jednak tych metabolitów wtórnych, których produkcja powiązana jest ze wzrostem niezróżnicowanych komórek, co ma miejsce na przykład w przypadku barwników z grupy betalain i karotenoidów [7].

Wzrost komórek roślinnych w okresowej hodowli zawiesiny komórek można opisać przy pomocy krzywej o sigmoidalnym kształcie. Wyróżnia się pięć faz wzrostu [21] (ryc. 1). Biosynteza roślinnych metabolitów wtórnych najwydajniej zachodzi w fazie spoczynkowej wzrostu, co wynika z ukierunkowanej funkcjonalności produktów metabolizmu wtórnego komórek roślinnych, czyli przystosowania namnożonej biomasy do środowiska wzrostu [22].



Ryc. 1. Krzywa wzrostu komórek roślinnych w hodowli zawiesinowej [21].

2.2. Hodowle korzeni włośnikowatych

Wysoka wydajność roślinnych metabolitów wtórnych może być uzyskana w hodowlach organów roślinnych. Najczęściej wykorzystuje się zróżnicowaną i zintegrowaną biomasę w postaci hodowli korzeni włośnikowych (synonimy: korzenie transformowane, korzenie włośnikowate). Organy te uzyskuje się na drodze transformacji eksplantatu roślinnego Gram-ujemną bakterią z gatunku *Agrobacterium rhizogenes*. Jest ona nosicielką plazmidu Ri (ang. *root-inducing*), zawierającego fragment T-DNA włączony do genomu zainfekowanej roślinnej komórki, którego ekspresja prowadzi do syntezy auksyn oraz opin [23]. Powodzenie transformacji i indukcji wzrostu korzeni włośnikowatych zależy od gatunku rośliny, wieku oraz rodzaju tkanki roślinnej wybranej jako eksplantat. Równie istotnymi parametrami są wirulencja użytego szczepu *A. rhizogenes*, a także gęstość zawiesiny bakteryjnej [4].

Fizjologicznymi efektami ekspresji nabytych genów są nowe cechy fenotypowe eksplantatu charakterystyczne dla korzeni włośnikowych, korzystne z punktu widzenia hodowli w warunkach *in vitro*, a wśród nich szybki wzrost w medium pozbawionym dodatku roślinnych regulatorów wzrostu, brak geotropizmu oraz intensywne generowanie włośników w strukturze korzeni [9].

Kwestią o dużym znaczeniu praktycznym dla powiększenia skali hodowli *in vitro* korzeni włośnikowych jest ich długoterminowa stabilność genetyczna w porównaniu z ho-

downą zawiesin komórek niezróżnicowanych [24]. Przykładem mogą być dane dotyczące stabilności wzrostu i biosyntezy alkaloidu hioscyjminy w hodowli korzeni włośnikowych *Datura stramonium* (pol. bielun dziedzierzawa), która utrzymywała się na stałym poziomie przez 5 lat [25]. Niestety, w przypadku innych gatunków nie udało się długookresowo utrzymać tempa wzrostu korzeni włośnikowych, np. dla *Duboisia myoporides*, czego powodem mogły być zaburzenia ekspresji genów T-DNA w transformowanych korzeniach [26].

Niemniej ważny jest profil metabolitów wtórnych biosyntezowanych przez hodowane *in vitro* korzenie włośnikowe, porównywalny z korzeniami anatomicznymi pozyskiwanymi bądź na drodze ich hodowli w warunkach *in vitro*, bądź z roślin rosnących w gruncie [7]. W przypadku wielu roślinnych metabolitów wtórnych zdolność do ich biosyntezy jest specyficzną cechą danego organu, co związane jest z dyferencjacją komórek i ekspresją genów odpowiednich procesów metabolicznych. Doświadczalne potwierdzenie takiej zależności zaobserwowano dla biosyntezy szikoniny w korzeniach transformowanych *Lithospermum erythrorhizon* (pol. nawrot lekarski), alkaloidów pirydynowych przez *Nicotiana tabacum* (pol. tytoń szlachetny), bądź wspomnianych już alkaloidów tropanowych przez rośliny należące do rodziny *Solanaceae* (pol. psiankowate) [24]. Ciekawy przypadek stanowi produkcja ginsenozydów, które w naturze biosyntezowane są w liściach *Panax ginseng* (pol. żeń-szeń właściwy), zaś korzenie stanowią jedynie miejsce ich akumulacji. Jak się okazało, korzenie włośnikowe *P. ginseng* w kulturach *in vitro* również są zdolne do wydajnego wytwarzania tej grupy związków [27]. Zjawisko takie zaobserwowano tylko dla niewielkiej liczby gatunków i metabolitów.

Wynikiem prac badawczych nad hodowlą korzeni włośnikowych, ukierunkowanych na produkcję użytecznych roślinnych metabolitów wtórnych, było zwiększenie wydajności biosyntezy wybranych związków [4]. Potwierdzona została również zdolność korzeni do wzrostu oraz jednoczesnej biosyntezy metabolitów wtórnych. Cechy takiej nie wykazują hodowle zawiesin komórek roślinnych [7,13].

Kinetyka wzrostu organów roślinnych jest w kulturach *in vitro* bardziej złożona w porównaniu z hodowlą węgelną zawiesiny komórek tkanki kalusowej. Wynika to z zasadniczych różnic w mechanizmie wzrostu zintegrowanych funkcjonalnie i przestrzennie eksplantatów (np. organów). W pędach i korzeniach, również transformowanych, podziały komórkowe zachodzą jedynie w merystemach zlokalizowanych w ich wierzchołkach. W odniesieniu do wyników badań prowadzonych z udziałem korzeni włośnikowatych można stwierdzić, iż obserwowaną dla nich kinetykę wzrostu opisuje krzywa logistyczna [22]. Przyczyną takiego stanu rzeczy może być wpływ endogennych auksyn stymulujących powstawanie merystemów apikalnych w coraz liczniejszych rozgałęzieniach. Ponadto, uzyskana na skutek transformacji indukcja metabolizmu wtórnego w korzeniach włośnikowych może być źródłem ich często wykazywanej zdolności do zwiększonej biosyntezy metabolitów wtórnych, towarzyszącej jednoczesnemu dynamicznemu wzrostowi [24]. Podwojenie biomasy w hodowlach organów może być osiągalne już po jednym dniu [25].

2.3. Hodowle innych organów roślin

Pędy są organami roślinnymi, których wykorzystanie jest możliwe do wydajnej produkcji metabolitów wtórnych

w warunkach hodowli *in vitro*. Charakterystyka hodowli *in vitro* pędów wykazuje szereg podobieństw do hodowli korzeni. Dotyczy to m.in. długotrwałej stabilności genetycznej zintegrowanego materiału biologicznego, porównywalnych z naturalnie rosnącymi roślinami profilu i wydajności produkowanych metabolitów wtórnych, a także zdolności do równoczesnej wydajnej biosyntezy oraz wzrostu biomasy [7]. W przypadku kultur *in vitro* pędów możliwa jest również ich transformacja. Wykorzystywanym do tego gatunkiem bakterii jest *Agrobacterium tumefaciens*. Ta bakteria posiada plazmid Ti (ang. *tumor-inducing*), którego fragment T-DNA ulega integracji z genomem zainfekowanej komórki eksplantatu analogicznie do transformacji przy użyciu *A. rhizogenes* [28].

Hodowle *in vitro* pędów charakteryzują się wolniejszym przyrostem biomasy w porównaniu do opisanej wcześniej hodowli tkanki korzeniowej oraz bezwzględnie wymagają dostępności światła z zakresu widma światła słonecznego. Zaletą hodowli *in vitro* pędów jest zdolność do wydajnej syntezy specyficznych tylko dla tych organów metabolitów wtórnych, których produkcja w hodowlach *in vitro* korzeni jest mało wydajna lub niemożliwa [7].

3. Zwiększenie wydajności biosyntezy roślinnych metabolitów wtórnych

Strategie zwiększania wydajności bioproduktów pochodzenia roślinnego obejmują modyfikacje składu medium hodowlanego oraz zastosowanie różnych metod wydzielania bioproduktów (ang. *downstream processes*) z układów hodowlanych. Hodowle należy poprzedzić selekcją linii komórkowych lub linii organów (w zależności od profilu układu hodowlanego) w kierunku pozyskania biomasy charakteryzującej się ponadprzeciętną produktywnością danego metabolitu [5]. Wyniki prac badawczych pozwalają na wstępne określenie znaczenia poszczególnych składników medium hodowlanego dla wydajności biosyntezy roślinnych metabolitów wtórnych oraz potencjalnie umożliwiają optymalizację składu medium hodowlanego. Najczęściej stosowanymi podłożami hodowlanymi są podłoża MS (Murashige'a i Skooga), LS (Linsmaier i Skooga, 1965), B5 (Gamborga i in.) [5]. Stanowią one standardy o ściśle określonej zawartości makro- i mikroelementów oraz substancji organicznych. W warunkach realizacji danego bioprocessu standardowe media hodowlane poddaje się wielu modyfikacjom w odniesieniu do stężeń składników lub suplementacji nowymi składnikami chemicznymi.

Obserwowany w warunkach hodowli *in vitro* heterotroficzny metabolizm komórek roślinnych sprawia, że konieczne jest dostarczenie do układu hodowlanego źródła węgla organicznego w postaci węglowodanów, najczęściej mono- lub disacharydów. Do tego celu najczęściej stosowane są sacharoza, glukoza, fruktoza oraz rzadziej sorbitol [9]. Doświadczenia wykazały, iż zwiększenie stężenia cukrów w pożywce hodowlanej wywołuje w komórkach roślinnych stres osmotyczny, prowadzący do podniesienia poziomu akumulacji metabolitów. Przykładem są wyniki uzyskane w hodowli węgłnej zawiesiny komórek *Coleus blumei* (pol. koleus Blumego, pokrzywka brazylijska), wytwarzającej kwas rozmarynowy. W niezróżnicowanej biomacie tego gatunku trzykrotny wzrost stężenia cukru spowodował zwiększenie wydajności wytwarzania kwasu rozmarynowego z 0,8 g/dm³ do 3,3 g/dm³ [3]. W przypadku hodowli korzeni włośnikowych *Bupleurum falcatum* (pol. przewiercień sierpowaty) maksymalną zawartość saikos-

poniny uzyskano przy stężeniu sacharozy wynoszącym 8%. Wysokiej wydajności metabolitu towarzyszył jednak bardzo ograniczony wzrost korzeni, ich postępująca nekroza oraz inhibicja procesu formowania nowych korzeni bocznych, będące konsekwencją zbyt silnego stresu osmotycznego [29]. Negatywne efekty stresu osmotycznego mogą być zminimalizowane przy zastosowaniu dwuetapowej hodowli z początkowym niskim, i końcowym wysokim stężeniem sacharozy.

Odmianą tendencję zaobserwowano w badaniach nad biosyntezą antocyjanin w kulturach zawiesinowych *Aralia cordata* (pol. aralia sercowata), w których wzrost stężenia sacharozy już powyżej 3% powodował wyraźny spadek wydajności bioproduktu [30]. Najczęściej stosowanymi stężeniami sacharozy w mediach hodowlanych przeznaczonych do kultur komórek roślinnych są stężenia z zakresu od 1 do 5% [2].

Na akumulację metabolitów wtórnych wpływa również stosunek form i całkowita ilość azotu w medium hodowlanym. Medium hodowlane zawiera ten pierwiastek w postaci jonów azotanowych (NO₃⁻) i amonowych (NH₄⁺), a dobranie odpowiednich stężeń ich soli pozwala w wielu przypadkach na zwiększenie wydajności metabolitów wtórnych, głównie tych, które zawierają azot w cząsteczkach. Wyniki badań pokazują także, że akumulacji betacyjanin i szikoniny sprzyja obniżenie stężenia jonów amonowych i zwiększenie stężenia formy azotanowej, zaś wzrost stosunku jonów amonowych do azotanowych podwyższał wydajność berberyny i ubichinonu [3]. W przypadku obniżenia całkowitej zawartości obu form azotowych wzrasta produktywność solanidyny w korzeniach włośnikowych *Solanum khasianum* [31] i kapsaicyny w hodowli *Capsicum frutescens* (pol. papryka roczna) [32]. Podobną zależność zaobserwowano też dla polifenoli, kumaryn, antocyjanin oraz antrachinonów. Co ciekawe, całkowita eliminacja formy azotanowej w hodowlach zawiesinowych *Chrysanthemum cinerariaefolium* spowodowała dwukrotny wzrost akumulacji pyretryny [33].

Kolejnym pierwiastkiem, niezbędnym dla wzrostu biomasy roślinnej hodowanej w warunkach *in vitro*, jest fosfor. Do hodowli dostarcza się go w formie jonów fosforanowych, których stężenie w medium hodowlanym ma istotne znaczenie dla wzrostu eksplantatów i produkcji roślinnych metabolitów wtórnych. Okazuje się, że wysokie stężenia fosforanów sprzyjają przyrostowi biomasy, jednak w przypadku wielu metabolitów ograniczają ich akumulację. Wyniki badań dotyczące hodowli węgłnej zawiesiny komórek *Catharanthus roseus* (pol. barwinek różowy) wykazują, że przeniesienie biomasy do medium pozbawionego jonów fosforanowych powoduje wzrost akumulacji alkaloidów indolowych i związków fenolowych. Ten efekt wiąże się ze wzrostem aktywności enzymów uczestniczących w biosyntezie wymienionych metabolitów [34]. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku hodowli biomasy *Digitalis purpurea* (pol. naparstnica purpurowa), która charakteryzowała się zwiększoną akumulacją digitoksyny przy wyższych stężeniach jonów fosforanowych w medium hodowlanym [35]. Stymulujący wpływ wysokich stężeń fosforanów na przyrost biomasy może sugerować, że zwiększona akumulacja będzie dotyczyć metabolitów wtórnych, których poziom biosyntezy koreluje z intensywnością wzrostu w warunkach hodowli *in vitro* [10].

Istotny wpływ na wzrost komórek i organów oraz biosyntezę roślinnych metabolitów wtórnych w warunkach hodowli *in vitro* ma stężenie roślinnych regulatorów wzrostu

w pożywce. Ich egzogenny dodatek jest konieczny dla rozwoju biomasy komórek rosnących w postaci zawiesiny cząstek, zaś hodowle transformowanych korzeni włośnikowatych mogą rosnać w pożywkach go pozbawionych [24]. Spośród różnych auksyn najczęściej w hodowlach *in vitro* stosowane są kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), kwas naftylo-1-octowy (NAA) lub kwas indolilo-3-octowy (IAA) [8]. Dla powyższych auksyn, poza pierwszą z wymienionych, eksperymentalnie udowodniono stymulujące działanie na akumulację antocyjanin w hodowlach zawiesin komórek *Daucus carota* (pol. marchew zwyczajna), nikotyny w hodowlach *N. tabacum*, szikoniny w hodowlach *L. erythrorhizon* oraz wielu innych metabolitów [3]. W hodowli korzeni włośnikowych *P. ginseng*, których celem było otrzymanie glikozydów saponinowych, wydajniejsze okazało się użycie kwasu indolilo-3-mastowego (IBA) niż NAA [36]. Zaobserwowano także korzystny efekt dodatku 2,4-D do medium, zwiększający wydajność karotenoidów w hodowli zawiesiny komórek *D. carota* [5], a także antocyjanin w hodowli *Oxalis linearis* [37].

Cytokiny także przejawiają zróżnicowany wpływ na metabolizm wtórny komórek roślinnych. W przypadku kinetyny zaobserwowano stymulację produkcji antocyjanin w hodowlach *Haplopappus gracilis*, ale hamowanie ich akumulacji w kulturach zawiesinowych uzyskanych z tkanki kalusowej indukowanej z pąków hybrydy *Populus maximowiczii* x *Populus nigra* (pol. topola Maksymowicza x topola czarna) [38]. W przypadku hodowli korzeni włośnikowych *Artemisia annua* (pol. bylica roczna), użyta 2-izopentyloadenina (2iP) spowodowała inhibicję wzrostu biomasy z jednoczesną intensyfikacją produkcji artemizyny [39]. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku biosyntezy saponin w kulturach *P. ginseng* po zastosowaniu 6-benzyloadeninopuryny (6-BAP). Wykazywany w doświadczeniach zróżnicowany wpływ gibberelin na kultury roślinne obejmował intensyfikację biosyntezy kumaryn w hodowli korzeni włośnikowych *Cichorium intybus* (pol. cykoria podróznik) [40] oraz obniżenie wydajności produkcji hioscyjminy dla takiego samego typu kultury *Hyoscyamus muticus* (pol. lulek złoty) [41], co zostało także zaobserwowane dla kwasu absycynowego [5]. Również etylen może zwiększać akumulację metabolitu, jak ma to miejsce w przypadku artemizyny w hodowlach sadzonek *A. annua* (pol. bylica roczna) [39].

Istotne jest zapewnienie właściwego napowietrzania i monitorowania składu fazy gazowej w układzie hodowlanym. Ciągłe dostarczanie i odbiór fazy gazowej do i z układu hodowlanego ma za zadanie zapewnienie eksplantatom tlenowe warunki hodowli, desorpcję lotnych produktów metabolizmu komórek i pośrednio także odbiór wytwarzanego ciepła. Ilość dostarczanego tlenu i dwutlenku węgla w mieszance gazowej przetwarzanej przez objętość naczynia hodowlanego należy dobrać według gatunku. Właściwy udział gazów w mieszance jest czynnikiem stymulującym wzrost eksplantatów a także biosyntezę i akumulację w komórkach roślinnych metabolitów wtórnych. Okazuje się, że w wielu przypadkach zbyt wysokie stężenia tlenu przejawiały toksyczne działanie na komórki, co związane jest ze stresem oksydacyjnym oddziałującym negatywnie na komórki [5].

Hodowlę komórek i organów roślinnych najczęściej prowadzi się w zakresie temperatur 17-25°C [3]. Wyniki badań dotyczących wpływu temperatury na metabolizm roślin pokazały, że w zależności od metabolitu i gatunku

rośliny dla różnych temperatur uzyskuje się bądź indukcję bądź zahamowanie tempa wzrostu lub zwiększenia akumulacji bioproduktów w komórkach. Przykładowo, dla hodowli korzeni włośnikowych *P. ginseng* najwyższy przyrost biomasy zaobserwowano dla cyklicznych zmian warunków inkubacji w temperaturach 20°C (przez 16 godzin) i 13°C (przez 8 godzin) podczas gdy największą akumulację saponin zaobserwowano przy stałej temperaturze inkubacji wynoszącej 25°C [27].

Dla optymalnego wzrostu eksplantatów konieczne jest uwzględnienie zapotrzebowania na światło. Należy dobrać odpowiednią jego intensywność, fotoperiod (czyli stosunek dnia do nocy, tzn. fazy jasnej do fazy ciemnej inkubacji) i zakres długości stosowanych fal z zakresu widma światła widzialnego, gdyż każdy z tych czynników może wywoływać specyficzną dla poszczególnych gatunków odpowiedź na przyrost biomasy i akumulację metabolitów. W badaniach z udziałem korzeni włośnikowych *P. ginseng* wykazano, że ciemność lub czerwone światło stymulowały wzrost eksplantatów, zaś dla intensyfikacji akumulacji saponin najkorzystniejsze okazało się światło fluorescencyjne o znacznie zwiększonym udziale fal z zakresu promieniowania UV w porównaniu ze światłem dziennym [27]. W przypadku hodowli wgłębnych komórek *Melastoma malabathricum* umiarkowana intensywność oświetlenia zapewniała najlepsze przyrosty biomasy i wydajności produkcji barwników antocyjaninowych [42].

W przypadku korzeni włośnikowych stwierdzono indukowane światłem zmiany w metabolizmie. Obserwowano, że hodowle tych organów prowadzone w warunkach dostępności światła wykazywały zdolność biosyntezy metabolitów wtórnych specyficznych wyłącznie dla organów nadziemnych części roślin [24]. Analiza biochemiczna korzeni wskazała również na obecność w ich komórkach chloroplastów, co mogło być przyczyną produkcji nowych związków, jako że te plastydy zawierają enzymy wielu szlaków biosyntezy, oraz chlorofilu powodującego zielenienie omawianej tkanki [7]. Przykładem może być hodowla korzeni włośnikowych *Digitalis lanata* (pol. naparstnica wełnista) produkująca kardenolidy tylko w obecności światła [43].

Podczas hodowli *in vitro* biomasy roślinnej zachodzą zmiany odczynu pH medium hodowlanego. Zjawisko to jest powodowane przez asymilację amoniaku, co wywołuje spadek pH, i azotanów, powodujący wzrost pH, a dodatkowo także przez akumulację bioproduktów. Zmiana stężenia jonów wodorowych w pożywce wpływa także na przepuszczalność błony komórkowej, co może powodować zewnątrzkomórkowe uwalnianie metabolitów [5]. Najczęściej stosowane wartości odczynu pH medium hodowlanego mieszczą się w zakresie od 5 do 6 [3].

Mieszanie o odpowiedniej intensywności ma na celu uzyskanie homogenicznych warunków hodowlanych, w odniesieniu zarówno do elementów biomasy cyrkulujących wewnątrz naczynia hodowlanego, jak i składników medium hodowlanego, w tym również pęcherzy fazy gazowej, oraz toksycznych dla komórek produktów metabolizmu, wydzielanych zewnątrzkomórkowo. Następuje polepszenie dostępności składników pożywki i fazy gazowej, zaś dodatkowym efektem jest rozbijanie agregatów komórkowych na mniejsze struktury. Ograniczeniem jest wrażliwość komórek na powstające w efekcie mieszania i napowietrzania naprężenia ścinające, mające negatywny wpływ na żywotność hodowanych wgłębnie eksplantatów [10].

Metabolity wtórne stanowią produkty końcowe wieloetapowych, skomplikowanych szlaków metabolicznych, których przebieg warunkowany jest aktywnością odpowiednich enzymów oraz obecnością substratów dla kolejnych etapów biosyntezy (prekursorów). Dodatek prekursorów do pożywki powoduje często zwiększenie wydajności biosyntezy konkretnych roślinnych metabolitów wtórnych w oparciu o efekt sprzężenia zwrotnego lub skrócenia szlaku metabolicznego [3]. Przykłady prekursorów roślinnych metabolitów wtórnych przedstawiono w tabeli 2.

Zwiększenie akumulacji roślinnych metabolitów wtórnych w hodowlach *in vitro* zostało również zaobserwowane w odpowiedzi na różnorodne biotyczne lub abiotyczne czynniki stresowe, określane mianem elicytorów [4]. Przykładowo, w hodowli kalusa *Taxus cuspidata* (pol. cis japoński) dodatek siarczanu wanadylu spowodował około 20-krotny wzrost akumulacji 10-deacetylobakatyiny III (prekursora biosyntezy taksanów), natomiast w przypadku hodowli komórek *Taxus x media* (pol. cis pośredni) i zastosowania chitozanu jako elicytora, wydajność paklitakselu wzrosła o ponad 50% [49]. Innym stosunkowo dobrze zbadanym związkami, stosowanymi jako elicytor chemiczny, jest jasmonian metylu. Jego zastosowanie wraz z fenyloalaniną w roli prekursora w hodowli korzeni włośnikowych *Taxus x media* var. *Hicksii* pozwoliło uzyskać prawie 28-krotny wzrost produkcji paklitakselu [50].

W przypadku hodowli zawiesin komórek możliwe jest zastosowanie immobilizacji hodowanego materiału biologicznego w żelu lub na powierzchni nośników. Technika ta wykazuje się szeregiem zalet - między innymi pozwala uniknąć problemów wrażliwości komórek na naprężenia ścinające i ich łączenia się w agregaty, co prowadzi do większej żywotności materiału biologicznego. Dodatkowo następuje obniżenie lepkości płynnego medium, czego wynikiem jest efektywniejsze mieszanie i napowietrzanie w bioreaktorach. Metoda ta jest jednak użyteczna tylko dla otrzymywania metabolitów wydzielanych przez komórki do medium hodowlanego, co pozwala na ich prostszą izolację i oczyszczanie [5]. W jednym z doświadczeń osiągnięto aż 1000-krotny wzrost wydajności zewnątrzkomórkowego uwalniania kapsaicyny w kulturze *C. frutescens* po immobilizacji jej komórek w piance poliuretanowej [51]. Przykładami innych substancji stosowanych jako nośniki lub media służące immobilizacji komórek roślinnych są alginian wapnia, agarozę i poliakrylamid [2].

Ponieważ roślinne metabolity wtórne, biosyntezywane przez komórki, magazynowane są w ich wakuolach, sekrecja metabolitów do medium hodowlanego zależy bezpośrednio od przepuszczalności błon komórkowych oraz ściany komórkowej. Możliwość uwolnienia metabolitów do pożywki byłaby znaczącym ułatwieniem dla procesów oczysz-

czania bioproduktów. Na operację taką pozwala metoda permeabilizacji ścian komórkowych. Polega ona na utworzeniu porów w strukturze komórki, przez które mogą przedostać się na zewnątrz magazynowane w wakuolach związki chemiczne [5]. Stosowane do tego celu rozpuszczalniki organiczne i polisacharydy cechuje duża skuteczność, jednak mogą one mieć negatywny wpływ na żywotność komórek. Przykładem jest zastosowanie dimetylosulfotlenku (DMSO) do permeabilizacji komórek pochodzących z hodowli zawiesiny *Cinchona ledgeriana*, których błona komórkowa nie odzyskała funkcjonalności po usunięciu zastosowanego rozpuszczalnika [52]. W przypadku immobilizowanych komórek *C. roseus* nie obserwowano jednak negatywnego działania DMSO [53].

4. Przemysłowa produkcja roślinnych metabolitów wtórnych

Potrzeba produkcji roślinnych metabolitów wtórnych zależy od użyteczności tych substancji dla człowieka. Obecnie metabolity roślinne stanowią przedmiot zainteresowania przemysłu farmaceutycznego, służąc jako leki (bądź matryce do ich otrzymywania), przemysłu spożywczego, w którym m.in. pełnią rolę dodatków do żywności określanymi mianem nutraceutyków, oraz przemysłu kosmetycznego, stanowiąc wiele kluczowych składników produktów kosmetycznych.

Historycznie pierwszym komercyjnie produkowanym metabolitem wtórnym pochodzenia roślinnego, w którego procesie produkcji zastosowano hodowle *in vitro* komórek roślinnych, była szikonina [54,55]. Zaliczana do naftochinonów szikonina i jej pochodne wykazują aktywność antynowotworową, przeciwbakteryjną oraz przeciwzakrzepową [56]. Pochodne szikoniny stanowią także przedmiot zainteresowania przemysłu spożywczego, który wykorzystuje je w roli barwników [9]. Do jej przemysłowego otrzymywania zastosowano dwuetapową hodowlę zawiesiny komórek *L. erythrorhizon*, prowadzoną w dwóch bioreaktorach [54]. Podział procesu na dwa etapy wynikał z obserwowanej inhibicji przyrostu biomasy podczas hodowli [57]. Pierwszy etap obejmował namnażanie biomasy w zmodyfikowanym medium hodowlanym LS (MG5), optymalnym dla wzrostu komórek *L. erythrorhizon* w bioreaktorze o pojemności 200 dm³ przez ok. 9 dni. W kolejnym etapie odfiltrowaną biomasę umieszczano w bioreaktorze o pojemności 750 dm³, aby przy zastosowaniu zmodyfikowanego medium hodowlanego White'a (M-9) zmaksymalizować wydajność produkcji szikoniny w czasie 14 dni trwania drugiej fazy hodowli [55]. Badania nad optymalizacją składu stosowanych pożywek wykazały, że kluczowa dla wydajności biosyntezy szikoniny

Tabela 2. Przykłady zastosowanych prekursorów intensyfikujących biosyntezę wybranych metabolitów wtórnych podczas hodowli *in vitro* materiału biologicznego pochodzenia roślinnego.

Gatunek	Metabolit wtórny	Prekursor	Bibliografia
<i>Coleus blumei</i>	kwask rozmarynowy	fenyloalanina	[44]
<i>Salvia officinalis</i>	kwask rozmarynowy	fenyloalanina	[45]
<i>Taxus cuspidata</i>	paklitaksel	fenyloalanina	[46]
<i>Vanilla planifolia</i>	wanilina	kwask ferulowy	[47]
<i>Perilla frutescens</i>	monoterpeny	leucyna	[48]
<i>Daucus carota</i>	antocyjanina	dihydrokwercetyna	[48]

przez komórki *L. erythrorhizon* jest forma dostępnego azotu. Zastosowane w drugim etapie produkcji medium M-9, podobnie jak medium White'a, zawierało jony azotanowe, zaś pozbawione było jonów amonowych, których nawet niewielki dodatek powodował inhibicję biosyntezy pochodnych szikoniny [58]. Modyfikacja medium LS do MG5 oraz medium White'a do M-9 pozwoliła na ok. 13-krotny wzrost wydajności produkcji tych metabolitów (1400 mg/dm^3) [47,49]. Na wysoką produkcyjność szikoniny w omówionym wyżej przypadku miały wpływ również działania związane z selekcją wysokoprodukcyjnych linii komórkowych. Prowadząc hodowlę protoplastów *L. erythrorhizon* udało się wyizolować linię komórkową charakteryzującą się wydajnością biosyntezy szikoniny i jej pochodnych o 150% wyższą niż w linii wyjściowej, przy jednoczesnym wzroście stabilności produkcji tego metabolitu [60]. Dalszy wzrost wydajności uzyskano przez zastosowanie metody fuzji protoplastów linii cechujących się największymi przyrostami biomasy z liniami o najwyższych wydajnościach biosyntezy szikoniny [59].

Innym interesującym przykładem roślinnego metabolitu wtórnego jest berberyna, należąca do grupy alkaloidów izochinolinowych [61]. Wyniki badań klinicznych wskazują na jej przydatność między innymi w terapii nadciśnienia, arytmii i chorób nowotworowych. Metabolit ten wykazuje się także antybiozą i potwierdzoną skutecznością terapeutyczną przeciwko lekoopornym szczepom *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* oraz wirusowi grypy H1N1 i wirusowi HIV-1. Ponadto może być stosowana w roli nutraceutyku o ochronnym wpływie na organizm człowieka [62]. Prace mające na celu komercjalizację produkcji berberyny przy zastosowaniu hodowli zawieszinowej komórek *Coptis japonica* (pol. cynowód japoński) obejmowały m. in. otrzymanie wysokowydajnych linii komórkowych przez wielokrotnie powtarzaną selekcję nieodróżnicowanych komórek tworzących agregaty i izolację protoplastów [63,64]. Kolejnym wyzwaniem była optymalizacja medium hodowlanego. Modyfikując skład medium LS wykazano, że 10-krotne zwiększenie stężenia jonów miedzi Cu^{2+} w formie CuSO_4 powoduje 30% wzrost wydajności berberyny przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na przyrost biomasy. Ponieważ eksperymentalnie wykazane optimum stężenia sacharozy faworyzujące wzrost komórek *C. japonica* nie wpływało znacząco na biosyntezę berberyny, cały proces produkcji mógł przebiegać bez zmiany składu medium w jednostopniowej hodowli półokresowej [65]. Aby proces stał się ekonomicznie opłacalny konieczne było zwiększenie wydajności otrzymywanej berberyny z jednostki objętości bioreaktora. Rozwiązaniem okazała się hodowla zawieszinowa komórek o wysokiej gęstości, której prowadzenie wymagało stałej kontroli składu medium hodowlanego w zakresie odpowiednich dla danej gęstości stężeń składników oraz właściwej intensywności mieszania i napowietrzania, generujących możliwie najmniejsze sily ścinające. W efekcie udało się uzyskać wydajność produkcji berberyny na poziomie $3,5 \text{ g/dm}^3$ [66].

Omawiając przykłady przemysłowej produkcji roślinnych metabolitów wtórnych należy wymienić wykorzystanie hodowli węglnych komórek *P. ginseng* do uzyskiwania ginsenozydów. Badania wskazują na cytotoksyczność przedstawicieli tej grupy metabolitów roślinnych, co czyni je potencjalnymi lekami w walce z nowotworami. Związki te mogą również stymulować odpowiedź układu immunologicznego względem obecności antygeny zwiększając od-

porność organizmu, co wskazuje na ich potencjalne zastosowanie jako adiuwantów [67]. Udowodniony pozytywny wpływ ginsenozydów na układ sercowo-naczyniowy pozwala traktować te związki jako przydatne w profilaktyce i leczeniu zaburzeń funkcjonowania układu krążenia [68].

Konwencjonalna uprawa żeń-szenia jest czasochłonna i narażona na środowiskowe czynniki stresogenne [69]. Komercyjną, wielkoskalową produkcję ginsenozydów wykorzystującą hodowlę zawieszin komórek w warunkach wysokiej gęstości prowadzono w bioreaktorach o pojemności $20\text{--}25 \text{ m}^3$ [70]. Uzyskanie wysokich wydajności było wynikiem szeregu działań optymalizujących proces. Po pierwsze, inokulum pochodziło z linii komórek o wysokiej produkcyjności ginsenozydów. Ponieważ metabolity te nie są biosyntezowane przez nieodróżnicowane komórki *P. ginseng*, konieczna była częściowa dyferencjacja kalusa. Decydujące okazało się również dobranie odpowiedniej intensywności mieszania, usunięcie jonów amonowych z medium hodowlanego oraz zastosowanie kaskady czterech bioreaktorów przeznaczonych do wstępnego namnożenia biomasy [70]. W hodowli trwającej cztery tygodnie uzyskiwane wydajności suchej biomasy dochodziły do poziomu 20 g/dm^3 [69,71].

Innym przykładem komercjalizacji produkcji ginsenozydów może być hodowla korzeni *P. ginseng*, która charakteryzowała się zwiększoną stabilnością i wydajnością bioproduktów, względem hodowli węglnych zawieszin komórek. Dla uzyskania maksymalnych wartości przyrostu biomasy i stężenia biosyntezowanych ginsenozydów proces produkcji zachodzący w bioreaktorze typu „air lift” o pojemności 10 m^3 podzielono na dwie fazy hodowli. Warunki pierwszego etapu faworyzowały wzrost biomasy, zaś zastosowana w drugiej fazie elicytacja korzeni jasmonianem metylu pozwoliła uzyskać wydajności ginsenozydów sięgające 42 mg/g suchej masy biomasy (360 mg/dm^3) [72].

Paklitaksel jest roślinnym metabolitem wtórnym, wykazującym silne właściwości cytostatyczne, którego produkcji metodą hodowli *in vitro* komórek roślinnych poświęca się aktualnie dużo uwagi. Ma on ugruntowaną pozycję w leczeniu nowotworów płuc, złośliwego raka jajnika i piersi oraz mięsaka Kaposiego. Obecnie trwają badania kliniczne nad zastosowaniem tego metabolitu w terapiach innych rodzajów nowotworów, a także chorób nienowotworowych, jak łuszczyca czy tauopatie [73]. Szerokie terapeutyczne działanie determinuje duże zapotrzebowanie na paklitaksel, którego zaspokojenie jednakże nie jest proste. Kora i igły roślin z rodziny *Taxaceae* (pol. cisowate) stanowiące główny, i w zasadzie jedyny, surowiec do otrzymywania paklitakselu zawierają te związki w niewielkich ilościach (do 0,05%). Biorąc dodatkowo pod uwagę ograniczenia środowiskowe, uwarunkowania prawne (w Polsce cisy są gatunkami prawnie chronionymi) i ekonomiczne, a także złożony proces oczyszczania ekstrahowanych taksanów, uzasadnione stają się poszukiwania alternatywnej, wydajnej metody ich pozyskiwania.

Badania prowadzone nad hodowlami *in vitro* eksplantatów pobranych z gatunków rodziny cisowatych koncentrują się na zwiększeniu otrzymywanych ilości metabolitów przez optymalizację warunków hodowli, uzyskanie wysoko produkcyjnych linii komórkowych, zastosowanie hodowli korzeni włośnikowych oraz opracowanie wydajniejszych technik izolacji i oczyszczania taksanów [74]. Obecnie największa komercyjna produkcja paklitakselu prowadzona jest przez spółkę Phytion Biotech® w bioreaktorach o pojemnościach $45\ 000 \text{ dm}^3$ i $75\ 000 \text{ dm}^3$, w których hoduje się

biomasę *Taxus chinensis* z wydajnościami szacowanymi na kilkaset kilogramów paklitakselu rocznie [75]. Wysokowydajne komórki *T. chinensis* zostały uzyskane w wyniku dwuetapowej selekcji. Indukowany z igieł rośliny kalus wykorzystano do wyizolowania linii komórkowych wytypowanych pod względem najlepszej wydajności biosyntezy paklitakselu. Kryterium drugiego etapu selekcji była jak najlepsza stabilność produkcji metabolitów oraz przyrostu biomasy przy niskim poziomie zanieczyszczeń w postaci niepożądanych metabolitów. Otrzymane wysokowydajne linie są przechowywane w banku komórek metodą krioprezewacji, aby posłużyć do zapoczątkowania nowych hodowli przejściowych i stopniowego zwiększania skali produkcji.

Określona eksperymentalnie stabilność odzyskanych po krioprezewacji komórek wynosi 10 miesięcy, co stanowi wystarczający czas na przeniesienie hodowli do docelowego bioreaktora (75 000 dm³). Proces produkcji paklitakselu opracowany przez Phytion Biotech® dzieli się na dwa etapy. Pierwszy obejmuje namnażanie biomasy *T. chinensis* początkowo w formie kalusa hodowanego na podłożu stałym, z którego następnie uzyskuje się hodowlę zawieszoną w kolbach. Kolejne hodowle prowadzi się w bioreaktorach o coraz większej pojemności do uzyskania pożądanej ilości biomasy. Faza druga procesu, czyli biosynteza paklitakselu, następuje po przeniesieniu biomasy do bioreaktora o objętości 75 000 dm³ i wymianie medium hodowlanego. Wykorzystanie dwóch bioreaktorów oraz wymiana pożywki są podyktowane koniecznością optymalizacji medium etapu biosyntezy, którego skład różni się od medium zapewniającego największy przyrost biomasy. Maksymalizację biosyntezy uzyskuje się przez zastosowanie jasmonianu metylu jako elicytora, kwasu metylenodioksycynamonowego jako inhibitora szlaku fenylopropanoidowego oraz jonów srebra, działających antagoniście do etylenu i promujących biosyntezę paklitakselu [75].

Kolejnym przykładem produkcji roślinnych metabolitów wtórnych metodą hodowli *in vitro* biomasy roślinnej, jest zrealizowana w skali pilotażowej hodowla korzeni *Echinacea purpurea* (pol. jeżówka purpurowa) [76]. Jednym ze związków biosyntezowanych przez ten gatunek jest kwas cykoriowy, wykazujący działanie stymulujące układ immunologiczny, hamujące aktywność hialuronidazy, chroniące przed degradacją kolagenu, a także aktywność antywiru-

szą. Powstają także kwas chlorogenowy oraz kwas kawowy, posiadające aktywności przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i antynowotworowe [77]. Hodowlę korzeni *E. purpurea* prowadzono przez 50 dni w położonym horyzontalnie reaktorze bębnowym o objętości roboczej 1000 dm³. W roli pożywki użyte zostało medium MS z dodatkiem IBA (1 mg/dm³) oraz sacharozy (50 g/dm³). Uzyskana wydajność kwasu cykoriowego wyniosła 22,5 mg/g_{sm}, kwasu chlorogenowego 4,9 mg/g_{sm}, zaś kwasu kawowego 3,9 mg/g_{sm}. Łączne stężenie tych metabolitów w biomacie było blisko 4-krotnie większe niż w roślinach rosnących w gruncie [78].

Winblastynę i winkrystynę wykorzystuje się w chemioterapii m. in. przeciwko nowotworom szpiku kostnego i ziarnicy złośliwej. Komercyjna produkcja tych leków polega na ekstrakcji z dużych ilości biomasy *C. roseus*, problemem jest jednak skrajnie niewielkie stężenie tych związków w tkankach roślinnych. Hodowle komórek *C. roseus* uzyskane przez selekcję agregatów komórkowych, charakteryzujące się wysokimi wydajnościami biosyntezy katarantyny, umożliwiły otrzymywanie winblastyny metodą biotransformacji, polegającej na enzymatycznym łączeniu windoliny ze wspomnianą katarantyną [79]. Proces taki uznano za ekonomicznie opłacalny. Dzięki optymalizacji składu medium hodowlanego uzyskiwane tygodniowe produktywności katarantyny sięgały 230 mg/dm³ hodowli [80].

W tabeli 3 przedstawiono podsumowanie przemysłowych zastosowań hodowli *in vitro* do uzyskiwania metabolitów roślinnych.

5. Podsumowanie

Biotechnologiczne metody otrzymywania roślinnych metabolitów wtórnych dzięki niewątpliwym zaletom stanowią istotną alternatywę dla metod konwencjonalnych. Charakterystyczne dla kultur *in vitro* odizolowanie biomasy roślinnej od zmiennego środowiska i związana z tym możliwość ścisłej kontroli parametrów układu hodowlanego umożliwia ich optymalizację, co prowadzi do maksymalizacji wzrostu biomasy i wydajności biosyntezy. Cel ten, jak wykazano w niniejszej pracy, jest osiągalny jedynie indywidualnie na drodze eksperymentalnej, bowiem złożoność układu biologicznego, stanowiącego kultury różnych typów

Tabela 3. Przemysłowe aplikacje hodowli *in vitro* do uzyskiwania metabolitów roślinnych.

Gatunek	Metabolit	Rodzaj biomasy	Etapy hodowli	Objętość bioreaktora [dm ³]	Wydajność produkcji [mg/dm ³]	Czas hodowli [dni]	Bibliografia
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	szikonina	zawiesina komórek	2	750	1 400	23	[59]
<i>Coptis japonica</i>	berberyina	zawiesina komórek	1	4 000	3 500	14	[66]
<i>Panax ginseng</i>	ginsenozydy	zawiesina komórek	1	25 000	-	28	[70]
<i>Panax ginseng</i>	ginsenozydy	korzenie	2	10 000	360	50	[72]
<i>Taxus chinensis</i>	paklitaksel	zawiesina komórek	2	75 000	-	-	[75]
<i>Echinacea purpurea</i>	kwas cykoriowy	korzenie	1	1 000	22,5	50	[78]
<i>Catharanthus roseus</i>	katarantyna	zawiesina komórek	1	-	230	7	[80]

biomasy roślinnej, oraz jej różnice gatunkowe, uniemożliwiają opracowanie uniwersalnych procedur. Przy optymalizacji składu i parametrów medium hodowlanego konieczne jest uwzględnienie odpowiedzi hodowanych komórek, tkanek bądź organów roślinnych na zastosowane stężenie oraz formę każdego z wielu składników obecnych w pożywce. Metoda może być uzupełniona przez suplementację układów hodowlanych związkami ukierunkowującymi metabolizm na biosyntezę metabolitów wtórnych, tzn. elicytorami, fitohormonami lub prekursorami. Należy również podkreślić, że dla wielu gatunków roślin obserwuje się różnice składu między medium promującym wzrost biomasy a medium maksymalizującym biosyntezę metabolitów wtórnych. Jednym z rozwiązań tej niedogodności mogą być hodowle dwuetapowe. W przypadku immobilizacji biomasy roślinnej utworzenie mikrośrodowiska chroniącego przed czynnikami stresogennymi oraz imitującego warunki panujące w tkankach roślinnych prowadzi do wzrostu oporów dyfuzyjnych. W konsekwencji, dla niektórych ze zbadanych gatunków zaobserwowano negatywny wpływ tej metody. Na krytyczny komentarz zasługuje również permeabilizacja błon komórkowych, która wykazuje negatywny wpływ na

żywołność komórek, co ogranicza jej stosowalność w końcowych etapach hodowli okresowych.

Biorąc pod uwagę ograniczenia metod hodowli *in vitro* biomasy roślinnej do otrzymywania metabolitów wtórnych, nie należy jednak zapominać o licznych zaletach takiego rozwiązania, realizowanego w skali laboratoryjnej i przemysłowej. Analizując wymienione w tekście przykłady komercyjnej produkcji, można wytypować następujące strategie zapewniające powodzenie metodom biotechnologicznym: (i) selekcja stabilnych i wysokoproduktywnych linii komórkowych; (ii) powiększanie skali przy zastosowaniu kaskady bioreaktorów; (iii) optymalizacja składu medium hodowlanego; (iv) hodowle dwuetapowe i okresowe. Dzięki powyższym procedurom produkcja omawianą metodą staje się ekonomicznie uzasadniona, szczególnie w przypadku takich związków jak paklitaksel, katarantyna i szikonina, których wydajne pozyskiwanie metodami konwencjonalnymi napotyka na trudności. Wymienione komercyjne sukcesy wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań nad optymalizacją warunków hodowli *in vitro* biomasy roślinnej i rozwijania nowych metod intensyfikacji produkcji metabolitów wtórnych.

6. Załącznik

Tabela 4. Alfabetyczny spis gatunków roślin wymienionych w tekście.

Nazwa łacińska	Nazwa polska	Otrzymywane metabolity	Rodzaj hodowanej biomasy
<i>Aralia cordata</i>	aralia sercowata	antocyjany	ZK
<i>Artemisia annua</i>	bylica roczna	artemizyna	KW
<i>Bupleurum falcatum</i>	przewiercień sierpowaty	saikosaponina	KW
<i>Catharanthus roseus</i>	barwinek różowy	serpentyna; ajmalicyna; katarantyna	ZK
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	-	pyretryna	ZK
<i>Cichorium intybus</i>	cykoria podróżnik	kumaryny	KW
<i>Cinchona ledgeriana</i>	-	alkaloidy chinolinowe; antrachinony	ZK
<i>Coleus blumei</i>	koleus Blumego; pokrzywka brazylijska	kwasy rozmarynowy	ZK
<i>Coptis japonica</i>	cynowód japoński	berberyna	ZK
<i>Cruciata glabra</i>	przytulinka wiosenna	antrachinony	IK
<i>Daucus carota</i>	marchew zwyczajna	antocyjany; karotenoidy	ZK; KAL
<i>Digitalis lanata</i>	naparstnica wełnista	kardenolidy	KW
<i>Digitalis purpurea</i>	naparstnica purpurowa	digitoksyna	KW
<i>Dioscorea deltoidea</i>	-	diosgenina	K
<i>Duboisia myoporoides</i>	-	hioscyjamina; skopolamina	-
<i>Echinacea purpurea</i>	jeżówka purpurowa	kwasy cykoriowy	K
<i>Haplopappus gracilis</i>	-	-	-
<i>Hyoscyamus muticus</i>	lulek złoty	hioscyjamina	KW
<i>Hypericum perforatum</i>	dziurawiec zwyczajny	hiperycyna; kwercetyna	KW
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	nawrot lekarski	szikonina	KW; ZK
<i>Matricaria chamomilla</i>	rumianek pospolity	-	ZK
<i>Melastoma malabathricum</i>	-	antocyjany	ZK
<i>Mentha canadensis</i>	mięta kanadyjska	monoterpeny	P
<i>Morinda citrifolia</i>	morwa indyjska	antrachinony	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	tytoń szlachetny	nikotyna	KW, ZK

<i>Oxalis linearis</i>	-	antocyjany	
<i>Panax ginseng</i>	żeń-szeń właściwy	ginsenozydy	KW; ZK
<i>Papaver somniferum</i>	mak lekarski	sanguinaryna	KW
<i>Perilla frutescens</i>	pachnotka zwyczajna	antocyjany; monoterpeny	KAL; ZK
<i>Polygonum tinctorium</i>	rdest barwierski	indirubina	ZK
<i>Populus maximowiczii</i>	topola Maksymowicza	antocyjany	ZK
<i>Populus nigra</i>	topola czarna	antocyjany	ZK
<i>Salvia officinalis</i>	szalwia lekarska	kwasy rozmarynowy	-
<i>Solanaceae</i>	psiankowate	alkaloidy tropanowe	-
<i>Solanum dulcamara</i>	psiankowate	-	ZK
<i>Solanum khasianum</i>	-	solanidyna	KW
<i>Taxus baccata</i>	cis pospolity	paklitaksel	ZK
<i>Taxus chinensis</i>	-	paklitaksel	-
<i>Taxus cuspidata</i>	cis japoński	paklitaksel	KAL
<i>Taxus x media</i>	cis pośredni	paklitaksel	ZK; KW
<i>Thalictrum minus</i>	rutewka mniejsza	berberyna	-
<i>Vanilla planifolia</i>	wanilia płaskolistna	wanilina	ZK

Objaśnienia: ZK - zawiesina komórek; KW - korzenie włośnikowe; K - korzenie;
KAL - kalus; IK - im mobilizowane komórki; P - pędy

7. Bibliografia

- Kawka M., Ekstrakcja *in situ* naftochinonów w hodowli korzeni transformowanych *Rindera graeca* (*In situ* extraction of naphthoquinones in *Rindera graeca* transformed hairy root cultures). Praca dyplomowa na stopień magistra inżyniera wykonana w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej i w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 2016.
- Grajek W., Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*. W: Malepszy S. (red.), Biotechnologia roślin (s. 306-340), Wydawnictwo Naukowe PWN 2007.
- Ramachandra Rao S. & Ravishankar G. A., Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2002, 20, 101-153.
- Georgiev M. I., Pavlov A. I. & Bley T., Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, 74, 1175-1185.
- Murthy H. N., Lee E.-J. & Paek K.-Y., Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2014, 118, 1-16.
- Dörnenburg H. & Knorr D., Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 1995, 17, 674-684.
- Bourgaud F., Grivot A., Milesi S. & Gontier E., Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science* 2001, 161, 839-851.
- Skucińska B., Kultura komórek i tkanek. W: Malepszy S. (red.), Biotechnologia roślin (s. 19-31), Wydawnictwo Naukowe PWN 2007.
- Ruffoni B., Pistelli L., Bertoli A. & Pistelli L., Plant cell cultures: Bioreactors for industrial production. W: Giardi M. T., Rea G., Berra B., Bio-Farms for nutraceuticals (s. 203-221), *Advances in experimental medicine and biology* 2010.
- Su W. W., Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995, 50, 189-230.
- Hippolyte I., Marin B., Baccou J. C. & Jonard R., Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Reports* 1992, 11, 109-112.
- Fujita Y., Industrial Production of shikonin and berberine. W: Gregory Bock, Joan Marsh (red.), *Ciba Foundation Symposium 137 - Applications of Plant Cell and Tissue Culture* (s. 228-238), John Wiley & Sons Ltd. 2007.
- Zenk M. H., El-Shagi H. & Schulte U., Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica* 1975, Suppl, 79-101.
- Kobayashi Y., Fukui H. & Tabata M., Berberine production by batch and semi-continuous cultures of immobilized *Thalictrum* cells in an improved bioreactor. *Plant Cell Reports* 1988, 7, 249-252.
- Breuling M., Alfermann A. W. & Reinhard E., Cultivation of cell cultures of *Berberis wilsonae* in 20-l airlift bioreactors. *Plant Cell Reports* 1985, 4, 220-223.
- Zhong J.-J., Konstantinov K. B. & Yoshida T., Computer-aided on-line monitoring of physiological variables in suspended cell cultures of *Perilla frutescens* in a bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1994, 77, 445-447.
- Sahai O. & Knuth M., Commercializing plant tissue culture processes: Economics, problems and prospects. *Biotechnology Progress*™ 1985, 1, 1-9.
- Park J. M., Yoon S. Y., Giles K. L., Songstad D.D., Eppstein D., Novakowski D., Friesen L. & Roewer I., Production of sanguinarine by suspension culture of *Papaver somniferum* in bioreactors. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1992, 74, 292-296.
- Zenk M. H., El-Shagi H., Arens H., Stöckigt J., Weiler E. W. & Deus B., Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. W: Barz W., Reinhard E. & Zenk M. H. (red.), *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* (s. 27-43), Springer Berlin Heidelberg 1977.
- Ibraheem Y., Pinker I. & Böhme M., A comparative study between solid and liquid cultures relative to callus growth and somatic embryo formation in *Phoenix dactylifera* L. cv. Zaghlool. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2013, 25, 883-898.
- Grajek W., Kultury roślinne w bioreaktorach. W: Malepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin* (s. 87-132), Wydawnictwo naukowe PWN 2007.
- Uozumi N., Large-scale production of hairy root. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2004, 91, 75-103.
- Giri A. & Narasu M. L., Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 2000, 18, 1-22.

24. Sharma P., Padh H. & Shrivastava N., Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. *Engineering in Life Sciences* 2013, 13, 62-75.
25. Maldonado-Mendoza I. E., Ayora-Talavera T. & Loyola-Vargas V. M., Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1993, 33, 321-329.
26. Yukimune Y., Hara Y. & Yamada Y., Tropane alkaloid production in root cultures of *Duboisia myoporoides* obtained by repeated selection. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1994, 58, 1443-1446.
27. Yu K.-W., Murthy H. N., Hahn E.-J. & Paek K.-Y., Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: Influence of temperature and light quality. *Biochemical Engineering Journal* 2005, 23, 53-56.
28. Szopa J. & Łukaszewicz M., Tworzenie konstrukcji genowych. W: Malepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin* (s.209-229), Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007.
29. Ahn J. C., Chong W. S., Kim Y. S. & Hwang B., Optimization of the sucrose and ion concentrations for saikosaponin production in hairy root culture of *Bupleurum falcatum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2006, 11, 121-126.
30. Sakamoto K., Iida K., Sawamura K., Hajiuro K., Asada Y., Yoshikawa T. & Furuya T., Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. *Phytochemistry* 1993, 33, 357-360.
31. Jacob A. & Malpathak N., Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2005, 80, 247-257.
32. Ravishankar G. A., Sarma K. S., Venkataraman L. V. & Kadyan A. K., Effect of nutritional stress on capsaicin production in immobilized cell cultures of *Capsicum annuum*. *Current Science* 1988, 57, 381-383.
33. Rajasekaran T., Rajendran L., Ravishankar G. A. & Venkataraman L. V., Influence of nutrient stress on pyrethrin production by cultured cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Current Science* 1991, 60, 705-707.
34. Knobloch K.-H. & Berlin J., Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. Comparison of enzyme activities and product accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1983, 2, 333-340.
35. Hagimori M., Matsumoto T. & Obi Y., Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture: II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiol.* 1982, 69, 653-656.
36. Kim Y.-S., Hahn E.-J., Yeung E. C. & Paek K.-Y., Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2003, 39, 245-249.
37. Meyer H. J. & Staden J. V., The *in vitro* production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1995, 40, 55-58.
38. Matsumoto T., Nishida K., Noguchi M. & Tamaki E., Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry* 1973, 37, 561-567.
39. Weathers P. J., Bunk G. & McCoy M. C., The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2005, 41, 47-53.
40. Bais H. P., Sudha G., George J. & Ravishankar G. A., Influence of exogenous hormones on growth and secondary metabolite production in hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. CV. Lucknow local. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 2001, 37, 293-299.
41. Vanhala L., Eeva M., Lapinjoki S., Hiltunen R. & Oksman-Caldentey K.-M., Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Plant Physiology* 1998, 153, 475-481.
42. Chan L. K., Koay S. S., Boey P. L. & Bhatt A., Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biological Research* 2010, 43, 127-135.
43. Lui J. H. C. & Staba E. J., Effects of precursors on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures. *Phytochemistry* 1979, 18, 1913-1916.
44. Constabel F., Cell culture and somatic cell genetics of plants. Volume 4. Cell culture in phytochemistry, 1987.
45. Ellis B. E. & Towers G. H., Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochemical Journal* 1970, 118, 291-297.
46. Fett-Neto A. G., Melanson S. J., Sakata K. & DiCosmo F., Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Nature Biotechnology* 1993, 11, 731-735.
47. Romagnoli L. G., Effects of ferulic acid treatment on growth and flavor development of cultured *Vanilla planifolia* cells. *Food Biotechnology* 1988, 2, 93-104.
48. Mulder-Krieger T., Verpoorte R., Svendsen A. B. & Scheffer J. J. C., Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1988, 13, 85-154.
49. Furmanowa M., Olędzka H., Sykłowska-Baranek K., Józefowicz J. & Gieracka S., Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus x media* by some elicitors and precursors. *Biotechnology Letters* 2000, 22, 1449-1452.
50. Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Kokoszka A. & Furmanowa M., Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii*. *Journal of Plant Physiology* 2009, 166, 1950-1954.
51. Lindsey K. & Yeoman M. M., The synthetic potential of immobilised cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum*. *Planta* 1984, 162, 495-501.
52. Parr A. J., Robins R. J. & Rhodes M. J. C., Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulphoxide. effects on alkaloid release and long-term membrane integrity. *Plant Cell Reports* 1984, 3, 262-265.
53. Brodelius P. & Nilsson K., Permeabilization of immobilized plant cells, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1983, 17, 275-280.
54. DiCosmo F. & Misawa M., Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances* 1995, 13, 425-453.
55. Yadav P. R., *Crop Biotechnology*, Discovery Publishing House, 2006.
56. Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Couladouros E. A., Hepworth D. & Nicolaou K. C., The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie - International Edition* 1999, 38, 270-300.
57. Fujita Y., Hara Y., Suga C. & Morimoto T., Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* - II. A new Medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports* 1981, 1, 61-63.
58. Bhojwani S. S. & Razdan M. K., *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier, 1996.
59. Fujita Y., Shikonin: Production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures. W: Bajaj, Y. P. S. (red.), *Medicinal and Aromatic Plants I* (s. 225-236), Springer Berlin Heidelberg 1988.
60. Fujita Y., Takahashi S. & Yamada Y., Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agricultural and Biological Chemistry* 1985, 49, 1755-1759.
61. Verpoorte R., Contin A. & Memelink J., Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 2002, 1, 13-25.
62. Kumar A., Ekavali, Chopra K., Mukherjee M., Pottabathini R. & Dhull D. K., Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *European Journal of Pharmacology* 2015, 761, 288-297.
63. Hara Y., Yamagata H., Morimoto T., Hiratsuka J., Yoshioka T., Fujita Y. & Yamada Y., Flow cytometric analysis of cellular berberine

- contents in high- and low-producing cell lines of *Coptis japonica* obtained by repeated selection. *Planta Medica* 1989, 55, 151-154.
64. Zenk M. H., Rüffer M., Kutchan T. M. & Galneder E., Biotechnological approaches to the production of isoquinoline alkaloids. W: Bock G., Marsh J. (red.), *Applications of plant cell and tissue culture* (Ciba Foundation Symposium 137) (s. 213-227), John Wiley & Sons, 2007.
 65. Morimoto T., Hara Y., Kato Y., Hiratsuka J., Yoshioka T., Fujita Y. & Yamada Y., Berberine production by cultured *Coptis japonica* cells in a one-stage culture using medium with a high copper concentration. *Agricultural and Biological Chemistry* 1988, 52, 1835-1836.
 66. Matsubara K., Kitani S., Yoshioka T., Morimoto T., Fujita Y. & Yamada Y., High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1989, 46, 61-69.
 67. Lü J.-M., Yao Q. & Chen C., Ginseng compounds: An update on their molecular mechanisms and medical applications. *Current Vascular Pharmacology* 2009, 7, 293-302.
 68. Lee C. H. & Kim J.-H., A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *Journal of Ginseng Research* 2014, 38, 161-166.
 69. 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., Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Reports* 2000, 19, 628-533.
 70. Hibino K. & Ushiyama K., *Commercial Production of Ginseng by Plant Tissue Culture Technology*. W: Fu T.-J., Singh G. & Curtis W. R. (red.), *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients* (s. 215-224), Springer US 1999.
 71. Ramawat K. G., *Biotechnology, Second Edition: Secondary Metabolites*, CRC Press, 2007.
 72. Paek K. Y., Murthy H. N., Hahn E. J. & Zhong J. J., Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2009, 113, 151-176.
 73. Malik S. Cusidó R. M., Mirjalili M. H., Moyano E., Palazon J. & Bonfill M., Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemistry* 2011, 46, 23-34.
 74. Sykłowska-Baranek K., Pilarek M., Bonfill M., Kafel K. & Pietrosiuk A., Perfluorodecalin-supported system enhances taxane production in hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* carrying a taxadiene synthase transgene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2015, 120, 1051-1059.
 75. Meyer H.-P. & Schmidhalter D., *Industrial scale suspension culture of living cells*, John Wiley & Sons, 2014.
 76. Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A. & Pistelli L., Hairy root cultures for secondary metabolites production. W: Giardi M. T., Rea G., Berra B., *Bio-Farms for nutraceuticals* (s. 167-184), *Advances in experimental medicine and biology* 2010.
 77. Hou J., Fu J., Zhang Z.-M. & Zhu H.-L., Biological activities and chemical modifications of caffeic acid derivatives. *Fudan University Journal of Medical Sciences* 2011, 38, 546-552.
 78. Wu C.-H., Murthy H. N., Hahn E.-J. & Paek K.-Y., Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid. *Biotechnol. Lett.* 2007, 29, 1179-1182.
 79. Fujita Y., Hara Y., Morimoto T. & Misawa M., Semisynthetic production of vinblastine involving cell cultures of *Catharanthus roseus* and chemical reaction. W: Nijkamp H. J. J., Van Der Plas L. H. W. & Van Aartrijk J. (red.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology* (s. 738-743), Springer Netherlands 1990.
 80. DiCosmo F. & Misawa M., *Plant cell culture secondary metabolism toward industrial application*, CRC Press, 1996.